

---

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

---

**Alterações morfológicas em glândulas salivares de fêmeas de  
carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787,  
(Acari: Ixodidae) em diferentes estágios de alimentação  
durante sucessivas infestações em coelhos.**

**PABLO HENRIQUE NUNES**

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).

Agosto- 2009

---

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

---

**Alterações morfológicas em glândulas salivares de fêmeas de  
carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787,  
(Acari:Ixodidae) em diferentes estágios de alimentação  
durante sucessivas infestações em coelhos**

PABLO HENRIQUE NUNES

**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).

Rio Claro  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto- 2009

## Dedicatória

Aos meus Pais Mário e Isabel

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais Mário e Isabel pela dedicação que sempre tiveram conosco em todos os momentos, pelo apoio, confiança e amizade.

À minha esposa Adriana sem a qual este trabalho não teria sido possível, pela ajuda na realização das infestações, por me dar forças sempre que eu precisei e por agüentar meu mau humor e minhas manias.

À minha filha Ana Clara pela ajuda no momento de cuidar dos coelhos e pelo apoio sempre.

À minha orientadora Profa. Dra Maria Izabel Camargo Mathias pelas oportunidades, confiança e amizade ao longo destes nove anos de convivência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara pelas discussões, esclarecimentos, amizade e por estar sempre disposto a ajudar.

À todos os professores do departamento de biologia ou de outras unidades com os quais cursei as disciplinas que com certeza foram fundamentais para minha formação.

Aos meus irmãos, Isaac, Túlio e Talita pela preocupação, apoio e amizade sempre.

Aos amigos do departamento de biologia da UNESP Sandra, Karim, Gislaine, Letícia, Paula, Débora, Carol, Patrícia, Natália, Luis, Gustavo, André e Alex, pela amizade, pelo trabalho em grupo e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas de trabalho na Escola da Fundação de Ensino de Mococa especialmente à coordenadora Margareth pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos Kaiser, Silvana, Mirella, Henrique, Animal, Leslie, Morcego, Ursulla, Alberto, Gil que muitas vezes me ajudaram a cuidar dos coelhos e pelos momentos agradáveis que tivemos durante todos esses anos.

Aos técnicos de laboratório Gérson Mello Souza e Ronaldo Del Vecchio por todo apoio técnico essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (Proc. 07/59020-0).

## Sumário

Resumo.....	6
Abstract .....	8
1. Introdução.....	10
2. Objetivos .....	16
3. Material e Métodos .....	18
3.1. Material .....	18
3.1.1. Carrapatos .....	18
3.1.2. Hospedeiros.....	18
3.1.3. Construção da Câmara de Alimentação dos Carrapatos para Alocação dos Casais de <i>A. cajennense</i> .....	18
3.1.4. Fixação da Câmara de Alimentação no Hospedeiro .....	19
3.1.5. Deposição dos Casais de <i>Amblyomma cajennense</i> na Câmara de Alimentação .....	19
3.2. Métodos.....	20
3.2.1. Histologia.....	20
3.2.2. Histoquímica .....	21
4. Resultados .....	24
4.1. Capítulo 1: Necessary feeding time for the engorgement of females of <i>Amblyomma cajennense</i> Fabricius, 1787 (Acari:Ixodidae) in naive and resistant rabbits. ....	24
4.2. Capítulo 2: Morphological changes in the salivary glands of <i>Amblyomma cajennense</i> females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation.....	38
4.3. Capítulo 3: Secretion dynamics of the salivary gland on semi and engorged tick females <i>Amblyomma cajennense</i> Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) during the second infestation in rabbit.....	40
4.4. Capítulo 4: Secretory process of salivary glands of <i>Amblyomma cajennense</i> Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) female ticks fed on resistant rabbits. ....	61
5. Discussão Geral .....	90
6. Conclusões .....	98
7. Referências Bibliográficas .....	101

**RESUMO**

---

**Resumo**

O contato dos carrapatos com os hospedeiros e a liberação de antígenos por meio da saliva estimula o desenvolvimento de respostas imune por parte dos hospedeiros. Os objetivos deste trabalho foram os de analisar e comparar morfo-histoquimicamente as glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma cajennense* fixadas em hospedeiros naive e reinfestados, e os resultados revelaram que coelhos reinfestados por *A. cajennense* desenvolvem resistência contra os mesmos em apenas uma infestação e essa resistência provoca efeitos no ciclo de atividade e na degeneração das glândulas salivares. Fêmeas fixadas em coelhos resistentes apresentaram aumento do tempo necessário para atingir o completo ingurgitamento e fêmeas ingurgitadas apresentaram redução significativa do peso final. As glândulas salivares dessas fêmeas apresentaram alterações morfológicas, que foram mais evidentes naquelas submetidas à terceira infestação. A histologia e a histoquímica mostraram que os ácinos I não sofreram alterações em comparação com aqueles das fêmeas fixadas em coelhos naive. As células c dos ácinos II apresentaram sinais de degeneração precoce, o que resultou na diminuição da eficiência alimentar. No ácino III as células d estenderam o tempo de atividade, provavelmente relacionado ao aumento do tempo de permanência das fêmeas nos hospedeiros resistentes.



**ABSTRACT**

---

**Abstract**

The contact with the ticks and hosts and the antigen releasing by saliva, stimulates the immune response development by the hosts. This study aims to analyze and compare morpho-histochemically the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females fixed on naive and re-infested hosts. The results show that re-infested rabbits by *A. cajennense* develop resistance against them in only one infestation and such resistance shows effects in the development and degeneration cycle of salivary glands. Females fixed on resistant rabbits showed an increase in the time required to complete the engorgement while the final weight of engorged females showed significant reduction. These female salivary glands showed morphological changes, which were more evident in females subjected to the third infestation. The acini I, no changes had been occurred compared with those of females fixed in naive rabbits. The acini II, the **c** cells showed early degeneration signs, which may result in feed efficiency reduction. In acini III, the **d** cells extended the activity time, which may be associated with the increase in the female fixation time which had been fed on resistant hosts.



## 1. Introdução

O carrapato adulto da espécie *Amblyomma cajennense* é conhecido popularmente como carrapato-estrela, carrapato do cavalo ou rodoleiro e suas formas imaturas por micuins. São hematófagos obrigatórios e necessitam de repasto sangüíneo em três hospedeiros para completar seu ciclo de vida (FLECHTMANN, 1985). Esses carrapatos apresentam grande importância sanitária, uma vez que podem transmitir, entre outras doenças, a febre maculosa, também conhecida como febre das Montanhas Rochosas, febre do carrapato, febre negra ou doença azul, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. O carrapato *A. cajennense* encontra-se amplamente distribuído no continente americano, desde o sudoeste dos Estados Unidos, América Central até América do Sul, com exceção do Chile e do Uruguai (COOLEY e KOHLS, 1944).

As fêmeas dos carrapatos *A. cajennense*, depois de fecundadas e ingurgitadas, desprendem-se do hospedeiro e caem no solo para realizar a postura (em torno de 5.000 a 8.000 ovos) antes de morrerem. Após aproximadamente 12 dias, elas iniciam a oviposição, que dura em média 25 dias, na qual depositam os ovos, dos quais aproximadamente 95% são viáveis. As larvas produzidas (micuins) permanecerão em jejum por um período de até seis meses até encontrarem o seu primeiro hospedeiro. As larvas alojadas nas gramíneas e nos arbustos esperarão a passagem dos hospedeiros, e após os encontrarem e deles sugarem o sangue por cerca de três a seis dias, os ectoparasitas desprendem-se e caem no solo, onde ocorrerá a muda (18 a 26 dias). Dessa muda, surgirão as ninfas, que subirão e descerão diariamente das folhas e dos ramos das plantas, à procura de um novo hospedeiro. No estágio de ninfa, o ectoparasita pode permanecer em jejum por um período estimado de um ano ou mais. Depois de encontrado o segundo hospedeiro, as ninfas se fixarão aí e se alimentarão por aproximadamente cinco a sete dias. Depois de completamente ingurgitadas, se soltarão e cairão no solo, onde realizarão a segunda muda em local protegido (FLECHTMANN, 1985).

Depois de 25 dias, emergirão os adultos que, em aproximadamente sete dias, encontrar-se-ão perfeitamente aptos a realizar seu terceiro estágio parasitário. Ainda no ambiente, permanecerão em jejum por até 24 meses, aguardando o terceiro hospedeiro, numa demonstração de grande resistência física aos diversos fatores ambientais. Encontrando o hospedeiro, machos e fêmeas se fixarão, farão o repasto sangüíneo, copularão e então as fêmeas fertilizadas iniciarão o ingurgitamento, que terminará em aproximadamente dez dias.

Após esse período, as fêmeas desprender-se-ão do hospedeiro e, no solo, iniciarão uma nova geração (FLECHTMANN, 1985).

Os carrapatos em geral, quando vão se alimentar, primeiramente caminham sobre a pele do hospedeiro, tocando-a com a extremidade dos palpos maxilares, onde se encontram estruturas sensoriais. Assim que encontrado o ponto adequado, eles se prendem firmemente à pele e a penetram utilizando suas partes bucais altamente especializadas, que por meio de ganchos, forçam o hipostômio contra a pele, penetrando-a lentamente e funcionando como órgão de fixação durante todo o repasto sangüíneo.

As glândulas salivares presentes em *A. cajennense*, assim como nos ixodídeos em geral, são consideradas órgãos vitais para o sucesso biológico desse grupo, pois apresentam grande diversidade de funções que estão envolvidas com a produção de diferentes componentes. Sendo assim, atribuem-se às glândulas salivares as funções de produção de substâncias ligadas à fixação e à alimentação dos parasitas (SCHUMAKER; SERRA FREIRE, 1991).

Segundo Sonenshine (1991), a saliva é uma mistura complexa de elementos que atua numa variedade de funções durante os períodos de parasitismo e não parasitismo, a saber:

1. é o meio pelo qual várias enzimas e alguns tipos de moduladores farmacodinâmicos, que atuam no aumento do fluxo sanguíneo na região da picada (agentes vasoativos), são introduzidos, antagonizando os componentes inflamatórios do hospedeiro, facilitando a sucção do sangue para o carrapato (DICKINSON et al., 1976; FAWCETT et al., 1986);
2. possuem anticoagulantes (NUTTAL, 1908; WALKER, 1985), além de agentes imunossupressores que possibilitam aos ectoparasitas a fixação no hospedeiro, minimizando neste o desenvolvimento de rejeição;
3. possuem enzimas hidrolíticas (TATCHELL, 1969) e proteolíticas (HOWELL et al., 1975) que auxiliam na digestão dos tecidos do hospedeiro durante os processos de fixação e de alimentação;
4. veiculam substâncias tóxicas (NEITZ et al., 1969), causadoras de distúrbios incluindo paralisias, que podem até levar o hospedeiro à morte;
5. introduzem antígenos (FAWCETT et al., 1986), suscitando ou não resposta imune no hospedeiro;
6. veiculam agentes patogênicos (FAWCETT et al., 1986);
7. introduzem cimento (substâncias cementantes), que fixa o ectoparasita à pele do hospedeiro (COWDRY e DANKS, 1933; FAWCETT et al., 1986);
8. excretam o excesso de água e íons acumulados durante a alimentação, promovendo a concentração do sangue (GREGSON, 1960, 1967);
9. secretam solução proteinácea, produzida somente na glândula salivar dos machos, a qual segundo dados da literatura participa da transferência do espermatóforo durante a cópula (FELDMAN-MUHSAM et al., 1970) e
10. secretam solução higroscópica, que é depositada

na região bucal dos machos e das fêmeas, para absorção da água atmosférica, o que contribui para a hidratação do animal nos períodos de não parasitismo e de seca (GREGSON, 1960, 1967).

As glândulas salivares são órgãos que estão presentes tanto nos machos como nas fêmeas, localizadas ao longo da porção ventral, nas regiões antero-laterais da cavidade corpórea e desembocando na cavidade oral (OLIVIERI; SERRA-FREIRE, 1992; TILL, 1961; WALKER et al., 1985). São estruturas pares e de coloração esbranquiçada (SCHUMAKER; SERRA FREIRE, 1991; SONENSHINE, 1991), sendo constituídas por uma porção secretora e uma excretora, porém desprovidas de reservatório para armazenamento. A porção secretora é formada por diferentes tipos de ácinos (I, II, III e IV), sendo o IV exclusivo dos machos.

Segundo Sonenshine (1991) e Olivieri & Serra-Freire (1992) os ácinos I são aqueles denominados agranulares e os II, III e IV, granulares, devido à presença de grande quantidade de grânulos de secreção no citoplasma de suas células. A porção excretora é composta por um sistema de ductos ramificados, havendo um ducto principal ou excretor comum, tubo central longo e de maior calibre, que se abre na porção anterior do carrapato para eliminar a secreção na sua cavidade bucal. Do ducto excretor comum, partem os intermediários, de menor calibre, que ainda se subdividem ao longo da glândula, terminando em pequenos canalículos, que coletam a secreção produzida diretamente por cada ácino (ducto acinar) (TILL, 1961; WALKER et al, 1985; FAWCETT et al, 1986; SCHUMAKER; SERRA FREIRE, 1991; BALASHOV, 1979).

As glândulas salivares dos carrapatos têm como característica apresentar um ciclo secretor bem definido, marcado por uma fase de desenvolvimento e outra de involução. Esse ciclo secretor é determinado pelo estado fisiológico em que o carrapato se encontra, momento caracterizado como jejum ou alimentado.

Estudos realizados por Tatchell (1967), durante a alimentação de *Boophilus microplus*, mostraram que o tecido glandular sofre rápida transformação estrutural e funcional. Os ácinos I, encontrados em indivíduos de ambos os sexos, sofrem poucas mudanças estruturais, por exemplo, no diâmetro. Os ácinos II aumentam de tamanho, bem como aumentam sua atividade secretora, sendo os ácinos dominantes, nas fêmeas, na produção de secreção no final do estágio alimentar (WALKER et al., 1985). Os ácinos III sofrem rápida transformação estrutural e funcional (SAUER; HAIR, 1986). Os ácinos IV apresentam mudanças significativas, tanto que em carrapatos em jejum são denominados de indiferenciados.

Sendo assim, nos carrapatos adultos, que estão ou na fase de pré-fixação ou mesmo na fase que antecede a alimentação (jejum), as glândulas salivares encontram-se em fase pré-

secretora, quando as células glandulares estão pouco ativas. A fixação dos animais no hospedeiro seria o estímulo para as glândulas salivares se desenvolverem, processo esse que não ocorreria por completo até que o carrapato iniciasse sua alimentação (WALKER et al., 1985). Durante a alimentação dos carrapatos sabe-se que as glândulas salivares encontram-se em alta atividade secretora. Na terceira fase, que teria início após a completa alimentação das fêmeas (desprendimento destas do hospedeiro), as glândulas entrariam em degeneração. Após a oviposição no solo, a degeneração completa do órgão ocorreria (WALKER et al., 1985; TILL, 1961).

Ainda sobre a degeneração das glândulas salivares em carrapatos, sabe-se que o tecido glandular de fêmeas ingurgitadas perde quase toda sua capacidade secretora, e então as células sofrem autólise e os ácinos degeneram. Já a interrupção na alimentação, sem que a fêmea tenha atingido o seu “peso crítico”, resulta na perda parcial da atividade das glândulas salivares, situação que é rapidamente reestruturada quando os carrapatos voltam a se alimentar. A literatura tem relatado que a degeneração das glândulas salivares seria controlada por alguns fatores tais como os hormônios identificados como ecdisteróides (ecdisona e 20-hidroxiecdisona) (KAUFMAN, 1986), bem como por substâncias conhecidas como fator de macho/ingurgitamento (WEISS & KAUFMAN, 2004) que seriam introduzidas juntamente com o espermatóforo durante a cópula. Segundo a literatura, o fator de macho somado a sinais neurais seria o elemento chave para o início da produção de ecdisteróides, explicação dada para a perda da atividade secretora das glândulas salivares em fêmeas ingurgitadas fecundadas, mas não para fêmeas ingurgitadas virgens e machos alimentados (SONENSHINE, 1991). Após a completa degeneração das glândulas salivares, permanece apenas o sistema de ductos, bem como uma massa de tecido glandular (TILL, 1961).

O contato dos carrapatos com os hospedeiros e a liberação de antígenos por meio da saliva estimula o desenvolvimento de resposta imunológica por parte do hospedeiro. Inúmeros trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de analisar o desenvolvimento da resistência a carrapatos de várias espécies por diferentes hospedeiros, após sucessivas infestações, visto que o entendimento dos mecanismos de defesa dos hospedeiros poderia auxiliar na solução de problemas de combate aos carrapatos, os quais têm-se tornado cada vez mais resistentes aos acaricidas. Além disso, a utilização excessiva desses produtos estaria causando sérios danos ao meio ambiente, além de eles terem um alto custo econômico (UTECH et al., 1978; WILLADSEN & JONGEJAN, 1999). Desta forma, vários estudos têm sinalizado a potencial utilização da proteção imunológica induzida pelos hospedeiros no combate aos carrapatos. A indução artificial de resistência tem sido realizada também com o uso de extratos de glândulas

salivares e de outros tecidos dos carrapatos (WIKEL, 1981; JITTAPALAPONG et al., 2000/2008).

Alguns estudos ainda têm mostrado que o desenvolvimento de resistência de hospedeiros a carrapatos varia de acordo com as espécies do carrapato e do hospedeiro (CASTAGNOLLI et al., 2003; HELLER-HAUPT et al., 1996). A avaliação do grau de resistência adquirida pelo hospedeiro pode ser feita por meio da análise de parâmetros biológicos dos carrapatos, após sucessivas infestações nos hospedeiros (WILLADSEN, 1980, SZABÓ et al., 1995). A imunidade adquirida seria expressa e medida pela redução no número de carrapatos que se fixariam no hospedeiro, redução do número de carrapatos que se alimentariam completamente em infestações sucessivas, prolongamento do período de ingurgitamento, redução da habilidade de larvas e de ninfas em sofrer ecdise, redução do peso das fêmeas ingurgitadas, e redução da fecundidade, resultando em redução significativa na população de carrapatos e morte dos mesmos (MONTEIRO e BECHARA, 2008; CASTAGNOLLI et al., 2003; SATHAPORN et al., 2000; GEORGE et al., 1985; WILLADSEN, 1980).



## **OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivos

Diante das informações expostas e considerando que a redução no peso atingido pelas fêmeas e o aumento do tempo de alimentação dos carrapatos em hospedeiros resistentes são reflexos de alterações que ocorrem nas suas glândulas salivares, estruturas responsáveis pela fixação e alimentação dos mesmos, o objetivo geral deste trabalho foi o de analisar e comparar morfo-histoquimicamente as glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma cajennense* nas seguintes situações:

1. Fêmeas em jejum
2. Fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas fixadas em coelhos naive (primeira infestação).
3. Fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas fixadas em coelhos em situação de segunda infestação.
4. Fêmeas semi-ingurgitadas e ingurgitadas fixadas em coelhos em situação de terceira infestação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Carrapatos**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas fêmeas de *Amblyomma cajennense* em jejum, semi-ingurgitadas, ingurgitadas e com dois e cinco dias após o ingurgitamento. Para tanto, cento e oitenta casais de carrapatos adultos em jejum, cedidos pelo Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara do Departamento de Patologia Veterinária da UNESP *campus* de Jaboticabal (SP), a partir de colônia mantida em laboratório em condições controladas (29 °C, 80% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) em estufa BOD, foram depositados nos hospedeiros(coelhos) para se alimentar, segundo o procedimento descrito abaixo:

##### **3.1.2. Hospedeiros**

Foram utilizados nas infestações seis coelhos adultos (New Zealand White) sadios, pesando cerca de 1kg, procedentes do Biotério Central da UNESP, *campus* de Botucatu, que foram alimentados com ração apropriada para a espécie e recebendo água *ad libitum*.

##### **3.1.3. Construção da Câmara de Alimentação dos Carrapatos para Alocação dos Casais de *A. cajennense* (BECHARA et al., 1995)**

Um círculo de borracha fina de câmara-de-ar (descartada de bicicleta) medindo 9 cm de diâmetro foi cortado e revestido com tecido de algodão, o qual mantém contato com a pele do hospedeiro. Em seguida, um círculo de 3,5 cm de diâmetro foi retirado do centro do círculo maior. Na borda do círculo de 3,5 cm foi fixado com cola plástica um tubo plástico de 2 cm de altura, o qual fica vedado internamente também com cola plástica e externamente com esparadrapo. Este tubo plástico recebe uma tampa com três orifícios pequenos, revestidos internamente com tela de nylon, para que os carrapatos tivessem garantido seu suprimento de ar e não escapem pelos orifícios (Figs. 1 A, B).

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

Os coelhos tiveram uma área da região dorsal tosada, a qual recebeu uma camada de cola Britânica (cola especial e atóxica). Da mesma forma, a região revestida com tecido de algodão da câmara de alimentação (acima descrita) recebeu uma camada desta cola. Em seguida, a câmara foi fixada na pele do coelho. Esta fixação foi reforçada com esparadrapo, que cobriu parte da câmara e da região tosada dos hospedeiros (Figs. 1 C-G).

A câmara de alimentação já fixada permaneceu por 24 horas destampada para eliminação do odor da cola, para então serem depositados os carrapatos.

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

Depois de decorridas 24 horas da fixação da câmara, os casais de carrapatos foram colocados no interior das câmaras de alimentação (Figura 1 H).

A primeira observação realizou-se 12 horas após a deposição dos casais (tempo necessário para eles se acomodarem), e a partir daí foram realizadas a cada 3 horas, para acompanhar a fixação dos carrapatos no hospedeiro, até que todas as fêmeas estivessem fixadas.

Foram utilizados 6 coelhos e em cada um foram realizadas 3 infestações com intervalos de 30 dias entre elas. Em cada infestação foram fixadas 2 câmaras alimentadoras/coelho e em cada câmara foram depositados 5 casais de *A. cajennense*.

Algumas fêmeas foram retiradas do hospedeiro ainda enquanto o processo de alimentação ocorria e para efeito de padronização foram dissecadas apenas aquelas com 10% do peso das fêmeas ingurgitadas para cada situação (primeira, segunda e terceira infestações), garantindo-se que todas as fêmeas semi-ingurgitadas escolhidas para análise estivessem no mesmo período de alimentação e conseqüentemente todas as glândulas salivares estariam no mesmo estágio de desenvolvimento. O peso das fêmeas foi utilizado como controle de alimentação tendo em vista que o tempo que as fêmeas permanecessem fixadas ao hospedeiro

deitaria, dentre outros fatores da cópula com o macho pelo macho e, portanto, seria inadequado realizar o controle pelo tempo de fixação. Os pesos das fêmeas ingurgitadas foram obtidos em três infestações pilotos realizadas em três coelhos. Foram analisadas ao todo 90 fêmeas (10/coelho/infestação). O peso médio das fêmeas ingurgitadas, bem como o peso das fêmeas semi-ingurgitadas utilizadas nas análises encontram-se na tabela abaixo.

INFESTAÇÃO	MAIOR PESO (INGURGITADAS)	MENOR PESO (INGURGITADAS)	PESO UTILIZADO SEMI-INGURGITADAS
1	0.676	0.362	entre 0.036 e 0.067
2	0.442	0.182	entre 0.018 e 0.044
3	0.441	0.167	entre 0.016 e 0.040

**PESO (EM GRAMAS) DAS FÊMEAS SEMI INGURGITADAS (OBTIDOS EM INFESTAÇÕES PILOTO)**

Assim que completados os períodos de alimentação as glândulas salivares das fêmeas de *A. cajennense* foram retiradas e encaminhadas para processamento.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Histologia

##### 3.2.1.1. Coloração pela Hematoxilina de Harris-Eosina Aquosa (HE) (JUNQUEIRA, 1983).

As fêmeas de *A. cajennense* foram colocadas em congelador (5 minutos) para anestesia por choque térmico, nos laboratórios de Histologia do Departamento de Biologia da UNESP campus de Rio Claro-SP Brasil. Na seqüência, foram retiradas suas glândulas salivares em solução salina (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) e na sequencia fixadas em paraformaldeído 4%.

A seguir o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool e transferido para resina de embebição onde permaneceu por 24 horas. A inclusão deu-se em historesina Leica (Hidroxietilmetacrilato) e os blocos contendo o material foram seccionados em micrótomo (3 m/secção). As secções foram recolhidas em lâminas de vidro, reidratadas em água destilada por 1 minuto, coradas, por 10 minutos, em hematoxilina de Harris e mantidas em água por 10 minutos para reagir. Em seguida foram lavadas em água, coradas

com eosina por 10 minutos e novamente lavadas com água para retirar o excesso de corante. Após a secagem procedeu-se a montagem das lâminas histológicas com bálsamo do Canadá as quais foram posteriormente observadas e fotografadas em microscópio MOTIC BA 300.

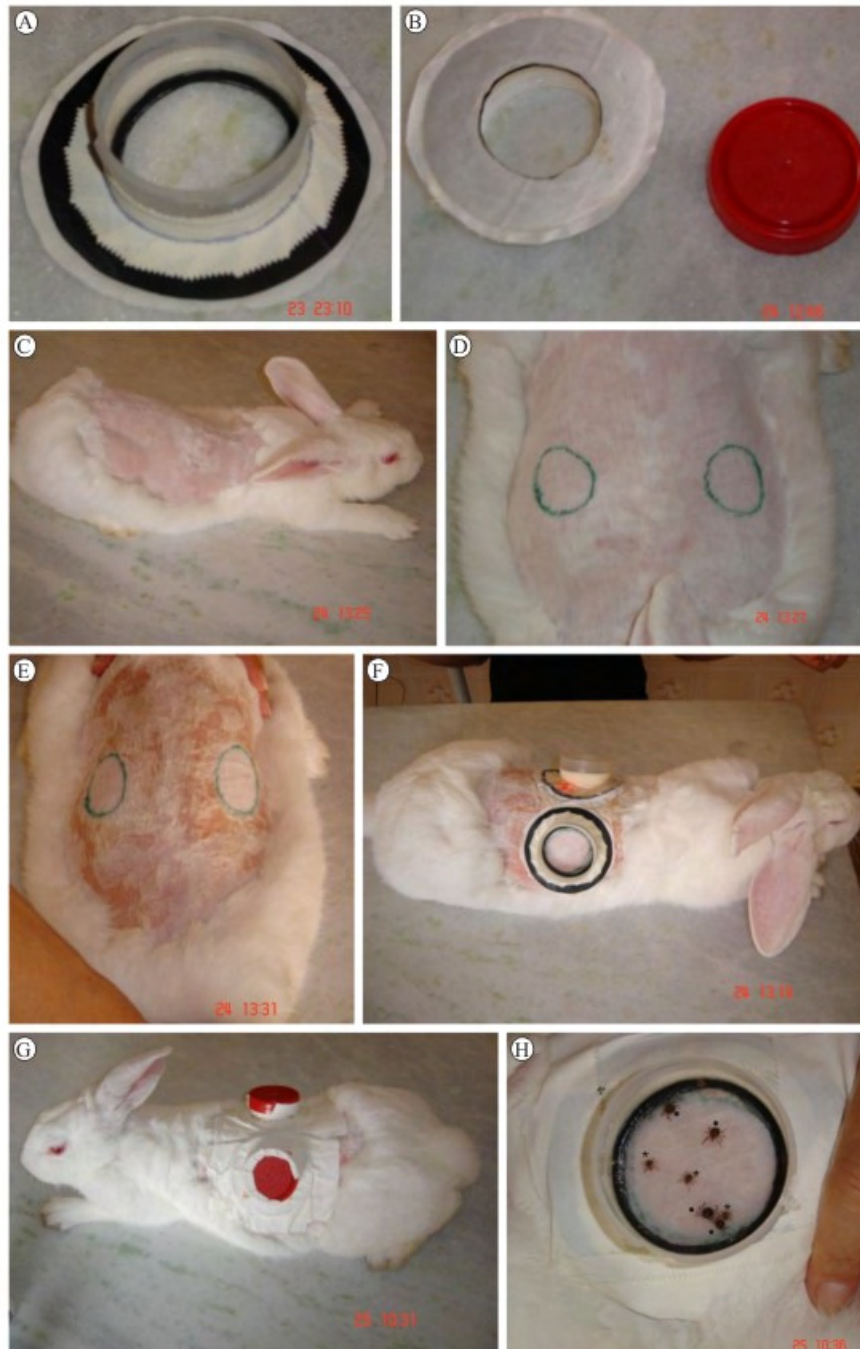
### **3.2.2. Histoquímica**

#### **3.2.2.1. Reação de PAS (Ácido Periódico- Schiff) com Contra-Coloração pelo Verde de Metila (McManus 1946)**

As glândulas salivares foram fixadas em mistura de Bouin aquoso, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, transferidas para resina de embebição, incluídas e seccionadas. A embebição e a inclusão foram efetuadas em resina Leica. As secções, com espessura de 3  $\mu$ m, foram recolhidas em lâminas de vidro, reidratadas em água destilada por 1 minuto e transferidas para solução de ácido periódico por 10 minutos. Novamente foram lavadas em água destilada por 1 minuto. Na seqüência foram colocadas, por 1 hora, no reagente de Schiff e posteriormente lavadas, por 30 minutos, em água corrente. O material foi contra-corado, por 20 segundos com verde metila, lavado, seco e montado com Bálsamo do Canadá para observação e documentação em fotomicroscópio MOTIC BA 300.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal sob protocolo nº 44/2008 – CEEA – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, SP – Brasil.

Figura 1



Seqüência de montagem e de fixação das câmaras alimentadoras nos hospedeiros. A - visão geral da parte superior da câmara alimentadora; B - visão geral da parte inferior revestida de tecido e da tampa contendo orifícios para entrada de ar; C - região dorsal do hospedeiro tosada para fixação das câmaras; D - marcação do local para colocação dos carrapatos; E - pele do hospedeiro com a cola plástica atóxica; F - fixação das câmaras; G - colocação de esparadrapo para reforçar a fixação das câmaras; H - carrapatos machos (\*) e fêmeas (•) depositados na câmara alimentadora.



## **RESULTADOS**

---

#### **4. Resultados**

Os resultados estão apresentados sob a forma de capítulos cada um com um artigo publicado ou submetido a periódico especializado na área.

Desta forma, a tese é composta por quatro capítulos apresentados pelos seguintes artigos:

##### **4.1. Capítulo 1: Necessary feeding time for the engorgement of females of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in naive and resistant rabbits.**

**Autores:** Nunes P.H., Bechara G.H., Camargo Mathias M.I.

**Periódico:** Tick and Tick-borne Diseases (Elsevier)

**Situação:** Submetido

**Necessary feeding time for the engorgement of females of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari:Ixodidae) in naive and resistant rabbits.**

**Authors:** Nunes P.H.(1), Bechara G.H.(2), Camargo Mathias M.I.(3)

**1** – Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900

**3** - Departamento de Patologia Veterinária - UNESP *campus* de Jaboticabal  
Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, Rural  
CEP. 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo- Brasil

**2** - Corresponding author

Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900,  
Fax (19) 3526-4136 / Tel. (19) 35264151  
e-mail: micm@rc.unesp.br

**RESUMO**

O contato dos carrapatos com os hospedeiros e a liberação de antígenos por meio da saliva estimula o desenvolvimento de resposta imune pelos hospedeiros. Os objetivos deste trabalho foram os de analisar o tempo de alimentação necessário para o ingurgitamento, bem como o peso atingido pelas fêmeas ingurgitadas de fêmeas de *Amblyomma cajennense* alimentadas em hospedeiros naïve e re-infestados. Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que coelhos re-infestados por *A. cajennense* aparentemente desenvolvem resistência contra os mesmos em apenas uma infestação e essa resistência é traduzida em aumento no tempo necessário para o completo ingurgitamento e redução do peso final das fêmeas ingurgitadas.

**ABSTRACT**

In tick-host relationships the inoculation of tick saliva can induce the acquisition of resistance by the host as demonstrated by alterations in several alimentary and reproductive biological parameters of the ectoparasite. This study was aimed to analyse the feeding time necessary to reach full engorgement as well the engorgement weight of *Amblyomma cajennense* tick females fed on either naïve or reinfested rabbits. The results herein obtained revealed that rabbits acquire resistance against the *A. cajennense* tick from the second infestation on as demonstrated by increase in the female feeding time to full engorgement and decrease in its engorgement weight with possible reduction in both egg mass weight and larval hatch.

**KEY-WORDS:** *Amblyomma cajennense*, rabbit, immunity, feeding time, engorgement

## INTRODUCTION

The adult ticks of *Amblyomma cajennense* species is popularly known as star tick or horse tick and their immature forms by “micuins” (species of small ticks) or “vermelhinhos” (little red ticks). They are hematophagous and need blood meal in three hosts to complete its life cycle (Flechtmann, 1985). These ticks have great health importance once they can transmit among other diseases the spotted fever, also known as Rocky Mountain fever or tick fever, zoonosis which in Brazil is caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii* (Labruna et al., 2004).

Several studies have been carried out to examine the resistance development to several tick species by different host species after successive infestations (McGowan et al., 1980; Rechav, 1992; Mukai et al., 2002a,b; Castagnolli et al., 2003; Hlatshwayo et al., 2004a,b), since the understanding of the host defense mechanism can help solving in the alternative control of these ectoparasites, which have become increasingly resistant to chemical acaricides. Moreover, the excessive use of these products can cause serious damage to the environment besides its high application cost (Utech et al., 1978; Willadsen and Jongejan, 1999).

Some studies show that the host resistance development to ticks varies according to the tick species and the considered host species (Castagnolli et al., 2003; Heller-Haupt et al., 1996; Mukai et al., 2002a,b; Hlatshwayo et al., 2004a,b, Szabó, 1995).

The resistance degree evaluation acquired by the host has been made through the analysis of biological parameters related to feeding and egg laying by females. Among these parameters feeding and pre-oviposition period can be highlighted, the final weight gained by females and conversion rate of food into eggs (Bechara et al., 1995; Castagnolli et al., 2003).

This study aimed to evaluate the necessary time to complete engorgement and final weight of *A. cajennense* females during three successive and controlled infestations in rabbits.

## MATERIAL AND METHODS

### Ticks

Adult males (180) and females (180) of the species *A. cajennense* ticks from the colony of the Department of Veterinary Pathology, FCAV-UNESP, from Jaboticabal (SP) campus had been used and maintained in laboratory under controlled conditions (29°C, 80% humidity and photoperiod of 12 hours) in Fanem BOD.

### Hosts

Six New Zealand White rabbits had been used in each infestation, adult and healthy females, weighing about 1kg, from the Central Vivarium UNESP, Botucatu campus, SP, Brazil fed with appropriate diet for the species and receiving water “ad libitum”, having an interval between infestations of 30 days.

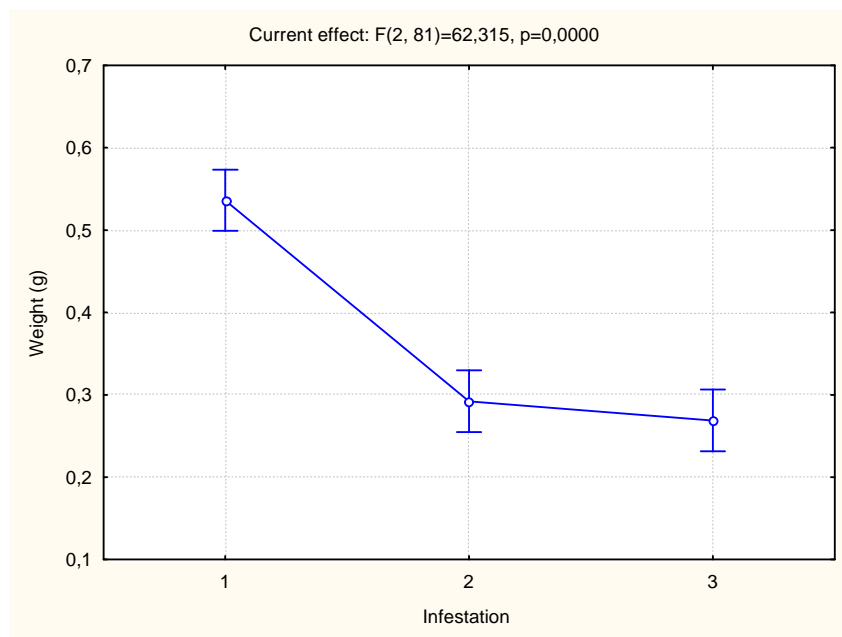
Each host had a dorsal region area shaved, where two feeding chambers specially designed for this purpose (Bechara et al., 1995) had been fixed with non toxic glue. After 24 hours of setting the camera, five *A. cajennense* couples were released inside each chamber.

The first observation was made 12 hours after the couple placement and started the following observations had been made every three hours to monitoring the tick attachment on the rabbits skin, until all the females had been fixed. Two semi-engorged females had been removed from each chamber from all the rabbits in all infestations to perform further analysis, so that the engorged female number in each chamber had been three.

Between the first infestation (control) and the two following infestations, the average power and average weight of *A. cajennense* female engorgement, had been compared. The analysis of variance (ANOVA) and *posteriori* test (Tukey test) had been done in Statistica 6.0 Software. The  $p < 0.05$  values had been considered significant.

**RESULTS:**

The results showed that the *A. cajennense* female engorgement weight had been lower ( $p < 0.05$ ) in the second and third infestations in relation to the first one (Figure 1). However, the *posteriori* tests revealed that between the second and third infestations, no difference in weight ( $p > 0.05$ ) between the second and the third engorged females (Table 1) had happened.



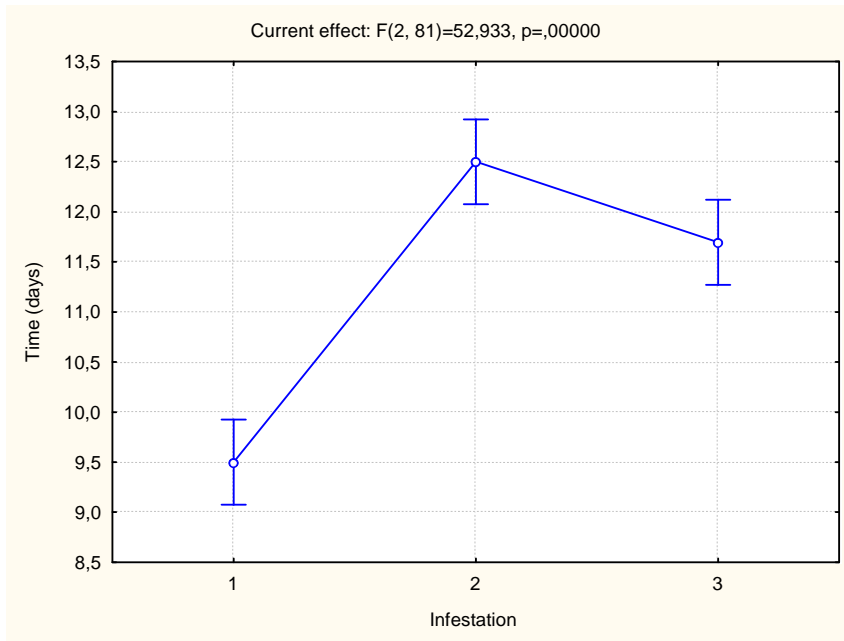
**Figure 1:** Engorgement weight of *A. cajennense* females fed in rabbits on three successive infestations at intervals of 30 days. Results demonstrated in average + standard deviation.

Infestation	1	2
2	0.000108	
3	0.000108	0.894616

**Table 1:** p-value of *posteriori* Tukey's test, comparing engorgement weight of *A. cajennense* females, in three successive infestations in rabbits.

The feed time required analysis for full engorgement of *A. cajennense* female shows that the second and third infestations such time is higher when compared with the first infestation (Figure 2), being this time shorter in the third infestation ( $p < 0.05$ ) than in the second one (Table 2).





**Figure 2:** Necessary feed time for the *A. cajennense* females to ingurgitate in three successive infestations in rabbits. Results demonstrated in average + standard deviation.

Infestation	1	2
2	0.000108	
3	0.000108	0.017319

**Table 2:** p-value of *posteriori* Tukey's test, comparing time required for *A. cajennense* females to ingurgitate, in three successive infestations in rabbits.

## DISCUSSION

The ticks are ectoparasites that can have as hosts: natural mammals, birds, reptiles or amphibians. Among the mammals, the rodents are the preferred ones (Lopes, 1998). In laboratory, several species of ticks feed on rabbits and due to it, they have been widely used in studies of their life cycle. However, what had already been observed is that rabbits can develop resistance against ticks, which cause changes in various biological parameters as in feeding process (decrease in tick number that can be fixed, weight reduction of engorged females and a longer time necessary for the engorgement), in the reproduction process (reduction in egg mass and diminishing in egg viability), depending on tick species considered (Brown, 1986).

Thus, the obtained data in this study with *Amblyomma cajennense* females showed that when they have been fixed in rabbits previously infested, unlike those fixed in naïve rabbits, feeding difficulty has been shown, such parameter measured by evaluating the engorged female weight and the time that they had been fixed in the host till the complete engorgement. The rabbits subjected to successive infestations showed resistance to ticks, demonstrated by a longer time required for engorgement and lower weight reached by engorged females. These data corroborate those of McGowan et al. (1980) for *A. maculatum* females fixed in rabbits immunized with tick extracts of the same species and those of Latif et al. (1988) for *A. variegatum* females fixed in re-infested rabbits. Using the hypersensitivity skin test induced by the extract of *A. cajennense* adult, Hlatshwayo et al. (2004a) showed that naïve rabbits develop a kind of immediate reaction while pre-sensitized animals show besides the immediate response a late-type hypersensitivity, which could be related to the resistance acquisition to these ticks.

In general, the resistance against tick development varies from one host to another. In dogs, the engorgement weight of *A. cajennense* nymphs does not change significantly even after three successive infestations (Mukai et al., 2002). In horses, *A. cajennense* nymphs show a trend, although not significant, in reducing the engorgement weight after three infestations, while donkeys show significant resistance acquisition against *A. cajennense* in all the stages of life (Castagnolli et al., 2003). Furthermore, in goats, the nymphs weight decreased significantly right after the first infestation (Monteiro and Bechara, 2008).

The data presented in this work related to the necessary time for fully feed and the engorged female weight in laboratory conditions indicate the development of resistance in

adult rabbits of the *A. cajennense* star tick after a single infestation. However, other biological parameters of the ticks should be investigated to confirm the effectiveness of such resistance.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

Gerson Mello Souza and Ronaldo Del Vecchio for technical support.

FAPESP grant n° 2007/59020-0 and CNPq grant n ° 308733/2006-1

**REFERENCES**

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, v.4, n.2, p.61-66.

BROWN, S.J., 1986. Rabbit-acquired resistance to *Amblyomma americanum* and western blot analysis of salivary gland-derived antigens. Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods : proceedings of the Vero Beach Symposium, Vero Beach, Florida. Borovsky, D.Spielman, A. (eds.).- Vero Beach, FL (USA): University of Florida-IFAS. Florida Medical Entomology Laboratory. pp. 108-113.

CASTAGNOLLI, K.C.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTANA, D.A.; DE CASTRO, M.B.; ROMANO, M.A.; SZABÓ, M.P.J., 2003. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v.117, p.271- 283.

FLECHTMANN, H. W. C., 1985. Ácaros de Importância Médico-Veterinária. Ed. Nobel, 3ª edição, 192p.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G. H. ; MBATI, P.A., 2004a. Cutaneous hypersensitivity induced in rabbits by extracts of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). Journal of the South African Veterinary Association, 75: 37-39.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G. H.; MBATI, P.A., 2004b. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari:Ixodidae). *Journal of the South African Veterinary Association*, 75: 40-42.

HELLER-HAUPT A., KAGARUKI L.K., VARMA M.G.R., 1996. Resistance and cross-resistance in rabbits to adults of three species of African ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* (20) 3: 155 – 165.

LABRUNA, M.B., 2004. Carta Acarológica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, suplemento 1, p199 – 204.

LATIF, A.A., NEWSON R. M. and DHADIALLA, T. S., 1988. Feeding performance of *Amblyomma variegatum* (Acarina: Ixodidae) fed repeatedly on rabbits. *Experimental and Applied Acarology*. V.5, 1-2 p. 83-92.

LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; RODRIGUES, Z.B.; CARVALHO, H.A.; FREITAS, C.M.V.; VIEIRA Jr., C.R., 1998. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.93, p.347-351.

MCGOWAN, M.J.; HOMER, J.T.; O'DELL, G.V.; MCNEW, R.W.; BARKER, R.W., 1980. Performance of ticks fed on rabbits inoculated with extracts derived from homogenized ticks *Amblyomma maculatum* Kock. *The Journal of Parasitology*, 66: 42-48.

MONTEIRO, G. E.; BECHARA, G.H., 2008. Cutaneous basophilia in the resistance of goats to *Amblyomma cajennense* nymphs after repeated infestations. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 221–225.

MUKAI, L. S., NETTO, A. C., SZABÓ, M. P. J., BECHARA, G. H., 2002a. Development of resistance in dogs to nymphs of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). Annals of the New York Academy of Sciences, v.969, p.180 - 183.

MUKAI, L. S., NETTO, A. C., SZABÓ, M. P. J., BECHARA, G. H., 2002b. Hypersensitivity induced in dogs by nymphal extract of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). Annals of the New York Academy of Sciences, v.969, p.184 – 186.

RECHAV, Y., 1992. Naturally acquired resistance to ticks - a global view. Ins. Sci. Appl. 13, 495–504.

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H. AND KERR, J.D., 1978. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. Australian Journal of Agricultural Research, 29: 885 – 859.

WILLADSEN, P. AND JONGEJAN, F., 1999. Immunology of the tick-host interaction and the control of tick-borne diseases. Parasitology Today 15: 258 – 262.



**4.2. Capítulo 2: Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation**

**Autores:** Pablo Henrique Nunes, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias

**Periódico:** Experimental and Applied Acarology (2008) 45:199–209

**Situação:** Publicado

**Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation.**

P.H. Nunes (1), G.H. Bechara (2), M.I. Camargo Mathias (3)

**1** – Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900

**3** - Departamento de Patologia Veterinária - UNESP *campus* de Jaboticabal  
Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, Rural  
CEP. 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo- Brasil

**2** - Corresponding author

Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900,  
Fax (19) 3526-4136 / Tel. (19) 35264151  
e-mail: micm@rc.unesp.br



**Resumo**

O presente trabalho analisou através de técnicas de histologia e histoquímica as glândulas salivares de *A. cajennense* em jejum, semi e ingurgitadas em situação de primeira infestação em coelhos. O ácino I, composto por uma célula central grande e quatro ou cinco células menores e periféricas, não apresentou alterações significativas quando comparadas fêmeas em jejum, semi e ingurgitadas. Ao contrário deste, o ácino II apresentou um aumento de tamanho quando comparadas as fêmeas em jejum e semi-ingurgitadas, principalmente devido ao aumento da produção de secreção por algumas células do tipo c. Nas fêmeas ingurgitadas algumas células ainda mantinham certa quantidade de secreção. O ácino III apresentou células contendo secreção nas fêmeas em jejum, porém naquelas semi-ingurgitadas essas células apareceram sem secreção citoplasmática, deixando o ácino com lúmen grande. No entanto, nas fêmeas Ingurgitadas o ácino III aparece com lúmen bastante reduzido. Após o ingurgitamento todos os ácinos das glândulas salivares de *A. cajennense* passaram por processo degenerativo representado aqui nas fêmeas com dois e cinco dias após o ingurgitamento.

**4.3. Capítulo 3: Secretion dynamics of the salivary gland on semi and engorged tick females *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) during the second infestation in rabbit.**

**Authors:** Nunes P.H., Bechara G.H., Camargo Mathias M.I.

**Autores:** Pablo Henrique Nunes, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias

**Periódico:** Experimental Parasitology

**Situação:** Submetido

**Secretion dynamics of the salivary gland on semi and engorged tick females *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) during the second infestation in rabbit.**

**Authors:** Nunes P.H.(1), Bechara G.H.(2), Camargo Mathias M.I.(3)

**1** – Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900

**3** - Departamento de Patologia Veterinária - UNESP *campus* de Jaboticabal  
Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, Rural  
CEP. 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo- Brasil

**2** - Corresponding author

Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro  
Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil  
CEP. 13506-900,  
Fax (19) 3526-4136 / Tel. (19) 35264151  
e-mail: micm@rc.unesp.br

**RESUMO:**

Este trabalho teve como objetivo analisar morfo-histoquímicamente a dinâmica da secreção das glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma cajennense* nos estágios semi e ingurgitado, tendo como hospedeiros coelhos previamente infestados. Os dados mostraram que o ácino I não apresentou alterações quando comparados aos das fêmeas fixadas em coelhos naive. Nos ácinos II as células **c1** apresentaram liberação mais intensa de secreção durante o período de consumo de sangue, as **c2** permaneceram ativas até o final do período de alimentação, porém sem alterações morfológicas quando comparadas as das fêmeas fixadas em coelhos naive. As demais células do ácino II apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento e de degeneração observado em fêmeas fixadas em coelhos naive. Nos ácinos III as células **d** mantiveram-se ativas durante todo o processo de alimentação e maior atividade foi observada nas fêmeas ingurgitadas, deixando clara a necessidade de haver aumento de atividade glandular em fêmeas fixadas em coelhos re-infestados uma vez que em fêmeas fixadas em coelhos naive essas células apresentaram atividade apenas no início do processo de alimentação.

**ABSTRACT:**

This study aimed to examine morpho-histochemically, the secretion dynamics of the female salivary glands on *Amblyomma cajennense* in semi and engorged stages, having as hosts rabbits previously infected. The acini I presented no changes compared to the females fixed on naive rabbits. In acini II the cells **c1** there was more intense secretion release during the blood consumption, the **c2** remained active until the food period ending, but without morphological changes when compared to the females fixed on naive rabbits. The other acini II cells presented the same development and degeneration pattern observed in females fixed on naive rabbits. In acini III the cells **d** remained active throughout the feeding process and an increased activity had been observed in engorged females, showing a necessity of increasing the glandular activity in female fixed on re-infested rabbits; such cells presented activity only at the beginning of the food process.

**Keywords:** *Amblyomma cajennense*, salivary glands, resistance, morphological changes, ixodidae.

## INTRODUCTION

The salivary glands of ticks in *Amblyomma cajennense* as in Ixodidae are in general vital organs for the biological success of this group, presenting function in the production of various components including substances related to the attachment and feeding process of them (Schumaker, Serra Freire, 1991 ).

Functionally the salivary glands have a secretory cycle also defined by specific physiological and feeding states where the ticks are, the latter characterized as unfed or in feeding process, which is marked by one activity phase and another by degeneration (Sauer and Hair, 1986).

According to literature data, ticks on stage before the food (unfed) have the salivary glands in pre-secretory phase, as the gland cells, are somewhat active. The fixation process in the host would be the stimulus for the glands to be activated and to develop, which would not happen completely until the tick start its diet (Walker et al., 1985). Thus, during the tick feeding process the salivary glands would be in fully secretory activity. After the complete feeding (in females) and the detachment from the host, the glands would come into degeneration, a process which would be completed after oviposition, remaining only the duct system besides an amorphous mass of residual tissue (Walker et al., 1985 , Till, 1961), once at this moment the salivary glands would not be necessary for the biology of ectoparasites and the female would use the food consumed in the process of vitellogenesis (Coons et al., 1989; Tarnowski and Coons, 1989).

Hosts which are either infested by ticks or artificially immunized with extracts of salivary glands, develop resistance to ectoparasites, causing decrease in engorged female weight, in egg-laying rates by adults and low egg viability (Hlatshwayo et al., 2004). The rabbits would be examples of resistance development against ticks after one infestation, which would also depend on the tick species (Brown, 1986). The resistance is shown among other factors by changes in time that the ectoparasite takes to feed and the weight gained by engorged females (Castagnolli et al., 2003), which are directly controlled by the salivary glands.

In this context, the objective of this work was to study morpho-histochemically the changes suffered by the female salivary glands of *Amblyomma cajennense* subjected, in the

laboratory, to the feeding stages of semi and fully engorged, on second infestation condition, having rabbits as hosts.

## **MATERIAL AND METHODS**

### 1 - MATERIAL

#### Ticks

To achieve the various steps, 60 females of *Amblyomma cajennense* semi, engorged and with two and five day's post-engorgement had been used. Thus, 60 unfed couples, assigned by Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, UNESP (Sao Paulo State University) Department of Veterinary Pathology Jaboticabal Campus (SP-Brazil) and obtained from the colony maintained in the laboratory under controlled conditions (29 °C, 80% humidity and photoperiod of 12 hours) in the oven chamber BOD, had been placed in the host (rabbits) to be fed.

#### Hosts

Six healthy adult rabbits (New Zealand White) from UNESP, Botucatu Campus (SP, Brazil), weighing each one about 1kg (New Zealand White), had been used in the infestations. They had been fed with appropriate diet for the species and received water "ad libitum".

In the first infestation, 10 couples of *A. cajennense* had been used in order to induce the resistance development in rabbits. After the female engorgement in the first infestation, in a 30-day-interval had happened; afterwards the second infestation had been done. Twenty four females had been removed from hosts during the feeding process. Due to standardization patterns of the experiment it had been used only females weighing between 0.018g and 0.044g, equivalent to 10% by weight of the engorged females in the second infestation (obtained in pilot infestations previously carried out). The female weight had been used as food process control, considering that the time the females remained fixed to the host would depend among other factors the consummation of copulation.

### 3 - METHODS

#### Histology

Haematoxylin of Harris-Eosin Aqueous (HE) (JUNQUEIRA, 1983).

In this study, the females had been placed in freezer (5 minutes) for anesthesia by thermal shock in the Histology Laboratory, UNESP (Sao Paulo State University) Department of Biology Rio Claro Campus –SP, Brazil. Moreover, the salivary glands had been removed in saline solution (7.5 g 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) and fixed in 4% paraformaldehyde.

Then, the material had been dehydrated in increasing alcohol concentrations and transferred to imbibitions resin where it remained for 24 hours. The inclusion was in historesin Leica (Hidrixietilmetacrilato) and the blocks containing the material had been sectioned in microtome (3 μm / section). The sections had been taken on glass slides, rehydrated in distilled water for 1 minute, stained for 10 minutes in Harris hematoxylin and kept in water for 10 minutes to react. Thus, they had been washed in water, stained with eosin for 10 minutes and again washed with water to remove the dye excess. After drying the histological slides were covered with Canada balsam and they were subsequently observed and photographed in photomicroscope MOTIC BA 300.

#### Histochemistry

PAS (periodic acid-Schiff) reaction with counter-staining by the Methyl green (McManus, 1946).

The salivary glands had been fixed in Bouin aqueous, dehydrated in increasing alcohol concentrations, transferred to imbibe resin, included and sectioned. The imbibe and the inclusion had been done on Leica resin. Sections with 3 μm thickness had been collected on glass slides, rehydrated in distilled water for 1 minute and transferred to periodic acid



solution for 10 minutes. They had been washed again in distilled water for 1 minute. In sequence they had been placed for 1 hour in Schiff's reagent and then washed for 30 minutes in running water. The material had been counter-stained for 20 seconds with methyl green, washed, dried and mounted with Canada balsam for observation on MOTIC BA 300 light microscope and subsequent photographic documentation.

This study was approved by the Ethics Committee in Animal Research Protocol under No 44/2008 - EAEC - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP, Botucatu, SP - Brasil.

## **RESULTS**

### Semi-engorged females

#### Acinus TYPE I

The acini I which has been directly connected to the common excretory duct (Figs. 1A, E) consists of a large **central** cell showing a large and rounded nucleus and smaller **peripheral** cells and with well marked homogeneous nucleus by hematoxylin (Figs . 1A, E).

The lumen of these acini, in this stage, is quite wide. It can be observed in some of their acini the pyknotic nuclei presence with irregular shape (Fig. 1A).

#### Acinus II

These acini connect to the intermediary ducts through an acinar valve (Fig. 1G). It had been observed in these acini three types of secretory cells **a**, **b** and **c**, the latter ones subdivided into **c1**, **c2**, **c3** and **c4**.

The **a** cells are small and apparently have already eliminated all the cytoplasmic content (Fig. 1B). Their nuclei are rounded and two nucleoli which in most of the time have been very evident (Fig. 1B).

The **b** cells have pyramidal shape and the secretion granules in their cytoplasm have been slightly basophilic and PAS positive (Figs. 1B, I).

The **c** cells are the ones which show the most amount of secretion granules in their cytoplasm (Figs. 1B, FI). The **c1** show cytoplasm filled with secretion granules strongly PAS positive (Figs. 1F-G). These cells nuclei are large and rounded (Figs. 1B, F). The **c2** cells are small and the cytoplasm is PAS negative. These cells show little cytoplasmic contents suggesting they might have already released all the secretion (Fig. 1F). The nuclei are rounded and show homogeneous staining (Fig. 1F). The **c3** cells have cytoplasm filled with secretion granules strongly stained by both techniques (Figs. 1B, FI). The secretion granules in the cytoplasm of these cells have different sizes, however they are larger than those of cells **c1** (Figs. 1B, FI). The nuclei of these cells is large and rounded (Figs. 1F, G, I). The **c4** cells show fine granulation and negative PAS (Fig. 1H).

#### Acinus III

In this acini only is possible to differentiate the **d** cells (Fig. 1C-D, JK), once the others do not have secretion besides being very similar among them. The **d** cells are located next to the acinar duct and show secretion granules strongly stained by eosin (Figs. 1C-D), therefore they are negative PAS (Figs. 1J-K). The nuclei of these cells are rounded and present clear nucleoli (Figs. 1J-K).

#### Engorged females

##### Acinus I

The engorged female acini I are similar to those of semi-engorged with a large **central** cell with rounded nucleus and evident nucleoli (Figs. 2A, K) and the **peripheral** cells are smaller. However, the **central** cell shows now cytoplasm slightly stained by eosin, different from those found in semi-engorged female acini I (Figs 2A, K).

##### Acinus II

In engorged female acini II the cells **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3** and **c4** have also been distinguished.

The **a** cells have a reduced size compared to other from this acini. The cytoplasm of these cells apparently does not contain secretion granules (Figs. 2C, E). The **b** cells have large amounts of slightly basophilic secretion (Figs. 2D-E) and positive PAS (Fig. 2I). The nuclei of these cells are rounded and strongly stained with hematoxylin (Figs. 2D-E, I). The **c1** cells

have large amounts of secretion granules in the cytoplasm (Figs. 2B-C, E, H), however some of them have very vacuolated cytoplasm (Figs. 2D, H). The **c2** cells of engorged females, as the ones semi engorged are small and show negative cytoplasm to the PAS (Figs. 2B, H). The **c3** cells show cytoplasm filled with secretion granules (Figs. 2C, E, and HJ). The secretion granules in the cytoplasm of these cells are larger than those in cells **c1** (Fig. 2C, J). The **c4** cells have cytoplasm with fine granulation and slightly stained by hematoxylin (Figs. 2D-E) but negative PAS (Fig. 2I).

### Acinus III

In the acini III the only cells which were identified had been the **d** cells (Figs. 2F-G). These cells are bigger when compared to those found in semi-engorged females due to the secretion accumulation (Figs. 2F-G). The secretion granules in the cytoplasm of these cells are large and show strongly stained by eosin (Figs. 2F-G). The other acini cells do not show granulation in the cytoplasm, what makes difficult their identification, however, the hypertrophy of them causes the lumen of the acini becomes significantly reduced (Figs. 2F-G).

### Females with 2 days post engorgement

#### Acinus I

In the females with 2 days post engorgement, the acini I show very similar to those found in engorged females (Fig. 2K). The central cytoplasm of the cell is weakly stained by eosin (Fig. 2K), different from that observed in semi-engorged females (Fig. 1).

#### Acinus II

The acini II cells of females with 2 days post engorgement have irregular shape, very vacuolated and pyknotic nuclei (Figs. 2L, M, O). For this reason it is not possible to identify the most of the other cell types except the type **c3**.

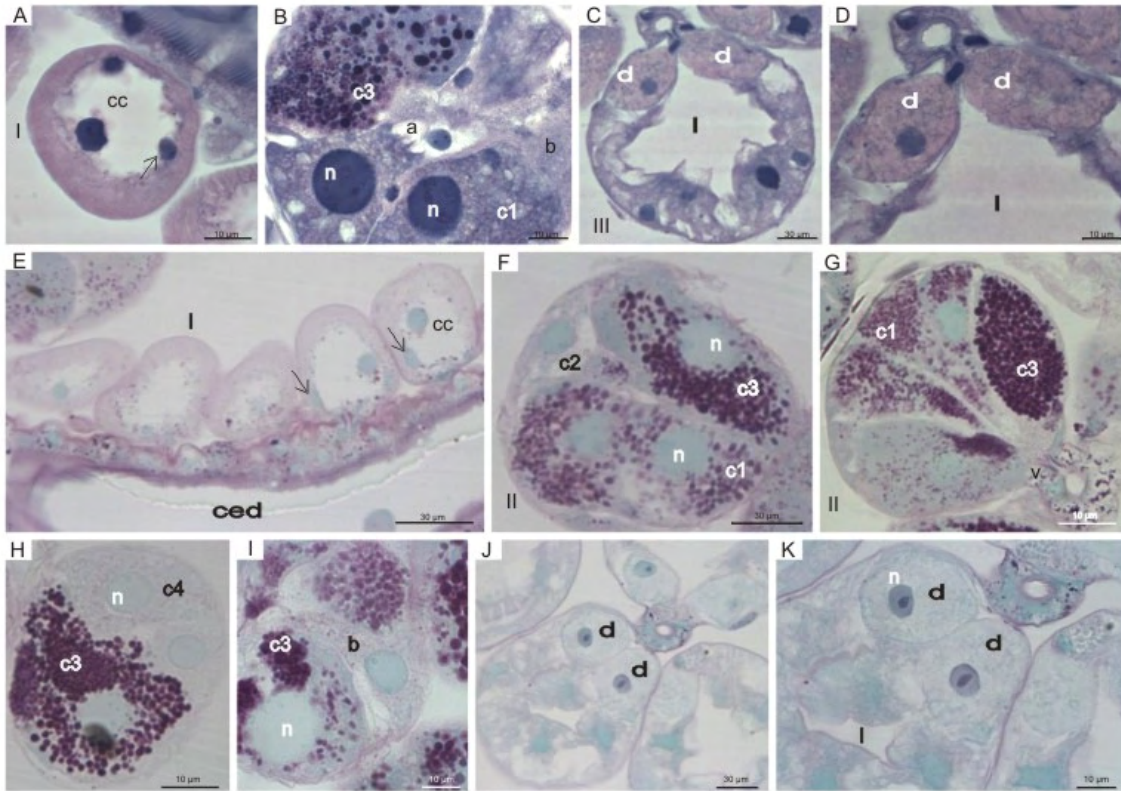
#### Acinus III

As the cells in acini II, the acini III cells show irregular shape and pyknotic nuclei (Figs. 2N, P). These cells show fairly vacuolated cytoplasm and without secretion, which prevents that the identification of each cell could be made.

#### Females with 5 days post engorgement

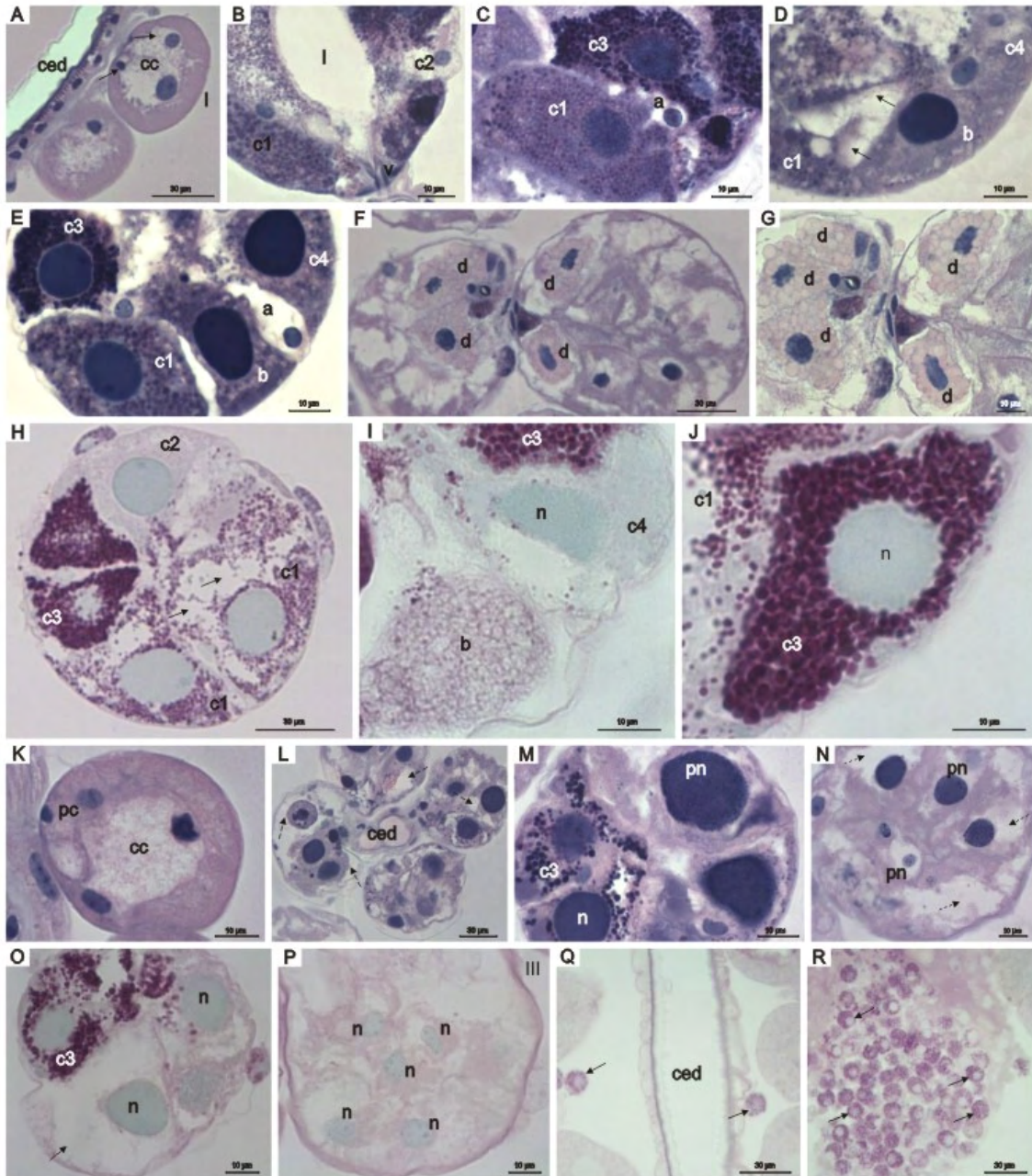
In the females with 5 days post engorgement the salivary gland has already been in very advanced process of degeneration (Figs. 2Q-R). The acini can not be identified, however can be seeing the presence of many apoptotic bodies (Figs. 2Q-R) and the glandular ducts (Fig. 2Q).

## 1



**Fig. 1** Histological sections of the salivary glands of partially engorged *Amblyomma cajennense* females. (A and E) Type I (I) acini showing central cell (cc), peripheral cells (arrows) and common excretory duct (ced). Staining: A – hematoxylin-eosin, E – PAS-methyl green; (B, F, G, H and I) Type II (II) acini showing cells **a** (a), **b** (b), **c1** (c1), **c2** (c2), **c3** (c3) and **c4** (c4) Staining: B – hematoxylin-eosin, F, G, H and I - PAS-methyl green; n = nucleus, v = acinar valve; (C, D, J and K) Type III (III) acini showing cells **d** (d); Staining: C, D – hematoxylin-eosin, J, K – PAS-methyl green; n = nucleus l = lumen

## 2



**Fig. 2** Histological sections of the salivary glands of engorged *Amblyomma cajennense* females (A-J); two days post-engorgement (K - P) and five days post-engorgement (Q, R). (A) Type I (I) acini showing central cell (cc), peripheral cells (arrows) and common excretory duct (ced). Staining: hematoxylin-eosin; (B, C, D, E, H, I, J, L, M, O) Type II (II) acini showing cells a (a), b (b), c1 (c1), c2 (c2), c3 (c3), c4 (c4), spaces without secretion (→) and vacuolated cells (•••▶). Staining: B, C, D, E, L, M – hematoxylin-eosin, H, I, J, O - PAS-methyl green; n = nucleus, l = lumen, ced = common excretory duct, pn = picnotic nucleus; (F, G, N, P) Type III (III) acini with very reduced lumen and cells d (d) with secretion; Staining: F, G, N – hematoxylin-eosin, P – PAS-methyl green; n = nucleus; (Q, R) Overview of salivary glands with type I (I), II (II) and III (III) acini undergoing degeneration in addition to the presence of many apoptotic bodies (arrows), ced = common excretory duct; Staining: - PAS-methyl green.

## DISCUSSION

This study showed the results from the female salivary glands of *Amblyomma cajennense* fixed in re-infested rabbits with the occurrence of small morphological differences in these organs when compared to that observed in females of these ectoparasites fixed in naive rabbits.

The acini I of the female salivary glands studied showed no significant changes during the feeding period, corroborating Nunes et al. (2008) for females of *A. cajennense* fixed in naive rabbits. This probably had been occurred due to the fact that the acini type I would not develop essential functions in the feeding process. Several authors in other studies reported that the salivary glands acini type I from several other species of Ixodidae, act in its osmotic control, as well as in the water capitation, either when it was outside the host or during the feeding (Rudolph & Knulle 1974/78; Sauer and Hair 1986; Grigorieva and Amosova 2009).

This study set clearly that in general the acini II of females fixed in re-infested rabbits are morphologically similar to those found in naive females fixed in rabbits described by Nunes et al. (2008). The same types of cells, i.e. **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3** and **c4** had been found here, where the **a** cells either in the semi-engorged engorged females showed or in the engorged practically did not present granule secretion in the cytoplasm, such result could be explained by the fact that the cells would be active mainly in the beginning of the food process. Some authors suggested that the cells would be involved mainly in the formation of the cement cone (Nunes et al. 2008, Nunes et al. 2006, Binnington 1978), structure of extreme importance for setting the ticks to the hosts and therefore, after ectoparasites attachment on hosts, these cells would lose their function, once after fixed on the host the females only loose themselves after the engorgement. The salivary glands studied here had been obtained from females in semi and engorged feeding stages which had already been fixed in the host.

The **b** cells of acini II of females examined here remained active until the total engorgement, showing that the secretion production is required during the entire blood consumption period. Walker et al. (1985) has previously suggested that the secretion produced by the salivary glands **b** cells of *R. appendiculatus* had been related to the manipulation of the host immune response and therefore would be required throughout the blood consumption period. The results obtained here corroborate these authors, because the

salivary glands **b** cells of female fixed in re-infested rabbits had been found active in both semi and engorged ones.

Regarding **c1** cells, they presented a development during the whole blood consumption process and remained active until the end of it and only after that start showing the first degeneration signs. In the engorged females, the **c1** cells showed cytoplasmic spaces absent of secretion (vacuolated) suggesting that almost all the secretion produced had been released until the end of the food process. These data differ from those found by Nunes et al. (2008) for females fixed in naive rabbits. In these engorged females' **c1** cells the cytoplasm had still been shown filled with secretion. Walker and Fletcher (1989) also observed a significant increase in size and amount of secretion in the salivary glands **c1** cells of female *R. appendiculatus* semi engorged fixed in resistant rabbits. The data therefore suggested a greater consumption of secretion produced by the **c1** cells when the ticks had been fed on resistant hosts.

The **c2** cells analyzed here showed reduced size in relation to **c** subtypes and little secretion in the cytoplasm, either in half females or in engorged ones, suggesting that they probably do not answer to the host resistance with the secretion increase. However, the fact that these cells remain still active in the engorged females might be an evidence that they would still be necessary in engorged females, unlike the females fixed in naive rabbits where **c2** cells had not been observed in engorged females (NUNES et al. 2008). According to Walker and Fletcher (1989) there would not be significant difference in the **c2** cell structure of *R. appendiculatus* female fixed in resistant rabbits when compared with those determined in naive rabbits. Although in *A. cajennense* evident structural changes in **c2** cells had not been observed; data obtained here have suggested an extension in activity time of these cells when the females had been fed on re-infested rabbits.

The fixed female **c3** cells in re-infested rabbits apparently did not show morphological changes when compared with those of individuals fed on naive rabbits. Such cells had cytoplasm filled with secretion granules either in the semi or in engorged females, corroborating data from Nunes et al. (2008) for females fixed in naive rabbits. Thus, the data suggest that there would be no response from the **c3** cells to the resistance developed by rabbits. The same morphological behavior had been observed in **c4** cells which in the same way of the **c3** cells showed no changes.



This study when examined the acini III, showed secretion only in **d** cells of semi and engorged females. Furthermore, it was shown that the **d** cells might show significant increase either in its size or in the amount of cytoplasmic secretion granules when compared the semi with the engorged ones. These data differ from those found by Nunes et al. (2008) for females of *A.cajennense* fixed in naïve rabbits. According to the authors the **d** cells would present little secretion in semi-engorged females and little or no secretion in engorged females, suggesting therefore a response of the **d** cells in the resistance development by the host. These data differed from those described by Walker and Fletcher (1989) for females of *R. appendiculatus* fixed in resistant rabbits, which reported that all acini III cells would play the osmoregulation role after the attachment of the ticks on the hosts. However, the results obtained here show that the **d** cells still retain their secretory activity until the feeding period had been finished, while the others acini III cells would play osmoregulation activity, because they showed an increase in its cytoplasmic volume and lack of secretion responsible for the decrease in the acini lumen diameter which became extremely low, corroborating findings of other authors (Binnington, 1978; Kaufman and Sauer, 1983, Walker et al., 1985; Fawcet et al., 1986; L'Amoreaux and Coons, 1986 and Sonenshine, 1991).

Once the *A. cajennense females* finish the engorgement process, two days after the salivary glands began to show the occurrence of degeneration and, during five days after the engorgement; only the glandular ducts, using the cellular folds (cytoplasmic mass besides many apoptotic bodies), could be observed; making impossible to identify the cell types.

**ACKNOWLEDGMENTS:**

Gerson Mello Souza and Ronaldo Del Vecchio for technical support.

FAPESP grant No 2007/59020-0 and CNPq grant n ° 308733/2006-1

**REFERENCES**

BINNINGTON, K.C. (1978). Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *International Journal on Parasitology*, 8: 97-115.

BROWN, S.J., 1986. Rabbit-acquired resistance to *Amblyomma americanum* and western blot analysis of salivary gland-derived antigens. Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods : proceedings of the Vero Beach symposium, Vero Beach, Florida. Borovsky, D.Spielman, A. (eds.).- Vero Beach, FL (USA): University of Florida-IFAS. Florida Medical Entomology Laboratory. pp. 108-113.

CASTAGNOLLI, K.C.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTANA, D.A.; DE CASTRO, M.B.; ROMANO, M.A.; SZABÓ, M.P.J., 2003. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.117, p.271- 283, 2003.

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

COONS, L.B.; L'AMOREAUX, W.J., 1986. Developmental changes in the salivary glands of male and female *Dermacentor variabilis* (Say) during feeding. In: Borovsky D, Spielman A (eds) Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods, vol 2. University of Florida-IFAS, Vero Beach, pp 86–92.

FAWCETT, D.W.; BINNINGTON, K.; VOIGT, W.P., 1986. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: sauer JR, Hair JA (eds) Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. Ellis Horwood Ltd, Chichester, Great Britain, pp 23–45.

GRIGORIEVA, L.A. AND AMOSOVA, L.I., 2008. Morphological changes of salivary glands os female ixodid ticks of subfamilies Ixidinae and Amblyomminae (Acari: Ixodidae) during feeding and their significance. Journal of Biochemistry and Physiology 44 (6), pp.662 – 635.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.P.; BECHARA, G.H.; MBATI, P.A., 2004. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari:Ixodidae). J. S. Afr. Vet. Assoc. 75(1) pp. 40-2.

JUNQUEIRA, L.C.U. & JUNQUEIRA, L.M.M. S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos. pp.48-81.

KAUFMAN, R.; SAUER, J.R., 1983. Ion and water balance in feeding ticks; mechanisms of tick excretion. In: Obenchain FD, Galun RL (eds) Physiology of ticks. Pergamon Press Ltd, New York, pp 213–44.

MCMANUS, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158:202.

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

NUNES, P.H.; CAMARGO MATHIAS, M.I.; BECHARA, G.H., 2008. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. *Experimental and Applied Acarology* 45, pp. 199–209.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W., 1974. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature* 149: 84 – 85.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W., 1978. Uptake of water vapour from air: process, site, and mechanism in ticks. In: *Comparative physiology: water, ions and fluid mechanics* (K. Schimdt-Nielsen, L. Bolio & S.H. P. Maddrell, eds.), Cambridge University Press. pp. 97 – 113.

SAUER, J.R.; HAIR, J.A., 1986. *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*. Ellis Horwood, 509p.

SCHUMAKER, T.T.; SERRA FREIRE, N.M., 1991. Histologia das glândulas salivares de adultos de *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 (Ixodoidea, Argasidae) em jejum, em alimentação e alimentados. *Revista Brasileira de Entomologia*, 35, pp. 49-72.

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

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

TILL, W.M., 1961. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Memoirs of Entomological Society of South Africa* 6:1–124.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D.; GILL, H.S., 1985. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal on Parasitology*, pp. 81-100.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D., 1989. *Rhipicephalus appendiculatus* feeding on rabbits and cattle: Salivary gland responses to varying host resistance. *Experimental and Applied Acarology*, 8 pp. 285 – 290.



**4.4. Capítulo 4: Secretory process of salivary glands of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) female ticks fed on resistant rabbits.**

**Autores:** Pablo Henrique Nunes, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias

**Periódico:** Veterinary Parasitology

**Situação:** Submetido

---

*Pablo Henrique Nunes*

**RESUMO**

Os carrapatos em geral possuem grande importância econômica e sanitária. Animais infestados tem redução na produção de leite e de carne, e além disso, seu combate representa altos custos para os produtores. Enquanto se alimentam, os carrapatos podem transmitir uma grande quantidade de patógenos, entre eles a *Rickettsia rickettsii* causadora da “febre maculosa” ou “febre das montanhas”. Sabe-se que animais infestados por carrapatos ou imunizados artificialmente com extratos de glândulas salivares desenvolvem resistência que resulta entre outros fatores em uma diminuição no peso das fêmeas ingurgitadas, na postura de ovos pelos adultos, na baixa viabilidade dos ovos e em alguns casos na redução da capacidade de transmissão de patógenos. Este trabalho teve como objetivo analisar morfo-histoquimicamente as glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma cajennense* semi e ingurgitadas, alimentadas em coelhos resistentes. Os ácinos **I** não apresentaram alterações em comparação com aqueles das fêmeas alimentadas em coelhos naive. As células **c** dos ácinos **II** apresentaram sinais de degeneração precoce, o que pode resultar em diminuição da eficiência alimentar. No ácino **III** as células **d** estenderam o tempo de atividade, fato que estaria associado ao aumento do tempo de fixação das fêmeas que se alimentaram em hospedeiros resistentes.



**Secretory process of salivary glands of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, (Acari: Ixodidae) female ticks fed on resistant rabbits.**

**Authors:** Nunes P.H.(1), Bechara G.H.(2), Camargo Mathias M.I.(3)

**1** – Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro

Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil

CEP. 13506-900

**2** - Departamento de Patologia Veterinária - UNESP *campus* de Jaboticabal

Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, Rural

CEP. 14884-900 - Jaboticabal, São Paulo- Brasil

**3** - Corresponding author

Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Instituto de Biociências - UNESP *campus* de Rio Claro

Av. 24 A nº 1515 Bela Vista, Rio Claro, São Paulo- Brazil

CEP. 13506-900,

Fax (19) 3526-4136 / Tel. (19) 35264151

e-mail: micm@rc.unesp.br

**Abstract**

The ticks in general have great economic and health importance since infested animals have the milk and meat production reduced, and furthermore, causing high costs for the producers in its control. While feeding, the ticks can transmit a large amount of pathogens, including *Rickettsia rickettsii* responsible for the "spotted fever" or "mountains fever." It is known that animals infested by ticks or artificially immunized with their own salivary gland extracts, develop resistance resulting among other factors in an engorged female weight decrease, in the egg-laying by adults, in the low egg viability and in some cases the transmission capacity of pathogens reduction. This study aimed to examine morpho-histochemically the female salivary glands of *Amblyomma cajennense* semi and engorged, fed on resistant rabbits. The acini I had no changes compared with those of females fed on naive rabbits. The c cells of acini II showed signs of early degeneration, which may result in feed efficiency decrease. In acini III d cells the activity time had been longer; such occurrence had been associated with the time of female fixation which increased whose females had been fed on resistant hosts.

**Keywords:** *Amblyomma cajennense*, salivary glands, resistance, morphological changes.

## Introduction

Adult ticks *Amblyomma cajennense* species are popularly known as star tick, horse tick or “rodoleiro” and their immature forms by “micuins”. To complete their life cycle these ectoparasites require blood meals from three hosts (Flechtmann, 1985). Such tick species has sanitary importance; once it can transmitte several diseases like spotted fever, also known as "Mountains fever," "tick fever", "black fever" or "blue disease" caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*.

The salivary glands, in *A. cajennense*, as well as in other ixodid ticks considered vital organs to their biological success, since presenting a great diversity of functions relating primarily to the various components production which allow the ectoparasite attachment and feeding on their hosts (Schumaker and Serra-Freire , 1991, Szabó, 1995).

Some studies, which had already been made by other authors, showed that the host resistance development to ticks would get variation according to tick species and hosts (Heller-Haupt et al., 1996; Castagnolli et al., 2003).

Thus, numerous studies have been performed to evaluate the tick resistance process of several species, submitted to different hosts after successive infestations. Understanding the mechanisms of host defense could provide information that would solve a serious problem in combating the ticks, which are becoming increasingly resistant to the acaricides. Moreover, the acaricides excessive use, especially from chemical substances, besides having a high cost, they have also caused serious damage to the environment and to man (Utech et al. 1978; Willadsen and Jongejan, 1999).

Scholars Heller-Haupt et al. (1996) concluded that *A. hebraeum* tick species could induce rabbits to the resistance with only one infestation such resistance also spread to other species such as *A. variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus*. According to Brown (1988), *A. americanum* tick species have already induced resistance in rabbits in the first infestation. Other studies show that inoculated rabbits with salivary gland extracts of *A. cajennense* would develop hypersensitivity (Hlatshwayo, 2004) and this development would be related to the resistance level acquired by the hosts (Willadsen et al., 1978).

Studies that evaluate the resistance degree acquired by the host have been performed through the biological parameter analysis related to feeding and egg laying by ectoparasites females. Among these factors, the relationship between female weight and their egg mass weight, as well the final weight reached by females and the whole feeding time (Castagnolli et al., 2003).

In a general way and by the exposed above, it is little still known about the effects that the resistance could cause in the ticks fed in resistant hosts. Thus having the important function of salivary glands in the processes of feeding tick process, as well as the lack of data on the ectoparasite/host resistance relationship, this study aimed, by using the morpho-histochemical techniques show the changes suffered by *A. cajennense* female salivary gland cells subjected to semi and engorged feeding periods in resistant rabbits.

## **Material and Methods**

### **1- Material**

#### **Ticks**

To achieve the various stages of this work 60 *Amblyomma cajennense* semi, and engorged females had been used with two and five days after engorgement. Thus, 60 unfed couples, given by Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, UNESP Department of Veterinary Pathology, Jabotical (SP) Brazil campus and obtained from the colony maintained in the laboratory under controlled conditions (29 °C, 80% humidity and photoperiod of 12 hours) in BOD oven chamber, had been deposited in the host (rabbits) to be fed.

#### **Hosts**

In the infestations, six healthy adult rabbits (New Zealand White) had been used, weighing about 1 kg each, from the UNESP Central vivarium, Botucatu campus (SP, Brazil), fed with appropriate diet for the species and receiving “ad libitum” water.

Two infestations had been done where 10 *A. cajennense* couples had been used in order to induce the rabbit resistance development. The interval between infestations was 30 days. Twenty four females had been removed from their hosts during the feeding process. For the experiment standardization purposes, only females of ectoparasites had been used weighing between 0.016g and 0.040, equivalent to 10% of the engorged female weight at the third infestation (obtained in previously conducted pilot infestations). The female weight had been used as feeding process control, once the time that females remained fixed to the host would depend on, among other factors, the copulation consummation.

## 2. Methods

### Histology

#### **Staining by Hematoxylin-Eosin Aqueous Harris (HE) (JUNQUEIRA, 1983).**

*Amblyomma. cajennense* females had been placed in freezers (5 minutes) for thermal shock anesthesia, in the Histology Laboratory of Biology Department, UNESP Rio Claro-SP Brazil. In sequence, their salivary glands had been removed in saline (7.5 g NaCl + 2.38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1000 mL of distilled water) and set in 4% paraformaldehyde.

Then the material was dehydrated in increasing alcohol concentrations and transferred to resin, remaining for 24 hours. Inclusion was in historesin Leica (Hidrixietilmetacrilato) and blocks containing the material were sectioned in microtome (3 μm/section). The sections were collected on glass slides, rehydrated in distilled water for 1 minute, stained for 10 minutes in Harris hematoxylin and kept in water for 10 minutes to react. Moreover they were washed in water, stained with eosin for 10 minutes and washed again with water to remove the dye excess. After histological slides had been set with Canada balsam, afterwards they had been observed and photographed in a MOTIC BA 300 photomicroscope.

### Histochemistry

#### **PAS reaction (periodic acid-Schiff) Counter-staining by the Methyl Green (McManus 1946)**

The salivary glands were fixed in Bouin's aqueous mixture, dehydrated in increasing concentrations of alcohol, transferred to resin included and sectioned. The inclusion was submitted in Leica resin. The sections with a 3 μm thickness were collected on glass slides,

rehydrated in distilled water for 1 minute and transferred to periodic acid solution for 10 minutes. They were washed again in distilled water for 1 minute. In the sequence they were placed for 1 hour in Schiff's reagent and then washed for 30 minutes in running water. The material was counter-stained for 20 seconds with methyl green, washed, dried and mounted with Canada balsam for observation and documentation in MOTIC BA 300 photomicroscope.

This study was approved by the Animal Research Ethics Committee, protocol No. 44/2008 - EAEC - Faculty of Veterinary Medicine - UNESP, Botucatu, SP - Brazil.

## **Results**

### **Semi-Engorged Females**

#### **Acini I**

The type I acini is presented intact, with rounded shape, where its **central** cell is observed larger than the other **peripheral** ones and minor as well as their respective nuclei (Fig. 1A).

#### **Acini II**

The type II acini are the cells **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3** and **c4** (Figs. 1C-D, FI). Cells **b**, **c1**, **c2** and **c3** have a large amount of secretion in the cytoplasm (Figs. 1C, F, H-I). Some cells of acini have large vacuolated areas, mainly the cells **c1** and **c4** (Figs. 1G-I). The nuclei of cells **c** in general have, mostly dispersed chromatin and heterogeneous staining (Figs. 1C-D, FG). An irregular shape in the nuclei (Figs. 1F, G) had been often observed.

#### **Acini III**

The type III acini have intact cells and enlarged lumen (Figs. 1B, E, J). The only cells with activity characteristic are the cells **d** due to large amount of secretion present in the cytoplasm (Figs. 1B, E, J). The nuclei of cells **d** is slightly rounded with granular chromatin (Fig. 1E).

### **Engorged Females**

#### **Acini I**



The type I acini in engorged females have similar characteristics to those found in semi-engorged females where the large **central** cells had been observed and with rounded nuclei. However, unlike the ones found in semi-engorged females, it was observed in these nuclei that the chromatin presents condensed and located peripherally, close to the nuclear envelope (Fig. 2A).

### **Acini II**

In the engorged female acini II, only the cells **c** (**c1**, **c2**, **c3**, **c4**) (Figs. 2B-G, I) had been observed. The **c1** and **c3** have a large amount of cytoplasmic secretion granules (Figs. 2B, DF). In all cell subtypes has also been observed the presence of large vacuoles in the cytoplasm (Figs. 2B-C, E, G, I). Another cell feature of the engorged female acini II is the presence of highly irregular cell boundaries, where in many situations the cell begins to retract and separate from adjacent cells (Figs. 2B-F, I), as observed in semi-engorged females, the acini II nuclei cells of those engorged females exhibit condensed chromatin and with granular aspect (Figs. 2B-F). In some cases it is observed that the nuclear envelope is broken (Figs. 2B-C).

### **Acini III**

The engorged female acini III unlike those in the semi-engorged have extremely reduced lumen due to cell **e** and **f** hypertrophy (Figs. 2J-K). The **d** cells, as well as in semi-engorged females, have a large amount of secretion in the cytoplasm (Figs. 2H, JK). The nuclei of these cells still presents heterogeneous staining due to granulation (Fig.2K) and in some cases the nuclear envelope is broken (Fig. 2H).

**Females with 2 days post engorgement****Acini I**

The female acini I with 2 days post engorgement begins to show characteristics of degeneration, and among them the shape changes from round to irregular (Fig. 2L). Both the central cells and the peripheral ones have picnotic and irregular nuclei (Fig. 2L).

**Acini II**

In the female acini II, with 2 days post engorgement, more advanced features of the degeneration process have already been possible to observe. The acini, generally present quite irregular shape (Figs. 2M-N, PQ), with its cells fully vacuolated (Figs. 2N, PQ). Many cells seems to have their limit broken in a way that releases their content which mix with the adjacent cells also disrupted, thus hindering the identification of each cell type (Figs. 2M-N, PQ).

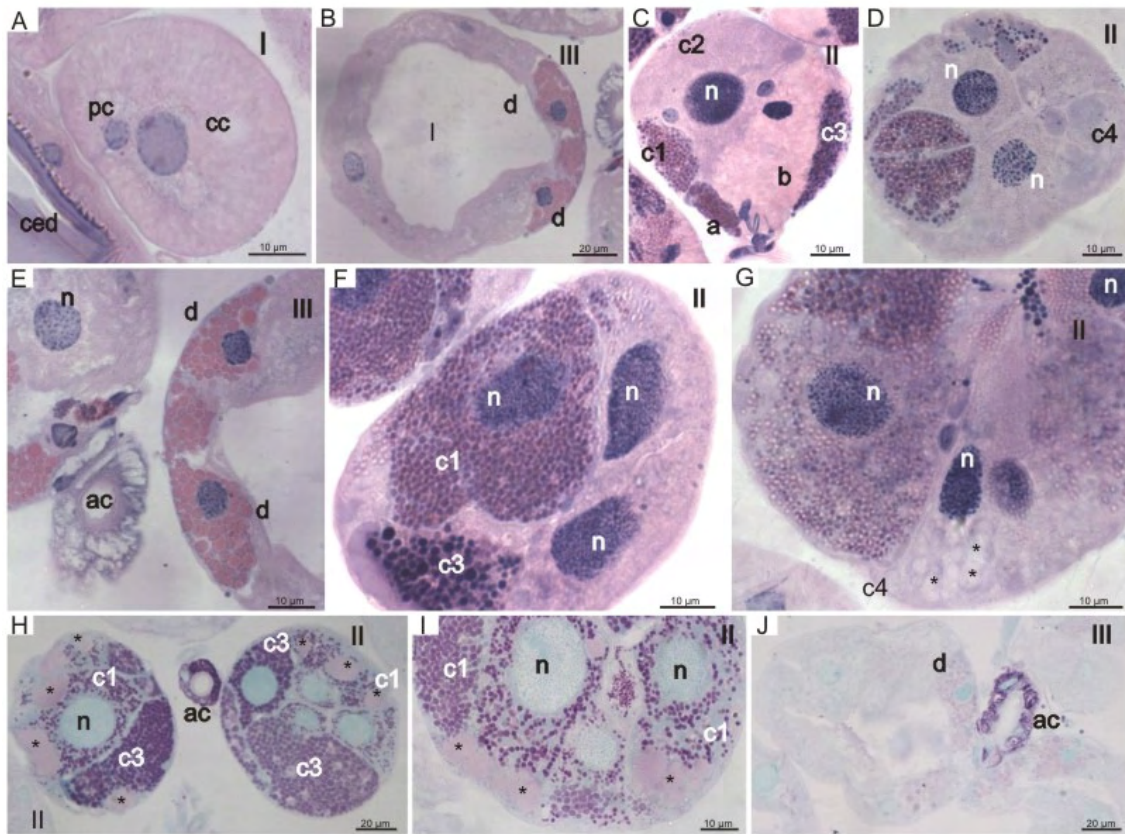
**Acini III**

The female acini III, with 2 days post engorgement, have cells without secretion granules in the cytoplasm. The lumen of these acini is greatly reduced due to wide cell hypertrophy (Fig. 2). In many acini the cell boundaries and nuclei are no longer observed, due to the advanced degeneration process stage (Fig. 2R)

**Females with 5 days post engorgement**

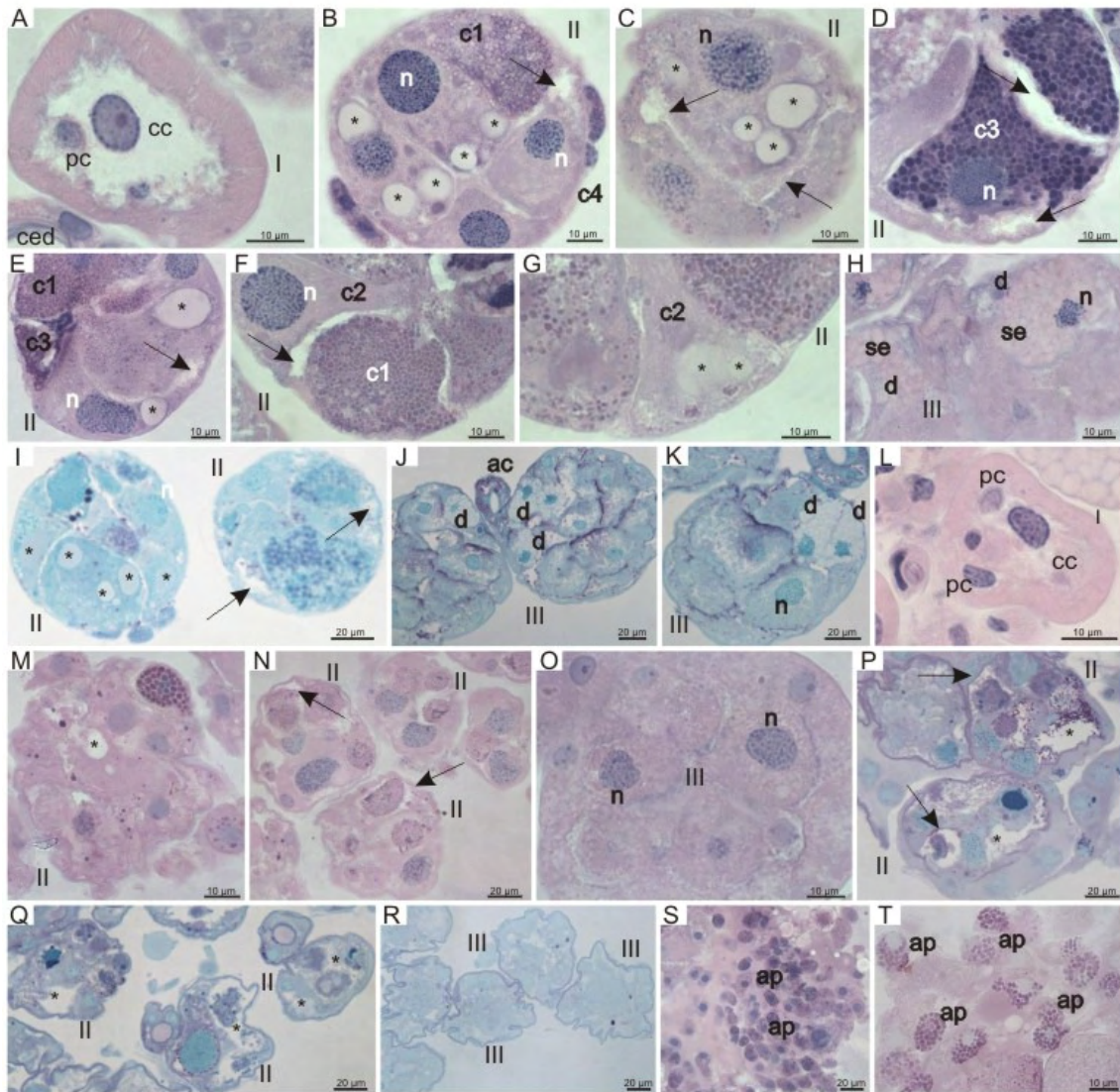
In these females the salivary gland has already been completely degenerated and the acini identification is no longer possible to be done (Figs. 2S-T).

## 1



**Fig. 1** Histological sections of the salivary glands of partially engorged *Amblyomma cajennense* females. (A) Type I (I) acini showing central cell (cc), peripheral cells (pc) and common excretory duct (ced). Staining: A – hematoxylin-eosin, (C,D, F, G, H and I) Type II (II) acini showing cells **a** (a), **b** (b), **c1** (c1), **c2** (c2), **c3** (c3) and **c4** (c4) Staining: C, D, F, G – hematoxylin-eosin, H, I - PAS-methyl green; n = nucleus, \* = vacuoles ; (B, E and J) Type III (III) acini showing cells **d** (d); Staining: B, E – hematoxylin-eosin, J – PAS-methyl green; n = nucleus l = lumen; ac = acinar duct

## 2



**Fig. 2** Histological sections of the salivary glands of engorged *Amblyomma cajennense* females (A - K); two days post-engorgement (L - N) and five days post-engorgement (O, P). (A, L) Type I (I) acini showing central cell (cc), peripheral cells (pc) and common excretory duct (ced). Staining: hematoxylin-eosin; (B, C, D, E, F, G, I, M, N, P, Q) Type II (II) acini showing cells **c1** (c1), **c2** (c2), **c3** (c3), **c4** (c4), large vacuoles(\*) and irregular boundaries of cells (arrows). Staining: B, C, D, E, F, G, M, N – hematoxylin-eosin, I, P, Q - PAS-methyl green; n = nucleus, (H, J, K, O, R) Type III (III) acini with very reduced lumen and cells **d** (d) with secretion (se); Staining: H, O – hematoxylin-eosin, J, K, R – PAS-methyl green; n = nucleus, ac = acinar duct; (S, T) Overview of salivary glands with I (I), II (II) and III (III) acini undergoing degeneration in addition to the presence of many apoptotic bodies (ap); Staining: S- hematoxylin-eosin, T - PAS-methyl green.

**Discussion**

The results obtained in this study showed that the *Amblyomma cajennense* female salivary glands are deeply affected by the resistance developed by the hosts. The morphological features observed in these female salivary glands fixed on resistant hosts showed differences when compared with literature data for the salivary glands of same species individuals set in naïve rabbits (Nunes et al., 2008), as well as when compared to data obtained from other Ixodidae species. It was shown here that cells of the female acini type II and III fixed on resistant rabbits show changes in their integrity, defined from the cytoplasm, nucleus and the cell limit appearance, both in semi engorged females and in engorged ones.

The acini I cells showed no changes when comparing to semi and engorged female cells. Structurally, these acini were with similar appearance to those ones described by Nunes et al. (2008) for females fixed on naïve rabbits. The data found in the literature showed that acini I of the ixodid salivary glands in general would have the function to perform the parasite osmotic control, as well they would be related to the water obtaining by them (Rudolph & Knulle, 1974/78; Sauer and Hair, 1986; Amosova and Grigorieva, 2009). In individuals analyzed in this study, these acini did not show changes caused by the resistance development of the hosts, once they have no relation with the secretion production necessary for different feeding stages.

The female acini II cells analyzed in this work showed small damage in their integrity when compared to those described by Nunes et al. (2008) for *A. cajennense* female fixed on naïve rabbits. In the semi-engorged females it had been observed that in general c cells were the most affected by the resistance developed by the hosts since they showed large vacuolated areas and the presence of irregular nuclei and condensed chromatin, Nunes et al. (2008) observed previously that in *A. cajennense* females fed on naïve rabbits cells c would be completely intact, showing that the resistance dramatically influenced in the cell integrity

observed in this study. These data corroborate what has been described by Jittapalapong et al. (2008) who observed that the acini II of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* female salivary glands fixed in cattle immunized with salivary gland extract (TSGE) would have the c cells as the most affected ones. According to these authors c cells would have mainly damage as: a) vacuolation, b) irregularity in the cell limits, and c) plasma membrane disruption. The same authors had also pointed out that in this case the low efficiency in obtaining food and less pathogen transmission ability by the ectoparasitic fixed in resistant hosts could be associated with the observed damage in the salivary glands. Thus, it can be inferred here that the same has been occurring related to the rabbits infested successively by *A. cajennense*, emphasizing that several other studies reported the occurrence of several host resistance to *A. cajennense*, resulting in low efficiency in the feeding process (Borges et al., 2002).

In a general view, studies found in the literature have shown that different tick species have also different responses to the resistance development by the hosts. Walker & Fletcher (1989) observed that acini II c cells of the *R. appendiculatus* salivary glands fixed in cattle immunized with salivary gland extracts (TSGE) showed no differences compared to those ones from the control group. However, the same author described that the female acini II c cells of *R. appendiculatus*, which had also been fixed in immunized rabbits with salivary gland extracts (TSGE), had been hypertrophied and with larger amount of cytoplasmic secretion than those from the control group. These data differed from those obtained here, since the acini II c cells of salivary glands studied here suffered structural damage, thus corroborating Jittapalapong et al. (2008) for *R. appendiculatus*.

Besides the damage to the acini II c cells, the antibodies effects from resistant hosts, had also included the acceleration in degeneration process of these acini cells. This fact became evident when compared to the *A. cajennense* salivary glands studied here with those

ones described by Nunes et al. (2008) for females fixed in naïve rabbits. It had been observed a more advanced degeneration stage in the results obtained here for both females either engorged or with 2 days post engorgement. In these female acini II, the cellular limits could no longer be observed; there was an increase in cytoplasm vacuolation as well in piknotic of nuclei when compared with females fixed in naïve rabbits (Nunes et al., 2008).

The *A. cajennense* acini III had also been influenced by the host resistance. In their cells, in females fixed on naïve rabbits (Nunes et al., 2008), the cytoplasmic secretion presence had not been observed. However, the results showed that the **d** cells were active and with a large amount of secretion in both the cytoplasm either in semi or engorged females. Some authors reported that the acini III cells would present active only in the early feeding period and suggested that they could be involved in the cement cone formation (Walker et al. 1985; Fawcett et al., 1986). The data obtained here suggested that the female acini III **d** cells of *A. cajennense* fixed in resistant rabbits showed longer activity than those females fixed in naïve rabbits; this change could be related to the necessity of a longer time for completion the tick feeding process when fixed in resistant hosts. These results, however disagree from those obtained by Jittapalapong to female salivary glands of *R. appendiculatus* fixed in rabbits immunized with salivary gland extracts (TSGE), where the acini III cells, mainly the **f** cells, with necrosis characteristics.

Other female acini III cells studied here have not changed, once they followed the same secretion dynamics reported by other authors and confirming that after the beginning of the food process they would become an important role in the ectoparasite osmoregulation (Walker & Fletcher, 1985; Binnington, 1978, Kaufman and Sauer 1983, Walker et al., 1985; Fawcett et al., 1986; Coons and L'Amoreaux, 1986; Sonenshine, 1991).



This study demonstrated that the *A. cajennense* salivary glands would be directly affected by host resistance, a fact evidenced by the injuries observed mainly in **c** cell (including their subtypes) of semi and engorged female acini II, understanding by the acceleration of cell degeneration process and the increase in the activity period of acini III **d** cells.

ACKNOWLEDGMENTS: Gerson Mello Souza and Ronaldo Del Vecchio for technical support.

To FAPESP grant n° 2007/59020-0 and to CNPq grant n° 308733/2006 – 1.

**References**

BINNINGTON, K.C., 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *International Journal on Parasitology*, 8: 97-115.

BORGES, L.M.F., OLIVEIRA, P.R., LISBOA, C.L.M., RIBEIRO, M.F.B., 2002. Horse resistance to natural infestation os *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterynary Parasitology* 104: 265 – 273.

BROWN, S.J., 1986. Rabbit-acquired resistance to *Amblyomma americanum* and western blot analysis of salivary gland-derived antigens. Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods : proceedings of the Vero Beach symposium, Vero Beach, Florida. Borovsky, D.Spielman, A. (eds.)- Vero Beach, FL (USA): University of Forida-IFAS. Florida Medical Entomology Laboratory. pp. 108-113.

CASTAGNOLLI, K.C., FIGUEIREDO, L.B., SANTANA, D.A., DE CASTRO, M.B., ROMANO, M.A., SZABÓ, M.P.J., 2003. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.117, p.271- 283.

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

FAWCETT, D.W., BINNINGTON, K., VOIGT, W.P., 1986. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: sauer JR, Hair JA (eds) *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, Great Britain, pp 23–45.

FLECHTMANN, H.W.C., 1985. *Ácaros de Importância Médico-Veterinária*. Ed. Nobel, 3ª edição, 192p.

GRIGORIEVA, L.A. AND AMOSOVA, L.I., 2008. Morphofunctional changes of salivary glands of female ixodid ticks of subfamilies Ixodinae and Amblyomminae (Acari: Ixodidae) during feeding and their significance. *Journal of Biochemistry and Physiology* 44 (6), pp.662 – 635.

HELLER-HAUPT, A., KAGARUKI, L.K., VARMA, M.G.R., 1996. Resistance and cross-resistance in rabbits to adults of three species of African ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* (20) 3: 155 – 165.

HLATSHWAYO, M., SZABÓ, M.P., BECHARA, G.H., MBATI, P.A., 2004. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *A. hebraeum* (Acari:Ixodidae). J. S. Afr. Vet. Assoc. 75(1) pp. 40-2.

JITTAPALAPONG, S., THANMAPORN, P., CHANPHAO, H., WORAWUT, R., STICH, R.W., 2008. Immunization with Tick Salivary Gland Extracts: Impact on Salivary Gland Ultrastructure in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Collected from Immunized Naturally Infested Cattle. Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 1149, Number 1, December 2008 , pp. 200-204(5).

JUNQUEIRA, L.C.U. & JUNQUEIRA, L.M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos. pp.48-81.

KAUFMAN, R., SAUER, J.R., 1983. Ion and water balance in feeding ticks; mechanisms of tick excretion. In: Obenchain FD, Galun RL (eds) Physiology of ticks. Pergamon Press Ltd, New York, pp 213-44.

MCMANUS, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158:202.

MONTEIRO, G.E., BECHARA, G.H., 2008. Cutaneous basophilia in the resistance of goats to *Amblyomma cajennense* nymphs after repeated infestations. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 221–225.

NUNES, P.H., CAMARGO-MATHIAS, M.I., BECHARA, G.H., 2008. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) in different feeding stages on rabbits at first infestation. *Experimental and Applied Acarology* 45, pp. 199–209.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W., 1974. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature* 149: 84 – 85.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W., 1978. Uptake of water vapour from air: process, site, and mechanism in ticks. In: *Comparative physiology: water, ions and fluid mechanics* (K. Schimdt-Nielsen, L. Bolio & S.H. P. Maddrell, eds.), Cambridge University Press. pp. 97 – 113.

SAUER, J.R., HAIR, J.A., 1986. *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks*. Ellis Horwood, 509p.

SCHUMAKER, T.T., SERRA-FREIRE, N.M., 1991. Histologia das glândulas salivares de adultos de *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 (Ixodoidea, Argasidae) em jejum, em alimentação e alimentados. *Revista Brasileira de Entomologia*, 35, pp. 49-72.

SONENSHINE, D.E., 1991. *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York, USA.

UTECH, K.B.W., WHARTON, R.H. AND KERR, J.D., 1978. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 885 – 859.

WALKER, A.R., FLETCHER, J.D., GILL, H.S., 1985. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal for Parasitology*, pp. 81-100.

WILLADSEN, P., AND JONGEJAN, F., 1999. Immunology of the tick-host interaction and the control of tick-borne diseases. *Parasitology Today* 15: 258 – 262.

WILLADSEN, P., ROBERTS, J.A., KERR, J.D., 1978. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *International Journal of Parasitology* 8: 89 – 95.



**Fluxograma de infestações sucessivas por *Amblyomma cajennense* em coelhos, mostrando nestes, por meio de alterações morfológicas nas glândulas salivares dos ectoparasitas, o desenvolvimento de resistência.**



Resistência do hospedeiro

**SI** – Histologia e Histoquímica das glândulas salivares das fêmeas semi-ingurgitadas

**CI** - Histologia e Histoquímica das glândulas salivares das fêmeas completamente ingurgitadas

**I, II, III** = Tipos de ácinos glandulares

**a, b, c (c1, c2, c3, c4), d, e, f** = células presentes nos respectivos ácinos

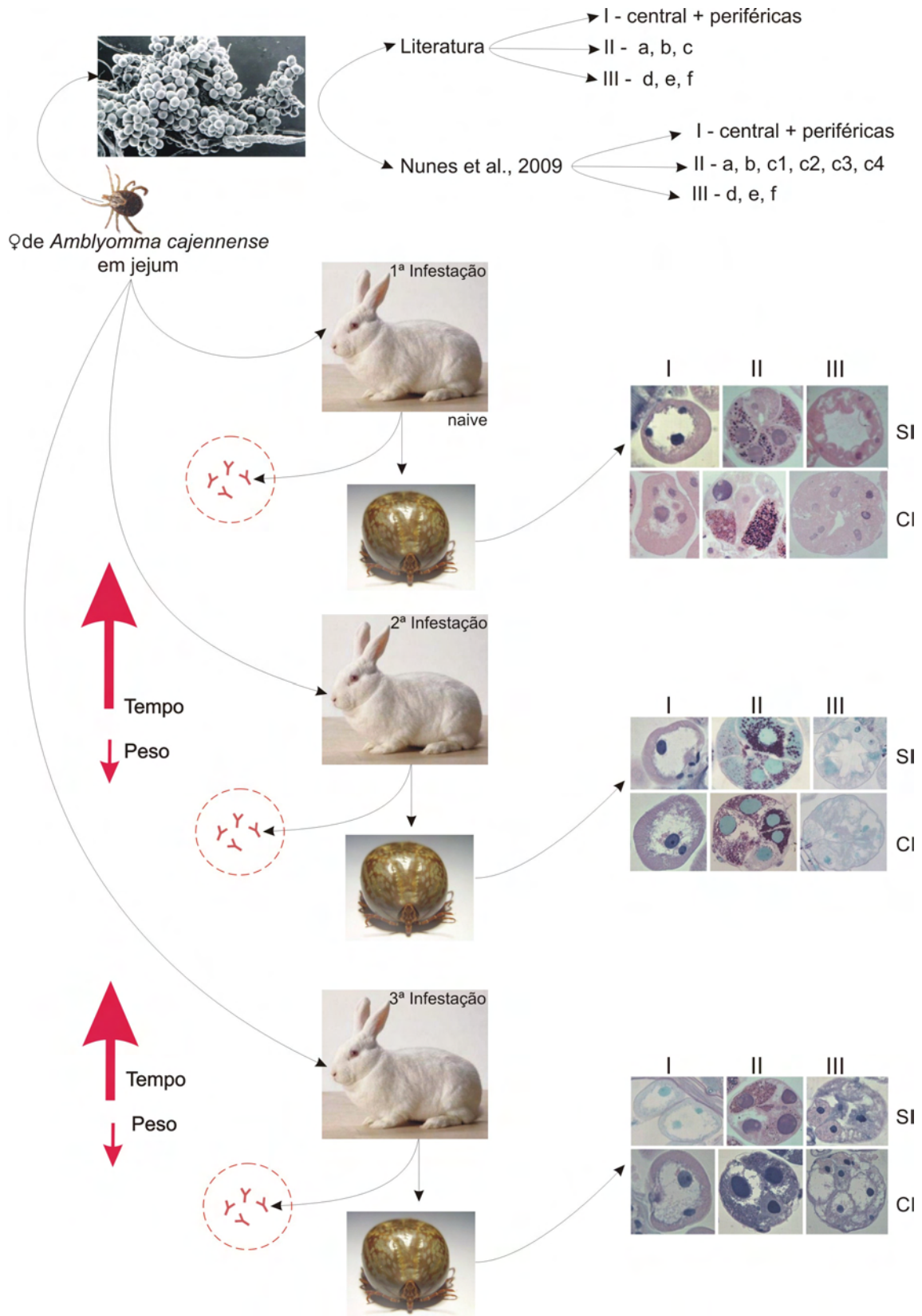


**Tempo** - Aumento do tempo necessário para o completo ingurgitamento das fêmeas



**Peso** – Redução do peso atingido pelas fêmeas ingurgitadas







## **DISCUSSÃO GERAL**

---

## 5. Discussão Geral

Os carrapatos são ectoparasitas que podem ter como hospedeiros naturais mamíferos, aves, répteis ou anfíbios, sendo que, dentre os mamíferos, os roedores são os preferenciais (LOPES et al., 1998). Em laboratório, muitos carrapatos alimentam-se bem em coelhos e por isso estes são amplamente utilizados em estudos do ciclo de vida de carrapatos. No entanto, o que já foi observado é que coelhos podem desenvolver resistência contra os carrapatos, o que acarreta alterações em vários parâmetros biológicos desses parasitas, como: no processo alimentar (diminuição na quantidade de carrapatos que conseguem se fixar, diminuição do peso das fêmeas ingurgitadas e maior tempo necessário para o ingurgitamento), no processo de reprodução (redução da massa de ovos e diminuição da viabilidade dos ovos), isso dependendo da espécie de carrapato considerada (BROWN, 1986).

Diante dessas informações, os dados obtidos no presente trabalho, com fêmeas de *Amblyomma cajennense* mostraram que estas, quando fixadas em coelhos previamente infestados, ao contrário daquelas fixadas em coelhos naive, apresentam dificuldade em se alimentar, parâmetro esse que foi medido pela avaliação do peso das fêmeas ingurgitadas e do tempo em que as mesmas ficaram fixadas no hospedeiro até o completo ingurgitamento. Os coelhos submetidos a sucessivas infestações apresentaram resistência aos carrapatos, traduzida num maior tempo necessário para o ingurgitamento e no menor peso atingido pelas fêmeas ingurgitadas, corroborando McGowan et al. (1980) para fêmeas de *A. maculatum* fixadas em coelhos imunizados com extratos de carrapatos da mesma espécie, Latif et al. (1988) para fêmeas de *A. variegatum*, fixadas em coelhos reinfestados por carrapatos da mesma espécie e Hlatshwayo et al. (2004) que, utilizando o teste cutâneo de hipersensibilidade ao extrato de *A. cajennense*, sugeriram que coelhos pré-sensibilizados desenvolveriam resistência contra esses carrapatos.

O desenvolvimento de resistência contra carrapatos, de forma geral, varia de um hospedeiro para outro. Em cães, o peso de ingurgitamento de ninfas de *A. cajennense* não se altera significativamente, mesmo após três infestações (MUKAI et al., 2002). Em cavalos, ninfas de *A. cajennense* apresentam apenas uma tendência não significativa em diminuir o peso após três infestações. No entanto experimentos com jumentos mostraram resistência significativa contra *A. cajennense* em todos os estágios de vida (CASTAGNOLLI et al., 2003)

e, finalmente, em cabras, o peso das ninfas diminuiu significativamente, já após a primeira infestação (MONTEIRO e BECHARA, 2008).

As glândulas salivares são importantes órgãos para o sucesso biológico dos carrapatos e, portanto, quando afetadas, podem comprometer a viabilidade dos mesmos. Em fêmeas de *A. cajennense*, submetidas às situações de jejum, semi-ingurgitadas e ingurgitadas, bem como fixadas em coelhos naive, as glândulas salivares apresentaram dinâmica de atividade e de degeneração semelhante ao observado em outros Ixodídeos nestas mesmas condições (BINNINGTON, 1978; WALKER et al., 1985; NUNES et al., 2006; FURQUIM, 2007).

A análise no presente trabalho de ácinos I de fêmeas fixadas em coelhos naive mostrou ausência de alterações entre os indivíduos, em períodos de jejum e de ingurgitamento completo, corroborando o que foi observado por Binnington (1978) e Nunes et al. (2006) para fêmeas de *Boophilus microplus* e por Walker et al. (1985) para *Rhipicephalus appendiculatus*. Esses resultados, no entanto, diferiram daqueles encontrados por Baker et al. (1984) e Needham & Coons (1984), autores que observaram aumento expressivo no diâmetro dos ácinos I de *A. americanum* em início de alimentação. Durante o período de alimentação dos carrapatos nos seus hospedeiros, as glândulas salivares retiram da hemolinfa o excesso de água e de íons oriundos do sangue ingerido e os devolvem para o hospedeiro possibilitando, assim que haja maior concentração do sangue ingerido, com conseqüente diminuição de volume (WALKER et al., 1985; FAWCETT et al., 1986). Os ácinos I das glândulas salivares dos ixodídeos em geral, segundo sua morfologia, teriam papel no controle osmótico e na obtenção de água pelos carrapatos (RUDOLPH & KNULLE, 1974/78; SAUER, 1977; KAUFMAN & SAUER, 1983; SAUER and HAIR, 1986; GRIGORIEVA e AMOSOVA, 2009). Os dados obtidos para fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos resistentes corroboraram essas informações, visto que esses ácinos não apresentaram alterações e indicando que os mesmos não participam dos eventos que envolvem os processos de alimentação.

As fêmeas de *A. cajennense* que se fixaram em coelhos naive mostraram que os ácinos II e III (granulares) apresentaram, ao contrário dos agranulares (I), alterações significativas, quando comparadas glândulas salivares de indivíduos em jejum, semi e ingurgitados.

No ácino II, foram observadas as células **a**, **b** e **c**, sendo o tipo **c**, nas fêmeas em jejum de *A. cajennense*, subdividido nos subtipos **c1**, **c2** e **c4**, os quais estão sendo aqui descritos

pela primeira vez. Quando analisadas as fêmeas semi e ingurgitadas, as células **a** tiveram menor tamanho e menor quantidade de secreção comparadas àquelas das fêmeas em jejum, indicando que, provavelmente, essas não atuam no processo de consumo de sangue. A ausência de alterações na célula **a** dos ácinos II também foi observada nas fêmeas de *A. cajennense* quando fixadas em coelhos resistentes, comparadas às fêmeas fixadas em coelhos naive. A explicação para a ausência de alterações observada seria a de que, provavelmente, as células **a** estariam mais ativas no início do processo de alimentação para a formação do cone de cimento (BINNINGTON, 1978; NUNES et al., 2006) e, portanto, naquelas fêmeas já fixadas e no estágio semi-ingurgitado, essas células já estariam inativas, resultados que sugeririam ainda que as células **a** não sofreriam efeitos do desenvolvimento de resistência pelos hospedeiros.

Quanto às células **b** dos ácinos II de *A. cajennense* fixadas tanto em coelhos naive quanto nos resistentes e nos estágios de semi e ingurgitadas, não sofreram alterações morfológicas durante o processo de alimentação, corroborando dados de Binnington (1978) para as glândulas salivares de *B. microplus* e contrariando os que foram descritos por Walker et al. (1985) para as glândulas salivares de *R. appendiculatus* nas quais, as células **b**, embora observadas em indivíduos em jejum, bem como em todos os outros estágios de alimentação, estariam mais ativas nas fases iniciais do processo. Os dados aqui obtidos mostraram que a secreção das células **b** seria necessária durante todo o período de consumo de sangue, o que poderia ser explicado pelo fato de a secreção por elas produzida estar relacionada com a manipulação das respostas imune do hospedeiro (WALKER et al., 1985).

Ainda nos ácinos II de fêmeas em jejum, as células **c1**, além de pouco freqüentes, também continham pequena quantidade de grânulos de secreção no citoplasma. No entanto, aquelas fixadas em coelhos naive, tanto semi como ingurgitadas apresentaram citoplasma repleto de grânulos de secreção, corroborando dados obtidos por Binnington (1978) e por Furquim (2007) os quais registraram que as células **c1**, além de presentes nas glândulas das fêmeas em jejum, permaneceriam ativas durante todo o período de alimentação das mesmas. No entanto Walker et al. (1985) revelaram que, embora não fossem observadas células **c1** nas fêmeas de *R. appendiculatus* em jejum no início do período de alimentação, elas estariam repletas e, na fase final do processo, apenas algumas dessas células conteriam secreção.

Quanto à função desempenhada pelas células **c1**, ainda existem divergências entre os diversos autores, porém é a elas atribuída função envolvida na manipulação das respostas do

hospedeiro (WALKER et al.,1985) e ainda, segundo Sonenshine (1991), células do grupo **c** produziram substâncias que atuariam como anticoagulantes, explicando portanto, a necessidade de estarem presentes e permanecerem ativas durante todo o período de alimentação.

O subtipo celular **c2** nas fêmeas de *A. cajennense* em jejum continha secreção e, à medida que o período de alimentação em coelhos naive progrediu, essas se tornaram hipertrofiadas, diferentemente do observado por Binnington (1978) e por Furquim (2007), que mostraram que a atividade dessas células teria início somente depois da fixação dos carrapatos nos hospedeiros, quando o período de alimentação já tivesse iniciado, havendo, a partir daí, um aumento moderado da quantidade de grânulos secretores.

No presente estudo com fêmeas em jejum, ao contrário dos subtipos **c1**, **c2** e **c4**, aquele **c3** não foi observado, diferentemente do relatado por Binnington (1978) e por Furquim (2007), que encontraram células **c3** nas fêmeas em jejum de *B. microplus* e *R. sanguineus* respectivamente. No entanto, em fêmeas de *A. cajennense*, tanto semi como ingurgitadas e fixadas em coelhos naive, as células **c3** estiveram presentes. Segundo Binnington (1978) e Furquim (2007), essas células provavelmente atuariam de forma mais geral no processo de alimentação dos carrapatos, papel que deve ser também desempenhado pelas fêmeas em questão e, além disso, sugere-se aqui um possível envolvimento dessas na ingestão de sangue, por isso não sendo observadas nos indivíduos em jejum.

As células **c4**, que segundo Binnington (1978), teriam a função de produzir enzimas, apresentaram nas fêmeas de *A. cajennense* em jejum, pouca secreção citoplasmática que aumentou naquelas em fase de alimentação em coelhos naive, e que diminuiu nas ingurgitadas, corroborando Binnington (1978).

O presente trabalho, quando analisou fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos resistentes, mostrou que a maioria das células **c** foram afetadas, visto que as mesmas apresentaram grandes áreas citoplasmáticas vacuolizadas, além da presença de núcleos irregulares e com cromatina condensada, características essas que foram mais acentuadas nas fêmeas de terceira infestação, mostrando que, neste caso, a resistência foi mais intensa. Corroborando essa informação, observou-se que nas fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos naive as células **c** apresentaram-se íntegras. Os dados aqui apresentados confirmaram ainda aqueles de Jittapalpong et al. (2008) que observaram que, no ácido II de fêmeas de *R.*

(*Boophilus microplus*) fixadas em bovinos imunizados com extrato de glândulas salivares (TSGE), as mais afetadas foram as células **c**, e segundo eles, os danos mais evidentes foram vacuolização no citoplasma, irregularidades nos limites celulares e ruptura das membranas.

A literatura tem mostrado que diferentes espécies de carrapatos respondem também de forma diferente ao desenvolvimento da resistência pelos hospedeiros. Walker & Fletcher (1989) observaram em *R. appendiculatus* fixados em bovinos e imunizados com extratos de glândulas salivares (TSGE) que as células **c** do ácino II não apresentaram alterações, quando comparadas àquelas do grupo controle. No entanto os mesmos autores descreveram que as células **c** daquelas fêmeas fixadas em coelhos também imunizados com extratos de glândulas salivares (TSGE) apresentaram hipertrofia com conseqüente maior quantidade de secreção, quando comparadas àquelas do grupo controle. Esses dados diferiram daqueles obtidos neste trabalho, visto que as células **c** dos ácinos II de *A. cajennense* sofreram danos estruturais semelhantes àqueles relatados por Jittapalapong et al. (2008) para *R.(Boophilus) microplus*.

Além de causar danos às células **c** de *A. cajennense*, a resistência dos hospedeiros acelerou o processo de degeneração dos ácinos II, fato que ficou evidente nas fêmeas submetidas à terceira infestação, quando comparadas às fixadas em coelhos naive. As glândulas salivares das fêmeas ingurgitadas e com dois dias pós-ingurgitamento, fixadas em coelhos resistentes, mostraram grau de degeneração mais avançado no qual se observou a perda dos limites celulares, maior vacuolização citoplasmática e maior grau de picnose nos núcleos, quando comparados àqueles das fêmeas fixadas em coelhos naive.

Nos ácinos III das fêmeas em jejum de *A. cajennense*, foram observados os tipos celulares **d**, **e** e **f**, sendo que os dois primeiros apresentaram grande quantidade, enquanto o último apresentou pouca secreção citoplasmática. Nas fêmeas semi-ingurgitadas fixadas em coelhos naive, esses ácinos apresentaram lúmen dilatado e os três tipos celulares que, além do tamanho reduzido, ainda não apresentaram secreção citoplasmática, corroborando Binnington (1978), Walker et al. (1985), Fawcett et al. (1986) e Furquim (2007). No entanto, Binnington (1978) observou que as células **d** e **e** eliminariam seus grânulos de secreção apenas no final do período de alimentação, diferentemente dos dados relatados pelos demais autores, que observaram que essas células estariam envolvidas na produção dos componentes do cimento e, portanto, estariam ativas apenas no início do processo de alimentação. Em *A. cajennense*, objeto do presente estudo, as células **d** e **e** juntamente com as **a** do ácino II estariam ativas no momento da formação do cone de cimento e, depois disso, as mesmas se tornariam inativas,



estado esse confirmado pela ausência de secreção citoplasmática nas células dos ácinos de fêmeas semi-ingurgitadas.

Ainda nos ácinos III das fêmeas de *A. cajennense* em jejum, as células **f** continham pouca secreção, corroborando Binnington (1978) e discordando de Furquim (2007), visto que esta última autora observou, nas fêmeas de *R. sanguineus* com dois dias de alimentação, a presença de secreção e, naquelas com quatro dias de alimentação, essas células já tinham liberado todos os seus grânulos. De acordo com Binnington (1978), Kaufman and Sauer (1983), Walker et al. (1985), Fawcett et al. (1986), Coons and L'Amoreaux (1986) e Sonenshine (1991), as células **f** apresentariam atividade secretora somente nos estágios iniciais de alimentação, passando a ter posteriormente função osmorreguladora. Nos ácinos III das fêmeas de *A. cajennense*, estudadas, as células **f** provavelmente teriam a mesma fisiologia, visto que, mesmo após terem eliminado os seus grânulos de secreção, elas sofreram hipertrofia.

Ácinos III de fêmeas de *A. cajennense* semi e ingurgitadas, fixadas em coelhos resistentes, apresentaram secreção apenas nas células **d**. No entanto, quando se compararam as fêmeas semi e ingurgitadas, observou-se hipertrofia e maior quantidade de secreção nas ingurgitadas. Esses dados foram diferentes daqueles encontrados nas fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos naive. Nessas, as células **d** apresentaram pouca secreção nas fêmeas semi-ingurgitadas e nenhuma nas ingurgitadas. Houve, portanto, resposta das células **d** à resistência oferecida pelo hospedeiro, o que contrariou dados de Walker e Fletcher (1989). Alguns autores ainda descreveram que as células do ácino III apresentar-se-iam ativas, apenas no início do período de alimentação, e sugeriram que as mesmas estariam envolvidas na formação do cone de cimento (WALKER et al., 1985; FAWCET et al., 1986). Ainda, segundo estes autores, todas as células do ácino III passariam, depois da formação do cone de cimento, a desempenhar papel osmorregulador. Nos resultados aqui obtidos, para fêmeas fixadas em hospedeiros resistentes, as células **d** mantiveram a sua função secretora até o final da alimentação, enquanto os outros tipos celulares do ácino III passaram a desempenhar atividade osmorreguladora, ressaltando que as células **e** e **f** hipertrofiaram, além de ser notória a ausência de secreção, o que deixou o lúmen do ácino extremamente reduzido, corroborando Binnington (1978), Kaufman e Sauer (1983), Walker et al. (1985), Fawcett et al. (1986), Coons e L'Amoreaux (1986) e Sonenshine (1991). Os dados obtidos sugeriram que as células **d** dos ácinos III de fêmeas fixadas em coelhos resistentes apresentaram tempo de atividade

aumentado, o que implicou a necessidade de tempo maior no período de alimentação. Esses resultados diferiram daqueles encontrados por Jittapalpong para glândulas salivares de fêmeas de *R. (Boophilus) microplus* fixadas em coelhos imunizados com extratos de glândulas salivares (TSGE). Nessas, principalmente as células **f** do ácino III apresentaram características de necrose.

As glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos naïve, a partir de segundo dia pós-ingurgitamento, começaram a mostrar os primeiros sinais de degeneração. Naquelas com cinco dias pós-ingurgitamento, as glândulas já se encontravam completamente degeneradas e com a presença expressiva de corpos apoptóticos, diferentemente das fêmeas fixadas em coelhos resistentes nas quais os primeiros sinais de degeneração surgiram já nas fêmeas semi-ingurgitadas e tornaram-se mais severos naquelas completamente ingurgitadas.

## **CONCLUSÕES**

---

## 6. Conclusões

1. O padrão de desenvolvimento e de degeneração das glândulas salivares de fêmeas adultas de *A. cajennense* é semelhante ao de outras espécies de ixodídeos.
2. Sucessivas infestações de carrapatos adultos da espécie *Amblyomma cajennense* em coelhos provoca dificuldades no processo de alimentação dos ectoparasitas, expressas por: a) necessidade de um tempo maior para o completo ingurgitamento, b) menor peso das fêmeas ingurgitadas e c) alterações nas glândulas salivares das fêmeas semi e ingurgitadas.
3. Os ácinos I das fêmeas adultas de *A. cajennense* não se alteram durante o processo de alimentação, portanto provavelmente não atuam no processo de consumo de sangue e conseqüentemente não sofrem alterações em resposta ao desenvolvimento de resistência pelos hospedeiros.
4. Os ácinos II são compostos por seis tipos celulares, **a**, **b**, **c1**, **c2**, **c3** e **c4** e não por apenas três (**a**, **b** e **c**) como era registrado na literatura.
5. Nas fêmeas em jejum as células **a**, **b**, **c1**, **c2** e **c4** já apresentam atividade secretora, sendo as **a** as mais ativas, sugerindo que elas estejam relacionadas com a formação do cone de cimento.
6. As células **b** encontram-se ativas durante todo o processo de alimentação.
7. Todas as células do tipo **c** apresentam aumento de atividade secretora durante o processo de alimentação nas fêmeas fixadas em coelhos naive.
8. As células **d**, **e** e **f** dos ácinos III são mais ativas nas fêmeas em jejum e apenas no início do processo de alimentação em fêmeas fixadas em coelhos naive, sugerindo nestas a sua participação na formação do cone de cimento.

9. As glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos resistentes apresentam alterações em relação às glândulas de fêmeas fixadas, em coelhos naive sendo estas mais evidentes por ocasião de terceira infestação.
10. As principais alterações entre as glândulas salivares de fêmeas fixadas em coelhos naive e em coelhos resistentes se expressam por injúrias nos ácinos II e III.
11. As células **c** das glândulas salivares de fêmeas fixadas em coelhos resistentes apresentam características de degeneração precoce.
12. A degeneração das glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* fixadas em coelhos resistentes é acelerada quando comparadas com as daquelas fixadas em coelhos naive.
13. As células **d** dos ácinos III de fêmeas fixadas em coelhos resistentes ficam ativas por mais tempo do que aquelas das fêmeas fixadas em coelhos naive.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. Referências Bibliográficas

BAKER, D.M., OWNBY, C.L., KROLAK, J.M., CLAYPOOL, P.L. & SAUER, J.R. The effects of attachment, feeding and mating on the morphology of the type I alveoli of the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum*. *Journal of Parasitology* 70: 99-113, 1984.

BALASHOV, S. Yu. S. An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Zoological Institute, USSR Academy of Sciences, Nauka Publishers, Leningrad Department, Leningrad, 256 pp., 1979.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.J.P.; 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.

BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, 8: 97-115, 1978.

BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; LISBOA, C.L.M.; RIBEIRO, M.F.B. Horse resistance to natural infestation of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 104: 265 – 273, 2002.

BROWN, S.J. Rabbit-acquired resistance to *Amblyomma americanum* and western blot analysis of salivary gland-derived antigens. Host regulated developmental mechanisms in vector arthropods : proceedings of the Vero Beach Symposium, Vero Beach, Florida. Borovsky, D.Spielman, A. (eds.).- Vero Beach, FL (USA): University of Florida-IFAS. Florida Medical Entomology Laboratory. pp. 108-113, 1986.

CASTAGNOLLI, K.C.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTANA, D.A.; DE CASTRO, M.B.; ROMANO, M.A.; SZABÓ, M.P.J. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.117, p.271-283, 2003.

COOLEY, R. A.; KOHLS, G. M. The genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.30, p.77-111, 1944.

COONS, L. B.; L'AMOREAUX, W. J. Developmental changes in the salivary glands of male and female *Dermacentor variabilis* (Say) during feeding. In: BOROVSKY, D.; SPIELMAN, A. (Eds.), *Host Regulated Developmental Mechanisms in Vector Arthropods*. Vol. 2, University of Florida-IFAS, Vero Beach, 86-92, 1986.

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

COWDRY, E. V. & DANKS, W. B. C. Studies on coast fever II. Behavior of the parasite and the development of distinctive lesions in susceptible animals. *Parasitology*, v. 25, p. 1 – 63, 1933.



DICKSON, R.G.; O'HAGAIN, J.E.; SCHOTZ, M.; BINNINGTON, K.C.; HEGARTY. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science, 54: 475-186, 1976.

FAWCETT, D.W.; BINNINGTON, K.; VOIGT, W.P. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks, J.R. SAUER & J.A. HAIR (eds). Ellis Horwood Ltd, Chichester, Great Britain, p. 23-45, 1986.

FELDMAN-MUHSAM, BORUT, S. AND S. SALITERNIK-GIVANT. Salivary secretion of the male tick during copulation. Journal of Insect Physiology, 16: 1945 – 1949, 1970.

FLECHTMANN, H. W. C. Ácaros de Importância Médico-Veterinária. Ed. Nobel, 3ª edição, 192p.,1985.

FURQUIM, K.C.S. Estudo das glândulas salivares de fêmeas e machos de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae): Caracterização do ciclo secretor com ênfase no processo de degeneração. Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, UNESP-SP, 237 p., 2007

GEORGE, J. E., OSBURN, R. L. AND WIKEL, S. K. Acquisition And Expression of Resistances by *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* calves to *Amblyomma americanum* infestation, Journal of Parasitology. 71: 174-182, 1985.

GREGSON, J.D. Morphology and functioning of the mouthparts of *Dermacentor andersoni* Stiles. Part I. The feeding mechanism in relation to the tick. *Acta Tropica* 17: 48-72, 1960.

GREGSON, J. D. Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. *Parasitology* 57.1-8, 1967.

GRIGORIEVA, L.A. AND AMOSOVA, L.I. Morphological changes of salivary glands of female ixodid ticks of subfamilies Ixodinae and Amblyomminae (Acari: Ixodidae) during feeding and their significance. *Journal of Biochemistry and Physiology* 44 (6), pp.662 – 635, 2008.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G. H. ; MBATI, P.A. Cutaneous hypersensitivity induced in rabbits by extracts of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae). *Journal of the South African Veterinary Association*, 75: 37-39, 2004a.

HLATSHWAYO, M.; SZABÓ, M.P.; BECHARA, G.H.; MBATI, P.A. Cross-reactivity between antigens from *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma hebraeum* (Acari:Ixodidae). *Journal of South African Veterinary Association*, 75(1) pp. 40-2, 2004b.

HELLER-HAUPT A., KAGARUKI L.K., VARMA M.G.R. Resistance and cross-resistance in rabbits to adults of three species of African ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* (20) 3: 155 – 165, 1996.

HOWELL, C.J.; NEITZ, A.W.H.; POTGIETER, K.J.J. Some toxic, physical and chemical properties of the oral secretion of the sand tampan, *Ornithodoros savignyi* (1927). Onderstepoort. Journal of Veterinary Research, 42: 99-102, 1975.

JITTAPALAPONG, S.; STICH R, W.; GORDON, J.C.; BREMER, C.A.; BARRIGA, O. O. Humoral immune response of dogs immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*. Annals of the New York Academy of Sciences, 916:283-8, 2000.

JITTAPALAPONG, S.; THANMAPORN, P.; CHANPHAO, H.; WORAWUT, R.; STICH, R.W. Immunization with Tick Salivary Gland Extracts: Impact on Salivary Gland Ultrastructure in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Collected from Immunized Naturally Infested Cattle. Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 1149, Number 1, December 2008 , pp. 200-204(5), 2008.

JUNQUEIRA, L.C. U. & JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Livraria Editora Santos. p.48-81, 1983.

KAUFMAN, R.; SAUER, J.R. Ion and water balance in feeding ticks; mechanisms of tick excretion. In Physiology of Ticks, Obenchain , F.D. & Galun, R.L. (eds), Pergamon Press Ltd. New York, pp 213-44, 1983.

KAUFMAN, R. Salivary gland degeneration in female tick, *Amblyomma hebraeum* Koch (Acari: Ixodidae). P. 46-54. In: SAUER, J. R. and HAIR, J. A. (Eds). Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks. Ellis Horwood, Chichester, 1986.

LABRUNA, M.B. Carta Acarológica. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, suplemento 1, p199 – 204, 2004.

LATIF, A.A., NEWSON, R. M. and DHADIALLA, T. S. Feeding performance of *Amblyomma variegatum* (Acarina: Ixodidae) fed repeatedly on rabbits. Experimental and Applied Acarology. V.5, 1-2 p. 83-92, 1988.

LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; RODRIGUES, Z.B.; CARVALHO, H.A.; FREITAS, C.M.V.; VIEIRA JR., C.R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.93, p.347-351, 1998.

MCGOWAN, M.J.; HOMER, J.T.; O'DELL, G.V.; MCNEW, R.W.; BARKER, R.W. Performance of ticks fed on rabbits inoculated with extracts derived from homogenized ticks *Amblyomma maculatum* Kock. The Journal of Parasitology, 66: 42-48, 1980.

MCMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158:202, 1946.

MONTEIRO, G. E.; BECHARA, G.H. Cutaneous basophilia in the resistance of goats to *Amblyomma cajennense* nymphs after repeated infestations. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences, 1149: 221–225, 2008.

MUKAI, L.S.; NETTO, A.C.; SZABO, M.J.P.; BECHARA, G.H. Development of resistance to nymphs of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae) in dogs. Annals of the New York Academy of Sciences, 969:180-3, 2002a.

MUKAI, L. S., NETTO, A. C., SZABÓ, M. P. J., BECHARA, G. H. Hypersensitivity induced in dogs by nymphal extract of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari:Ixodidae). *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.969, p.184 - 186, 2002b.

NEEDHAM, G.R. & COONS, L.B. Ultrastructural changes in type I alveoli of the salivary glands from hydrating and desiccating lone star tick. In: *Acarology VI*, Griffiths, D.A. & Bownman, C.E. (eds), Ellis Horwood Ltd., pp366-73, 1984.

NEITZ, A.W.H.; HOWELL, C.J.; POTGIETER, D.J.J. Purification of a toxic component in the oral secretion of sand tampan, *Ornithodoros savignyi* (1927). *The South African Journal of Chemistry.*, 22: 5142-5149, 1969.

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*. 140, 114-123, 2006.

NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the presence of an anticoagulin in the salivary glands and intestines of *Argas persicus*. *Parasitology* 1: 302-310, 1908.

OLIVIERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius)(Acarina: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol.87 (I), 167-174, 1992.

RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks - a global view. *Insect Science and its Application* 13, 495-504, 1992.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W. Uptake of water vapour from air: process, site, and mechanism in ticks. In: Comparative physiology: water, ions and fluid mechanics (K. Schimdt-Nielsen, L. Bolio & S.H. P. Maddrell, eds.), Cambridge University Press. pp. 97 – 113, 1978.

RUDOLPH, D. & KNULLE, W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature* 149: 84 – 85, 1974.

SAUER, J. R; HAIR, J. A. Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. Ellis Horwood, p.23-45, 457-471, 1986.

SAUER, J. R. Acarine salivary glands – Physiological relationships. *Journal of Medical Entomology*, Lanham, v. 14, p. 1-9, 1977.

SCHUMAKER, T.T.; SERRA FREIRE, N.M. Histologia das glândulas salivares de adultos de *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 (Ixodoidea, Argasidae) em jejum, em alimentação e alimentados. *Revista Brasileira de Entomologia*, 35: 49-72, 1991.

SONESHINE, D. E. Biology of ticks. Oxford University Press. New York, p.141-158, 1991.

SZABÓ, M. P.J.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C.S.; BECHARA, G.H. Differences in the acquired resistance of dogs, guinea-pigs and hamsters to repeated infestations with ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.32, p.43-50, 1995a

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

TATCHELL, R.J. The ionic regulatory role of the salivary secretion of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 15: 1421-1430, 1969.

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

UTECH, K.B.W.; WHARTON, R.H. AND KERR, J.D. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 885 – 859, 1978.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D.; GILL, H.S. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *International Journal for Parasitology*, 15(1) pp. 81-100, 1985.

WALKER, A.R.; FLETCHER, J.D. *Rhipicephalus appendiculatus* feeding on rabbits and cattle: Salivary gland responses to varying host resistance. *Experimental and Applied Acarology*, 8 pp. 285 – 290, 1989.

WEISS, B.L. & KAUFMAN, W.R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 5874-5879, 2004.

WILLADSEN, P., ROBERTS, J.A., KERR, J.D. Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. International Journal of Parasitology 8: 89 – 95, 1978.

WILLADSEN, P. Immunity to tick. Advances in Parasitology, v.18, p.293-313, 1980.

WILLADSEN P., AND F. JONGEJAN. Immunology of the tick-host interaction and the control of tick-borne diseases. Parasitology Today 15: 258 – 262, 1999.

WIKEL, S. K. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Northbrook, v.30, p.284-288, 1981.

---

Pablo Henrique Nunes  
(Aluno)

---

Maria Izabel Camargo-Mathias  
(Orientadora)