

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO



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

MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CARRAPATOS DO GÊNERO *Amblyomma* (ACARI, IXODIDAE): UMA ANÁLISE COMPARATIVA

BRUNO RODRIGUES SAMPIERI

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).

Maio - 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO



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

MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CARRAPATOS DO GÊNERO *Amblyomma* (ACARI, IXODIDAE): UMA ANÁLISE COMPARATIVA

BRUNO RODRIGUES SAMPIERI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA IZABEL CAMARGO-MATHIAS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ODAIR CORREA BUENO

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).

Maio - 2016

591.4 Sampieri, Bruno Rodrigues

S192m Morfologia e desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de carrapatos do gênero Amblyomma (Acari, Ixodidae) : uma análise comparativa / Bruno Rodrigues Sampieri. - Rio Claro, 2016
 113 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientadora: Maria Izabel Souza Camargo Coorientador: Odair Correa Bueno

1. Anatomia comparada. 2. Espermiotaxonomia. 3. Espermiocladística. 4. Filogenia. 5. Controle. I. Título.

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





Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE CARRAPATOS DO GÊNERO Amblyomma (ACARI, IXODIDAE): UMA ANÁLISE COMPARATIVA

AUTOR: BRUNO RODRIGUES SAMPIERI ORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO Departamento de Biologia / IB-Rio Claro

Prof. Dr. GILBERTO ORIVALDO CHIERICE Departamento de Química e Física Molecular / Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos

Prof. Dr. ANDRE ARNOSTI Departamento de Biologia / IB-Rio Claro

possille

Profa. Dra. SOLANGE APARECIDA ROSSINI DE OLIVEIRA Faculdades Integradas Einstein de Limeira / Faculdades Integradas Einstein de Limeira

Dr. GUSTAVO SERON SANCHES

Pós-Doutorando do Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal da UNESP

Instituto de Biociências - Câmpus de Rio Claro -Avenida 24-A no. 1515, 13506900, Rio Claro - São Paulo nullCNPJ: 48.031.918/0018-72,

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, à minha esposa, à minha filha e ao meu irmão, pelo apoio, companheirismo e paciência; por compartilharem comigo angústias e conquistas.

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço à minha orientadora **Maria Izabel Camargo Mathias**, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por permitir que eu desse início à uma carreira docente/científica, por tudo que me ensinou e me proporcionou, principalmente por permitir que eu chegasse até aqui e tornando-me o profissional que sou hoje.

Agradeço imensamente **aos meus pais**, por sempre me apoiarem, mesmo nos momentos nos quais sabiam que eu estava trilhando o caminho errado, ou o mais complicado, mas afortunadamente estavam ao meu lado.

À minha esposa Bianca e à minha filha Joana, por partilharem comigo cada momento, cada decisão, cada frustação e todas as conquistas, principalmente durante esses últimos anos que, foram muito difíceis, mas de um aprendizado imensurável!

Aos meus amigos Felipe e Ângela, que tornaram nosso período em Rio Claro muito mais agradável e proveitoso, nos mostrando a importância de uma amizade simples e honesta.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno**, por toda sua contribuição a este trabalho.

Ao meu irmão André Arnosti e à minha "mãe" Priscila, por tudo!

Ao meu grande amigo **Fredy** que me recebeu em seu lar como se eu fosse da sua família e tanto contribuiu para esta tese.

À minha avó **Jandira** que deixou este plano terreno recentemente, mas que sempre torceu muito por mim, mesmo sem entender a razão de alguém "estudar tanto".

Aos **amigos** e **colegas** do **grupo de pesquisa BCSTM**, da **pós-graduação**, aos **funcionários** do **Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro**, por todo o apoio e auxílio, troca de experiências e de favores, em especial **Renata**, **Luis**, **Elen**, **Paty** e **Emygdio**.

Muito obrigado à **FAPESP** pelo apoio financeiro e confiança em meu trabalho.

Obrigado **a todos** que participaram desta etapa da minha vida, tão importante e, por fim, muito obrigado a **Deus** por permitir que tudo isso se concretizasse!

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, **corre por nossa conta**. "

Chico Xavier

RESUMO

Os carrapatos do gênero Amblyomma possuem importância médica e veterinária devido ao seu parasitismo em vertebrados de interesse econômico, silvestres e inclusive em humanos. A sistemática deste grupo foi, por muito tempo, bastante controversa quanto à taxonomia e às relações filogenéticas dentro do gênero e deste com outros grupos de carrapatos. O estudo da morfologia do sistema reprodutor masculino de carrapatos, tem se mostrado valioso, principalmente quando da obtenção de informações sobre a biologia reprodutiva do animal, dos caracteres relevantes para a taxonomia e da filogenia do grupo, além da elucidação de como este sistema pode ser alvo de estudos toxicológicos e de controle de pragas urbanas e rurais. O presente trabalho então buscou: a) comparar a morfologia geral do sistema reprodutor masculino das espécies A. aureolatum, A. cajennense sl (sensu lato), A. sculptum e A. triste intra- e intergênero; b) comparar a histologia e o desenvolvimento deste sistema e das suas células germinativas nestas mesmas espécies; c) demonstrar a eficácia dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (Ricinus communis) sobre o morfosiologia do sistema reprodutor masculino de A. cajennense sl; e d) realizar análises cladísticas e filogenéticas utilizando dados morfohistológicos e moleculares aqui obtidos. Casais das espécies aqui estudadas foram infestados em coelhos, os machos foram coletados com mais de 12 dias de alimentação e tiveram seus sistemas reprodutores retirados para fixação e aplicação das técnicas histológicas, histoquímica, e de microscopia eletrônica de varredura. Além disso, foram realizadas extrações de DNA para amplificação e comparação dos genes 16S rDNA, ITS2 e COI para as análises filogenéticas. O sistema reprodutor masculino de carrapatos apresentou morfohistologia similar ao se comparar as espécies do gênero Amblyomma, com testículos pares de formato tubular (conectados ou não distalmente) ligados por ductos deferentes a uma glândula acessória multilobada. Foram observadas células germinativas em cinco estágios de desenvolvimento no adulto, sendo o último uma espermátide madura (sp V) com morfologia consideravelmente diferente entre as espécies. Os ésteres mostraram capacidade de alterar a morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de A. cajennense sl, principalmente das espermátides imaturas, além de interferir na dinâmica de secreção da glândula acessória. O dendograma gerado mostra um possível agrupamento entre A. aureolatum e A. triste e entre estas espécies com A. sculptum. As análises moleculares mostraram distâncias genéticas relevantes entre as espécies, bem como proximidade entre A. aureolatum e A. triste.

ABSTRACT

The Amblyomma ticks have medical and veterinary importance due to its parasitism on vertebrate of economic interest, wildlife animals and even humans. The systematics of this group was for a long time quite controversial as a taxonomic level and phylogenetic relationships within the genus and this with other ticks groups. The study of the morphology of ticks' male reproductive system has proven to be valuable, especially when obtaining information about the reproductive biology of the animal, relevant characters to taxonomy and phylogeny relationships of the group, in addition to the elucidation of how this system can be target of toxicological studies and control of urban and rural pests. This work then aimed to: a) compare the overall morphology of the male reproductive system of the species A. aureolatum, A. cajennense sl (sensu lato) and A. sculptum intra- and inter-genus; b) compare the histology and development of this system and their germ cells in these same species; c) demonstrate the effectiveness of esters of ricinoleic acid from castor oil (Ricinus communis) on morphophysiology of the male reproductive system of A cajennense sl; and d) performing cladistics and phylogenetic analyzes using morphohistological and molecular information contained herein. Couples of ticks species studied here were infested in rabbits as hosts, males were collected over 12 days of feeding and had their reproductive systems removed for fixation and the application of histological techniques, histochemistry and scanning electron microscopy. In addition, DNA extractions were carried out for amplification and comparison of genes 16S rDNA, ITS2 and COI for the phylogenetic analyzes. The male reproductive system of ticks showed similar morfohistology when comparing the species of the genus Amblyomma, with a pair of tubular testes (connected or not distally) attached by the vas deferens to a multilobed accessory gland. Germ cells were observed in five different stages of development in the adult, the latter being a mature spermatid (sp V) with different morphology of a substantial level between species. Esters showed ability to change the male reproductive system morphophysiology of A. cajennense sl mainly of immature spermatids, and interfere with the dynamics of secretion of the accessory gland. The dendogram shows a possible grouping of A. aureolatum and A. triste and between these species with A. sculptum. Molecular analysis showed significant genetic distances between species, as well as the proximity to A. aureolatum and A. triste.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Biologia e Sistemática	1
1.2. Sistema Reprodutor Masculino	4
1.3. Importância econômico-sanitária dos carrapatos do gênero Amb	lyomma6
1.4. Métodos de Controle	7
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo Geral	10
2.2. Objetivos Específicos	10
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Materiais	11
3.2. Métodos	14
4. Resultados	17

4.4. CAPÍTULO 4: Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics......**56**

5. Discussão Geral	85
6. Conclusões	
7. Referências	

1. Introdução

1.1. Biologia e Sistemática de Carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas de hábito hematófago obrigatório durante todo o seu ciclo ontogenético na maioria das espécies conhecidas. Estão classificados dentro do Subfilo Chelicerata, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Subordem Ixodida, compreendendo três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nutalliellidae. (BURGER et al., 2012; KRANTZ; WALTER, 2009; MARTINS et al., 2010; SONENSHINE; ROE, 2014). Em países do hemisfério Norte e Sul os carrapatos parasitam animais de criação e de corte, como ovinos, caprinos e bovinos além daqueles domésticos, bem como humanos, causando nestes injúrias diretas pela laceração da pele, anemias profundas pelo grande consumo de sangue e pela transmissão de agentes patogênicos (COLWELL; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2011; FLECHTMANN, 1975; SONENSHINE; ROE, 2014).

A família Argasidae, ampla em números de espécies e em distribuição geográfica, possui aproximadamente 193 espécies descritas coletadas em regiões tropicais e subtropicais, parasitando vertebrados como aves, anfíbios, répteis e mamíferos (GUGLIELMONE et al., 2010; SONENSHINE; ROE, 2014).

A família Nutalliellidae apresenta apenas uma espécie descrita, *Nutalliella namaqua*, endêmica em regiões da África do Sul, a qual durante muitos anos não foi coletada por ser rara e de comportamento pouco conhecido (BARKER; MURRELL, 2002; BLACK; PIESMAN, 1994). Recentemente foram registrados indivíduos adultos e em estágio de ninfa, coletados em Namaqualand, África do Sul (MANS et al., 2011, 2012).

A amplitude em número de espécies (702 espécies descritas) e distribuição geográfica da família Ixodidae é similar (em muitos casos maior) que Argasidae, e seus representates apresentam como características gerais: a) dimorfismo sexual acentuado na fase adulta; b) escudo dorsal quitinoso duro, de onde surgiu o nome popular da família "carrapatos de corpo duro" ou em inglês "hard ticks"; c) fixação profunda do hipostômio na pele do hospedeiro possibilitada pela produção de cemento, permitindo um longo repasto sanguíneo e dificultando a sua retirada; e d) postura única dos ovos no solo após

o completo ingurgitamento da fêmea com massa de ovos variando entre 4.000 (*R. sanguineus*) a 20.000 ovos (*A. variegatum*). Tais características permitem que os ixodídeos sejam biologicamente bem sucedidos nos mais variados habitats, bem como no processo de dispersão de longas distâncias possibilitando-os parasitarem diversas espécies de vertebrados (DANTAS-TORRES, 2008; PERRY, 2001; SONENSHINE; ROE, 2014).

Dentro da família Ixodidae encontram-se cinco subfamílias, das quais Amblyomminae abriga 130 espécies num só gênero, *Amblyomma*, sendo que 29 delas tem ocorrência no Brasil (BURGER et al., 2012; GUGLIELMONE et al., 2010; KRANTZ; WALTER, 2009; MARTINS et al., 2010; SONENSHINE; ROE, 2014).

A taxonomia e filogenia de carrapatos da família Ixodidae vem sendo revista com frequência nas últimas décadas, partindo inicialmente das árvores propostas por Hoogstraal e Aeschlimann (1982) que tomaram como base caracteres morfológicos e comportamentais, estes últimos principalmente relacionados à hematofagia do ectoparasita e aos seus hospedeiros preferenciais (BARKER; MURRELL, 2002; BLACK; PIESMAN, 1994; BURGER et al., 2012; HOOGSTRAAL; AESCHLIMANN, 1982; SONENSHINE; ROE, 2014).

A partir de meados da década de 1990 diversos autores passaram a revisar tal proposta, como Black et al. (1997), Barker e Murrel (2002) e Burger et al. (2012), fazendo uso de técnicas de sistemática molecular, principalmente do genoma mitocondrial dos carrapatos e eventualmente cruzando seus resultados com as descrições morfológicas preexistentes.

Mesmo com o advento da filogenia molecular a morfologia não pode ser descartada em estudos desta natureza, visto ser considerada como ferramenta clássica (morfologia externa) para a taxonomia de carrapatos. Este tipo de trabalho já rendeu resultados importantes como aqueles obtidos recentemente por Nava et al. (2014; 2015) que redefiniram a distribuição e a identificação de indivíduos da espécie *Amblyomma cajennense* nas Américas e do complexo *Rhipicephalus sanguineus* sl (sensu lato).

Acompanhando este status, a classificação de indivíduos da subfamília Amblyomminae não é diferente quanto às divergências em sua sistemática, evidenciada por trabalhos também recentes nos quais um gênero foi taxonomicamente extinto, o *Aponomma*, e teve 20 de suas espécies reclassificadas dentro do gênero *Amblyomma*, sendo que as demais espécies deram origem à uma nova subfamília e um novo gênero, Bothriocrotoninae e *Bothriocroton* respectivamente (BURGER et al., 2012; NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009; NAVA et al., 2014).

Dadas as extensas discussões e revisões sobre a sistemática de carrapatos e a confirmação da ocorrência de espécies crípticas em diversos clados, ficaram então definidos "complexos" de espécies em certas regiões geográficas do globo, como é o caso do "complexo *cajennense*" na América do Sul, deixando clara a necessidade de novos estudos abordando aspectos de ecologia, biogeografia, morfologia e biologia molecular para a resolução dos problemas desta ordem, buscando uma abordagem completa e mais robusta da sistemática destes ectoparasitas (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2011).

Nas Américas existem ao menos três complexos de espécies dentro da subfamília Amblyomminae de relevância para a medicina veterinária e para a saúde pública: "complexo *cajennnense*", "complexo *maculatum*" e "complexo *ovale*", onde espécies importantes que ocorrem no Brasil, como *Amblyomma cajennense* e *A. sculptum*, *A. triste*, e *A. aureolatum*, estão respectivamente agrupadas nestes "complexos". Estas espécies estão intimamente relacionadas com a transmissão do agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) em áreas rurais, de floresta e urbanas de todo o Brasil (BEATI et al., 2013; GUGLIELMONE et al., 2003, 2013; LABRUNA et al., 2011; NAVA et al., 2014).

A espécie *Amblyomma mixtum*, redescrita recentemente por Nava et al. (2014) compõe igualmente o "complexo *cajennense*" e apresenta uma ocorrência mais ampla do que se pensava, indo do sul dos EUA (Texas), descendo pelo México e toda a América Central, sendo que na América do Sul ocorreria exclusivamente no Equador. Páez et al. (2016, dados não publicado), no entanto, descreveram a ocorrência desta espécie para a Colômbia, região de Orinoquía, complementando as análises realizadas por Beati et al. (2013) e Nava et al. (2014) sobre a distribuição do gênero *Amblyomma* nas Américas.

Assim sendo, fica claro que a taxonomia e a filogenia de grupos animais deixam lacunas a serem preenchidas para a total solução de sua classificação e evolução. Neste sentido, estudos morfológicos comparados dos sistemas reprodutores dos machos de espécies animais, inclusive das de carrapatos, principalmente das células germinativas, certamente forneceriam informações importantes quando focadas as relações filogenéticas entre os indivíduos de uma mesma família, principalmente se somadas às análises moleculares e aos dados biogeográficos, podendo então fortalecer as hipóteses sobre a evolução e classificação das espécies (BILINSKI; DALLAI, 2014; MUSCO et al., 2010; NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009; NAVA et al., 2014; S. NAVA, A. ESTRADA-PEÑA, T. PETNEY, L. BEATI, M. B. LABRUNA, M. P. J. SZABÓ, J. M. VENZAL, M. MASTROPAOLO, A. J. MANGOLD, 2014).

1.2. Sistema reprodutor masculino de carrapatos Ixodidae

Os espermatozoides, células germinativas masculinas apresentam morfologia e ultraestrutura das mais diversas entre as espécies animais conhecidas, de modo que muitos autores assumem que essa diversidade é espécie-específica, ou seja, seria possível através da investigação de sua forma definir desde o filo até a espécie do macho que as produziu (BIRKHEAD; HOSKEN; PITNICK, 2009; JAMIESON; ROUSE, 1989).

Em diversos grupos dentre os invertebrados, tais como insetos e anelídeos, o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas, principalmente a espermiogênese, bem como a morfologia e a ultraestrutura dos espermatozoides trouxeram à luz da ciência resoluções de problemas filogenéticos e taxonômicos destes grupos animais, problemas estes que nem mesmo as técnicas de filogenia molecular puderam solucionar (BIRKHEAD; HOSKEN; PITNICK, 2009; DALLAI; AFZELIUS, 2000, 1993; JAMIESON; ROUSE, 1989).

Segundo dados da literatura, o sistema reprodutor masculino dos carrapatos das famílias Argasidae e Ixodidae é semelhante quanto a sua morfologia, porém, são relatadas diferenças acentuadas entre os indivíduos dos dois grupos. Em ambas as famílias o sistema reprodutor masculino localiza-se na região ventral anterior do corpo e é composto por um complexo glandular acessório multilobado, um par de testículos tubulares, um par de vasos deferentes, um par de vesículas seminais e um ducto ejaculatório (ANHOLETO et al., 2014; SONENSHINE; ROE, 2014; SONENSHINE, 1970).

Os testículos são os órgãos onde as células germinativas masculinas tem origem. Em carrapatos estes ficam posicionados dorsolateralmente ao corpo do animal e seu tamanho e estágio de desenvolvimento dependem do estado nutricional do macho, sendo os testículos pequenos nos animais jovens em jejum, contrariamente ao que se observa nos animais em alimentação e naqueles que ou estão ou estiveram em contato com as fêmeas, que é quando as gônadas aumentam de tamanho. Em Argasidae os testículos se fundem por um tecido conectivo na região distal, ou ocorrem como órgão único em forma de ferradura (REGER, 1963; SONENSHINE; ROE, 2014; SONENSHINE, 1970).

Entre os ixodídeos Prostriata resgistrados na literatura, é observado nos machos do gênero *Ixodes* testículos pareados conectados distalmente. Nos membros da família Ixodidae, no que se tem descrito na literatura, ora observa-se apenas um fino ligamento tubular que une a região distal dos dois testículos ora notam-se testículos completamente individualizados (ANHOLETO et al., 2014; MONTASSER; GADELHAK; TARIQ, 2005; ROSHDY, 2014; SONENSHINE; ROE, 2014).

As células germinativas abrigadas no interior dos testículos encontram-se envoltas por um epitélio pavimentoso simples para formar os espermatocistos até estágios avançados desenvolvimento que ocorrem basicamente em duas etapas: a) a espermatogênese, caracterizada pela sequência de divisões mitóticas e meióticas das espermatogônias e dos espermatócitos, originando as espermátides e b) a espermiogênese, desenvolvimento final (diferenciação) das espermátides dando origem aos espermatozóides.

Para a maioria das espécies de carrapatos da família Ixodidae, a espermatogênese se inicia no final do estágio de ninfa, como demonstrado em ninfas de *Rhipicephalus sanguineus sl* (DE OLIVEIRA et al., 2012) e é finalizada logo após a ecdise de ninfa para adulto. Porém, esta não é uma regra, visto que para algumas espécies a espermatogênese só é concluída quando o macho atinge o estágio adulto e dá início à alimentação. Este é o caso de *Dermacentor variabilis* com 5 ou 6 dias de alimentação que ainda apresenta espermatócitos II em fase final de divisão celular (SONENSHINE; ROE, 2014). Para algumas espécies do extinto gênero *Aponomma*, no entanto, este processo é independente do estágio alimentar do indivíduo adulto (COONS; ALBERTI, 1999; DUMSER; OLIVER, 1981).

Da mesma forma, as fases que compreendem a espermiogênese são dependentes de outros processos fisiológicos, como o avanço do processo alimentar do adulto, bem como da produção do espermatóforo (estrutura acelular que abriga as espermátides maduras) e das secreções ejaculatórias produzidas pelo macho, o que é estimulado via contato mecânico com a fêmea e é finalizado quando o espermatóforo despeja o conteúdo espermático na abertura genital feminina (útero) (FELDMAN-MUHSAM; BORUT, 1978, 1983; REGER, 1963; SONENSHINE; ROE, 2014).

Bruno Rodrigues Sampieri

Muito embora existam estudos sobre o assunto, pouco ainda se sabe sobre a morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de carrapatos, uma vez que os dados disponíveis na literatura são antigos e superficiais, restritos à poucas espécies de argasídeos e de ixodídeos com ocorrência restrita a certas regiões do globo, como *Dermacentor variabilis* (Ixodidae) nos EUA e *Argas persicus* (Argasidae) em diversos outros países inclusive no Brasil. Como o ciclo ontogenético e alimentar destas espécies podem variar muito entre elas, a carência de dados mais amplos e completos abordando espécies relacionadas tem inviabilizado a realização de análises comparativas (ALBERTI et al., 2008; ANHOLETO et al., 2014; DUMSER; OLIVER, 1981).

Todas estas informações vêm então reforçar a necessidade da realização de novos estudos (fazendo-se para tanto uso de ferramentas mais recentes) tanto da morfologia como da fisiologia do desenvolvimento das células germinativas de carrapatos, o que permitirá maior detalhamento dos processos de espermiogênese, além de possibilitar a caracterização morfológica destas células durante as diferentes fases que as mesmas passam ao longo destes processos. As informações obtidas a partir daí poderão subsidiar, inclusive, outros dados que serão úteis na busca de métodos de controle mais eficazes contra carrapatos e menos prejudiciais aos organismos não alvos (ALONSO-DÍAZ et al., 2013; BILINSKI; DALLAI, 2014; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015a, 2015b; MATOS et al., 2015; MONTASSER; GADELHAK; TARIQ, 2005).

1.3. Importância econômico-sanitária dos carrapatos do gênero Amblyomma

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* merecem grande destaque no que diz respeito a servirem como modelos nos estudos que buscam encontrar métodos de controle, principalmente devido: a) a algumas espécies parasitarem animais de criação e de corte; b) a baixa especificidade de hospedeiros; c) aos estágios imaturos parasitarem humanos em áreas endêmicas e d) ao fato da maioria das espécies apresentarem grande potencial como vetores de diversos e importantes patógenos para animais e para humanos (ALONSO-DÍAZ et al., 2013; FREITAS; ZAPATA; FERNANDES, 2011; MENDES et al., 2011; ROMER et al., 2014; RUBINI et al., 2009; SWEI et al., 2013).

Dentre as espécies deste gênero que tem importância médica e veterinária estão A. aureolatum, A. cajennense, A. sculptum e A. triste transmissoras de rickettsioses no Brasil e no Uruguai. Desta lista merecem especial destaque *A. cajennense* e *A. sculptum* por serem as espécie mais encontradas parasitando humanos no Brasil e de estreita relação com o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB), a bactéria *Rickettsia rickettsii* (ARZUA et al., 2003; GAZETA et al., 2009; GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS et al., 2010; VENZAL et al., 2008).

Países na África Ocidental e na América do Norte vêm enfrentando problemas causados por *A. cajennense* nas criações de gado, onde esta espécie infesta os animais de corte junto com as espécies *R. annulatus* e *R. (Boophilus) microplus*, dificultando o manejo e controle das mesmas e levando os produtores a uma má administração de acaricidas químicos sintéticos, o que por sua vez gera problemas ambientais e seleciona populações resistentes a estas substâncias (ALONSO-DÍAZ et al., 2013; SENRA et al., 2013).

Neste sentido diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de demonstrar a eficácia e a viabilidade de novos produtos e métodos no controle destas espécies de carrapatos, tais como o desenvolvimento de resistência em cavalos na busca por uma vacina (CASTAGNOLLI et al., 2003) e a ação repelente e acaricida de compostos de origem vegetal que se mostrem promissores e eficientes (DA SILVA MATOS et al., 2014; MENDES et al., 2011).

1.4. Métodos de controle de carrapatos

O controle de carrapatos é um conjunto de medidas necessárias para a erradicação de doenças zoonóticas graves que acometem humanos e animais de corte e domésticos, que só apresentam certa eficácia quando realizadas objetivando um manejo integrado da praga ao longo de certo período de tempo, ou seja, demanda elevação de custos de produção e manutenção, pessoal capacitado para executar as tarefas ou orientar os mesmos, seguir à risca as metodologias e orientações técnicas, bem como prestar atenção aos ciclos de vida dos hospedeiros, e principalmente, do ectoparasita (GRAF et al., 2004; SONENSHINE; KOCAN; DE LA FUENTE, 2006; WILLADSEN, 2006).

Por estas razões, o controle eficaz e total de carrapatos torna-se muito difícil, principalmente daqueles que são responsáveis por grandes perdas das indústrias de produtos de origem animal e pecuaristas (*R. (Boophilus) microplus, A. cajennense* sl),

mas não ficam de fora os carrapatos considerados pragas urbanas (*R. sanguineus sl, A. sculptum*) (GAZETA et al., 2009; GRAF et al., 2004; KELLY et al., 2014; SONENSHINE; ROE, 2014).

O método de controle amplamente utilizado na pecuária e em animais domésticos tem sido por meio da aplicação de acaricidas químicos sintéticos, a exemplo da permetrina, fipronil, dinotefuran, ivermectina e eprinomectina. Contudo, a aplicação destas substâncias de maneira indiscriminada e/ou em doses muito acima daquelas recomendadas gera resultados muito abaixo dos esperados em médio e longo prazo, seleciona populações resistentes às substâncias, polui o ambiente, e em muitos casos contaminam os produtos de origem animal, como a carne e o leite (GRAF et al., 2004; KELLY et al., 2014; OHMES et al., 2015; SONENSHINE; KOCAN; DE LA FUENTE, 2006; SONENSHINE; ROE, 2014; WILLADSEN, 2006).

A produção de vacinas contra carrapatos vem sendo estudada há décadas, sendo que apenas a Bm86 contra *R. microplus* foi disponibilizada no mercado até o presente momento, exibindo eficácia (aprox. 68%) abaixo da maioria dos acaricidas químicos sintéticos lançados periodicamente no mercado, além da alta especificidade de ação, não tendo efeitos significantes sobre outras espécies (RODRÍGUEZ-VALLE et al., 2012; SONENSHINE; ROE, 2014).

Diante deste cenário, a busca por acaricidas que tenham baixo custo e alta eficiência tem sido latente nos diversos setores da pesquisa científica (CAMARGO-MATHIAS, 2012). Derivados de produtos de origem vegetal mostram-se potencialmente eficazes, como é o exemplo dos extratos vegetais obtidos a partir de plantas da família Asteraceae (POLITI et al., 2012) no controle de carrapatos e de insetos, bem como o uso das folhas de plantas da família Meliaceae, que depois de trituradas fornecem bioativos que tem ação (em laboratório) nos animais hospedeiros infestados (CAMARGO-MATHIAS, 2012; LANDAU et al., 2009; VENDRAMINI et al., 2012).

Nesta mesma linha encontram-se os ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona considerados uma fonte de substâncias capazes de realizar o controle eficiente de microrganismos e de ectoparasitas (CELESTINO et al., 2015; LIMA et al., 2015). Resultados preliminares da utilização destes ésteres têm demonstrado que os mesmos atuam na hidrólise de polissacarídeos (FERREIRA et al., 2002; LEONARDO et al., 2001; MESSETTI et al., 2010). Resultados obtidos por Leonardo et al. (2001), Ferreira et al. (2002) e Messetti et al. (2010) comprovaram a capacidade antimicrobiana destes ésteres, *Bruno Rodrigues Sampieri*

que agiram na parede celular (proteoglicanas) de bactérias *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringens* e *Leuconostoc mesenteroides*, hidrolisando-a e facilitando, desta forma, a eliminação destes microrganismos.

Ainda, estudos mais recentes forneceram resultados morfológicos que demonstraram os efeitos destes ésteres sobre as glândulas salivares e sobre os ovários de carrapatos *R. sanguineus* sl (linhagem tropical), interferindo no ciclo secretor destas glândulas e consequentemente inibindo o processo alimentar, bem como sobre a vitelogênese retardando a maturação e inibindo a deposição do cório nos ovócitos (ARNOSTI et al., 2011a, 2011b; SAMPIERI et al., 2012, 2013a).

Assim, as informações preliminares até agora obtidas com o uso destes ésteres como controle químico natural tem sinalizado que estes agiriam (direta e indiretamente) sobre os ovários dos carrapatos, influenciando inclusive na síntese de ecdisteróides, substâncias responsáveis pelo controle do período de atividade dos ovários. Além disso, os ésteres interfeririam na ultraestrutura das células germinativas femininas, atuando principalmente sobre as estruturas membranosas e sobre o desenvolvimento embrionário (SAMPIERI et al., 2012, 2013a).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Diante das informações expostas, o presente trabalho teve como objetivo realizar

 a descrição da morfologia-histologia do sistema reprodutor masculino,
 caracterizando suas células germinativas em espécies de carrapatos do gênero
 Amblyomma de ocorrência no Brasil, uma vez que estas pertencem à complexos
 de espécies crípticas. Estes dados fornecerão indicativos de que o sistema
 reprodutor masculino de carrapatos é um órgão alvo em potencial para a ação de
 substâncias acaricida, aqui confirmado pela realização de testes de exposição aos
 ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*).

2.2. Objetivos Específicos

- Comparar a morfologia geral do sistema reprodutor masculino de adultos das espécies de carrapatos A. aureolatum, A. cajennense sl, A. sculptum, A. triste intra e intergêneros;
- Comparar a histologia e o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e das células germinativas destas mesmas espécies, determinando quais são e como são os estágios da espermiogênese;
- Demonstrar a eficácia de ação dos ésteres derivados do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) sobre o sistema reprodutor masculino e sobre a morfofisiologia de suas células em carrapatos *Amblyomma cajennense sl*;
- Realizar as análises cladísticas e filogenética fazendo uso dos dados morfohistológicos e moleculares aqui obtidos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Hospedeiros

No presente trabalho, em todas as infestações de manutenção das colônias de carrapatos, bem como na realização dos bioensaios com os ésteres, foram utilizados como hospedeiros coelhos Nova Zelândia Branco sem contato prévio com carrapatos (Variedade Botucatu) fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, campus de Botucatu, SP, Brasil.

Este trabalho na íntegra foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) do IB da UNESP de Rio Claro – SP, Brasil, sob o número 017/2012 e Protocolo 1422.

Carrapatos

Foram utilizados espécimes de carrapatos (machos e fêmeas) obtidos a partir de colônias mantidas em diferentes laboratórios de instituições de pesquisa do estado de São Paulo e/ou coletados em campo em regiões estratégicas no Brasil e na Colômbia. As espécies e seus respectivos locais de origem estão listadas na Tabela 1.

Espécie	Local de Coleta/Origem	Triagem/Colônia
Amblyomma aureolatum	Rio Grande do Sul, BR	Lab. Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, FMVZ, USP, São Paulo-SP, Brasil
Ambyomma cajennense	Rondônia, BR	BCSTM, UNESP, Rio Claro- SP, Brasil
Amblyomma sculptum	Araras-SP, BR (22°18′37.0′′S 47°23′06.2′′W)	BCSTM, UNESP, Rio Claro- SP, Brasil

Tabela 1 – Espécies de carrapatos e respectivos locais de coleta/origem dos espécimes

Amblyomma mixtum	Arauca, Orinoquía, CO (06°55'43''N 70°27'36"W)	Lab. GEBIOME, Prof. Fredy Arvey Rivera Páez, U. Caldas, Manizales, Colômbia
Amblyomma triste	Mato Grosso do Sul, BR	Lab. Prof. Dr. Marcos Rogério André, FCAV, UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil
Dermacentor sp.	Arauca, Orinoquía, CO (06°55'43''N 70°27'36"W)	Lab. GEBIOME, Prof. Fredy Arvey Rivera Páez, U. Caldas, Manizales, Colômbia
Ornithodoros rostratus (Argasidae)	Mato Grosso do Sul, BR	Lab. Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, FMVZ, USP, São Paulo-SP, Brasil
Rhipicephalus sanguineus sl	Jaboticabal-SP, BR	BCSTM, UNESP, Rio Claro- SP, Brasil

* Não foi possível obter georeferenciamento em todas as origens dos espécimes utilizados

Para os estudos morfológicos e moleculares comparativos entre as espécies listadas na Tabela 1 foram obtidos indivíduos provenientes de coleta de campo (1) ou de colônia mantida em laboratório (2) (Tabela 2).

Espécie	Origem	Dissecação
A. aureolatum	(2)	Entre 8 e 12 machos em posição de cópula
A. cajennense	(2)	Entre 8 e 12 machos em posição de cópula
A. sculptum	(1) Serapilheira	12 machos em posição de cópula
A. mixtum	(1) Equinos, Bovinos	4 machos durante repasto sanguíneo
A. triste	(2)	Entre 8 machos em posição de cópula
Dermacentor sp.	(1) Equinos	5 machos durante repasto sanguíneo
O. rostratus (Argasidae)	(2)	6 machos imediatamente após o repasto sanguíneo de 3 horas

Tabela 2 – Origem dos espécimes (colônia ou coleta de campo)

Bruno Rodrigues Sampieri

R. sanguineus sl	(2)	10 machos em posição de cópula
------------------	-----	--------------------------------

* Posição de cópula = macho e fêmea em contato ventral durante repasto sanguíneo

Bioensaio de exposição aos ésteres e produção de ração enriquecida

Os experimentos de exposição dos carrapatos aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) foram realizados em coelhos hospedeiros, que receberam água *ad libitum* e foram alimentados com ração (para coelhos) previamente enriquecida com o produto por um período de 15 dias antes dos mesmos serem infestados com os casais de carrapatos *A. cajennense sl.*

À época da realização desta etapa o status taxonômico desta espécie estava ainda indefinido, desta forma os indivíduos utilizados foram identificados como *A*. *cajennense*. Após a publicação do trabalho de Nava et al. (2014) foi confirmado que a espécie utilizada foi na verdade *A*. *sculptum*, de ampla ocorrência no estado de São Paulo, contudo não houve tempo hábil para realizar a correção do nome da espécie nas publicações que compõem os Capítulos 1 e 2 desta tese.

Antes da administração dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aos hospedeiros, estes foram estabilizados em NaCl e só depois foram adicionados a ração comercial para coelhos (concentrações de 5g/Kg, 10g/Kg e 20g de ésteres/Kg de ração). Os ésteres aqui utilizados foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, do Departamento de Química e Física Molecular da USP de São Carlos - SP, Brasil. O procedimento de adição dos ésteres foi realizado no Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri, da UNESP de Botucatu, SP, Brasil, sob a supervisão dos participantes do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezato, líder do laboratório AquaNutri.

3.2. Métodos

Técnicas de Análises Morfo-histológicas

Histologia

Para a realização da histologia os carrapatos foram dissecados em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com PBS (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L) sob estereomicroscópio, onde tiveram seu sistema reprodutor removido. As primeiras amostras coletadas (Capítulo 1) foram fixadas em

paraformaldeído 4% durante 48 horas e as demais em glutaraldeído 2.5% (melhor preservação do material).

Após a fixação as amostras foram desidratadas em quatro banhos de 15 minutos cada, em série crescente de etanol a 70%, 80%, 90%, 95%. Logo após, foram embebidas e incluídas em historesina Leica no interior de moldes plásticos. Os blocos polimerizados foram colados em suportes de madeira e seccionados com 3 μ m em micrótomo Leica, as quais foram posteriormente recolhidas em lâminas de vidro e coradas pela hematoxilina e eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Histoquímica

Para a aplicação da técnica do PAS o material foi fixado em solução aquosa de Bouin durante 72 horas e em seguida desidratado em quatro banhos de 15 minutos cada, em série crescente de etanol a 70%, 80%, 90%, 95%. Logo após, foi embebido e incluído em historesina Leica no interior de moldes plásticos. Os blocos contendo o material foram colados em suportes de madeira e seccionados com 3 µm em micrótomo Leica . Posteriormente as secções foram recolhidas em lâminas de vidro e submetidas à técnica de detecção de polissacarídeos totais pelo PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Todas as lâminas obtidas foram posteriormente montadas com Entellan para observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio Leica DM750 com câmera embutida ICC50 HD, no Laboratório de Histologia da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Sistemas reprodutores masculinos de cada espécie foram fixados em glutaraldeído 2.5% por 48 horas. Na sequência foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (80, 85, 90, 95 e 100%) em banhos de cinco minutos cada concentração, sendo que na acetona 100% foram dois banhos com o mesmo tempo. Após a dessecação em Critical Point Drying os exemplares foram colados com fita adesiva dupla face em suportes de alumínio, foram metalizados com ouro em "Sputtering", examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

Técnicas de Análises Moleculares

Os procedimentos que serão descritos a seguir foram realizados no laboratório GEBIOME coordenado pelo Prof. Fredy Arvey Rivera Páez, na Universidad de Caldas, Manizales, Colômbia, sob a supervisão do mesmo.

Extração de DNA

Foi realizada com o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) (segundo protocolo padrão sugerido pelo fabricante). A quantidade e a qualidade do DNA foram determinadas mediante espectrofotometria utilizando para isso o espectrofotômetro Nanovue Plus.

Amplificação

O DNA extraído de cada carrapato foi submetido à reação em cadeia de polimerase (PCR), amplificando um fragmento do segundo espaço transcrito interno (ITS2) do DNA ribossômico nuclear, presente em todas as espécies de carrapatos. Para a utilizado um par de iniciadores "primers" ITS2 (F) 5'-PCR, foi CCATCGATGTGAAYTGCAGGACA-3' (ZAHLER; GOTHE; RINDER, 1995) e MCLN (R) 5'-GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT-3' (MCLAIN et al., 1995), os quais correspondem a sequências da região 5.8S e 28S, respectivamente, portanto amplificando um fragmento de DNA contendo a sequência completa do ITS2 do rDNA, possuindo em torno de 1100 pb em carrapatos do gênero Amblyomma, com algumas pequenas variações intra e interespecíficas (MARRELLI et al., 2007).

Além disso, foi amplificado um DNA *barcoding*, da região 5' do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (COI) utilizando os primes standard para invertebrados LCO1490 (F) 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HCO2198 (R) 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (FOLMER et al., 1994) que amplificam um fragmento aproximado de 700pb para carrapatos.

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 μ L e volume final de 50 μ L contendo 28.4 μ L de agua ultrapura, 10 μ L de buffer 5X, 3 μ L de MgCl₂ (25mM), 4 μ L da mescla (10 mM) de dNTP's, 0.6 μ L de cada primer (25 μ M), 2 unidades de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega), 3 μ L de DNA do carrapato (aproximadamente 300 ng do DNA). A amplificação do gene COI mtDNA foi feita em termociclador (Techne *-TC-Plus*) tendo em conta as seguintes condições para: desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 5 ciclos de 94°C por 5 min, 46°C por 1 min 30s e 72°C por 1 min e 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min, concluindo a reação com uma extensão final a 72°C por 5 min.

A amplificação do gene ITS2 foi feita com o seguinte perfil térmico: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 36 ciclos de 95°C por 45s, 57°C por 1 min, e 72°C por 1 min e 30 s, concluindo a reação com uma extensão final a 72°C por 5 min.

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão de corrida TBE 1X pH 8.0 à 110v/50mA. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio e visualizado em foto documentador Gel Doc-It2 310 (UVP). Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo as instruções do fabricante e enviados para obter as sequencias de DNA a Macrogen Advancing Through Genomics – Corea do Sul (as sequencias obtidas serão depositadas no GenBank).

Análises das Sequências

A análise da qualidade das sequências de DNA foi realizada no programa Geneious Trial v8.14. Os alinhamentos das sequências realizaram-se no programa ClustaW (THOMPSON; GIBSON; HIGGINS, 2002) incluído no programa Mega 6 (TAMURA et al., 2013). A identificação e confirmação das espécies realizou-se mediante a estimativa de similaridade entre as sequências obtidas de sequências representativas derivadas do GenBank. No caso do gene COI, as sequências estudadas tiveram estimadas suas similaridades utilizando as sequências públicas do GenBank e do BOLD (Barcode of Life Data Systems, <u>www.barcodinglife.com</u>). A relação das espécies e seus respectivos códigos de acesso nos bancos de dados estão relacionadas na **Tabela 3**.

A divergência das sequências de DNA foi estimada utilizando-se o parâmetro de distância Kimura 2-K2P. Uma árvore foi construída pelo método Neighbor-Joining - NJ. As análises de suporte por "bootstrap" foram feitas em 1000 replicatas, o parâmetro K2P foi escolhido como modelo de distância genética no programa Mega 6.

	ITS2	168	COI
A. aureolatum	AF469611	JN800433	
A. cajennense ss	JN866864	KM042849	
A. maculatum		KT037681	
A. mixtum	KF527295	KM519935	KF200097
A. sculptum	IN866846	KT238826	GBCH10808-13
	011000010		(BOLD)
A trista	te AY887114	AY498563 (Brasil)	
A. <i>It iste</i>		JN180848 (Chile)	
D. nitens	KC503275		KF200099
O. rostratus		DQ295780	NC_023372
R. sanguineus	KF958400	JX997391	

Tabela 3 - Relação das espécies, genes utilizados e códigos de acesso no GenBank e BOLD

4. Resultados

Os resultados obtidos no presente trabalho estão aqui apresentados em cinco capítulos, sendo cada um composto por um artigo científico publicado ou submetido em periódicos científicos internacionais especializados na área objeto do estudo.

CAPÍTULO 1

Status: Publicado

SAMPIERI, B. R., Labruna, M. B., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (ACARI: IXODIDAE) *Amblyomma cajennese* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis.

Periódico: *Parasitology Research*, 113: 1511-1519, 2014. **DOI:** 10.1007/s00436-014-3795-y

CAPÍTULO 2

Status: Publicado

SAMPIERI, B. R., Furquim, K. C. S., De Carvalho, P. L. P. F., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense*.

Periódico: *Emergent Life Sciences Research*, 1(1), 26-37, ISSN 2395-6658, 2015.

CAPÍTULO 3

Status: Publicado

SAMPIERI, B. R., Calligaris, I. B., Matos, R. S., Páez, F. A. R., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. Comparative analysis of spermatids of *Rhipicephalus* sanguineus sensu lato (Ixodidae) and Ornithodoros rostratus ticks (Argasidae): morphophysiology aimed at systematics.

Periódico: *Parasitology Research*, 115: 735-743, 2016 **DOI:** 10.1007/s00436-015-4797-0

CAPÍTULO 4

Status: Publicado

SAMPIERI, B. R., Moreira, J. C. S., Páez, F. A. R., Camargo-Mathias, M. I. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics.

Periódico: *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **DOI:** dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2015.11.003

CAPÍTULO 5

Status: Em fase de análise e complementação de dados

SAMPIERI, B. R., Páez, F. A. R., Chierice, G. O., Nodari, E. F., Camargo-Mathias, M. I. Espermiocladística e filogenia molecular de espécies do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). Novas perspectivas na sistemática de carrapatos.

4.1. CAPÍTULO 1

Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (ACARI: IXODIDAE) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis.

Resumo

Os carrapatos estão classificados em três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nutalliellidae. A taxonomia e a filogenia dos ixodídeos ainda são temas discutidos pelos ixodologistas o que demanda a realização de estudos mais complexos para a resolução destes problemas. As espécies Amblyomma cajennese e A. aureolatum (Brasil) pertencem a dois complexos de espécies conhecidos como "complexo cajennese" e "complexo ovale" respectivamente e estão diretamente relacionadas à transmissão do agente causador da Febre Maculosa Brasileira, o que confirma a importância médica e veterinária destas duas espécies, bem como a necessidade de estudos morfológicos que permitam melhor entendimento no contexto da taxonomia, filogenia e controle das mesmas. Sob esta ótica, o presente estudo teve como objetivo caracterizar morfologicamente o sistema reprodutor masculino de A. cajennese e de A. aureolatum nos estágios jejum e com quatro dias de alimentação, buscando com isso obter informações que prmitam distinguir: a) as duas espécies ou os "complexos" aos quais elas pertencem e b) estudar um sistema interno dos carrapatos o qual tem potencial para ser alvo da ação de substâncias acaricidas. Para tanto, machos das duas espécies (em jejum e com quatro dias de alimentação) foram anestesiados a frio, dissecados e tiveram seus sistemas reprodutores retirados para aplicação das técnicas histológicas. Os resultados obtidos mostraram que a morfologia geral deste sistema é similar entre as duas espécies assim como o encontrado para outros ixodídeos. Diferenças foram encontradas no desenvolvimento das células do complexo glandular acessório e das células germinativas (espermatócitos), deixando claro que o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino de A. aureolatum inicia-se mais tardiamente quando comparado ao de A. cajennese. No entanto, durante o repasto sanguíneo o desenvolvimento de A. aureolatum se acelera de modo que os processos de maturação das células germinativas e atividade do complexo glandular tornam-se adiantados quando comparados aos de A. cajennese. Neste trabalho ficam estabelecidas as diferenças no desenvolvimento do sistema reprodutor masculino dos carrapatos A. aureolatum e A. cajennese ao mesmo tempo que disponibiliza informações que podem auxiliar no estabelecimento de novos métodos de controle utilizando este sistema como alvo de tais métodos.

ORIGINAL PAPER

Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennese* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis

Bruno Rodrigues Sampieri • Marcelo Bahia Labruna • Odair Correa Bueno • Maria Izabel Camargo-Mathias

Received: 11 December 2013 / Accepted: 28 January 2014 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Ticks are classified into three families: Argasidae, Ixodidae, and Nutalliellidae. The taxonomy and phylogeny within Ixodidae are still discussed by the specialists, thus requiring further studies. Amblyomma cajennese and Amblyomma aureolatum (Brazil) belong to two species complexes known as "cajennese" and "ovale", respectively, and are directly related to the transmission of the Brazilian spotted fever. This confirms the medical and veterinary significance of these species, as well as the need for further morphological studies that will bring a better understanding of their taxonomy, phylogeny, and control. In this context, the present study aimed to characterize the morphology of the male reproductive system of A. cajennese and A. aureolatum when unfed and after 4 days of feeding, thereby seeking to: (a) distinguish the two species or "complexes", and (b) study an internal system which has the potential to be targeted by acaricides. Therefore, males from both species (unfed and after 4 days of feeding) were cold-anesthetized, dissected, and had their reproductive systems removed for histological analysis. The results showed that the morphology of the male reproductive system is generally similar between both species, like in other Ixodidae ticks, exhibiting a multilobed accessory gland complex related to seminal fluid secretion, a pair of vasa deferentia and a pair of testes housing germ cells (spermatocytes) in different stages. The main differences were found in the development of the accessory gland complex cells and germ cells, showing that the maturation of the male reproductive system starts later in A. aureolatum, when compared to A. cajennese. However, during the blood meal, A. aureolatum

B. R. Sampieri · O. C. Bueno · M. I. Camargo-Mathias (⊠) UNESP, Rio Claro, SP, Brazil e-mail: micm@rc.unesp.br

M. B. Labruna USP, São Paulo, SP, Brazil development is increased, thus making germ cell maturation and gland complex activity higher than in *A. cajennese*. This study shows the differences in the development of the male reproductive systems of both species, while providing information that can assist in the establishment of new control methods.

Introduction

Ticks are arthropod ectoparasites of obligatory hematophagous habit throughout their ontogenetic cycle. They are part of the subphylum Chelicerata, subclass Acari, order Parasitiformes, suborder Ixodida, comprising three families: Argasidae, Ixodidae, and Nutalliellidae (Barker and Murrel 2002; Burger et al. 2012; Mangold et al. 1998a). Amblyomminae is among the five subfamilies that make up the family Ixodidae, with 130 species in the genus *Amblyomma* alone, 29 of them occurring in Brazil (Martins et al. 2010).

Phylogeny is not a consensus in Amblyomminae yet and new studies have been showing evidence of polyphyletism within the group, when the genus *Aponomma* was taxonomically extinct, having 20 of its species reclassified within *Amblyomma*, with the remaining species originating a new subfamily and genus, Bothriocrotoninae and *Bothriocroton*, respectively (Burger et al. 2012; Dobson and Barker 1999; Marrelli et al. 2007; Nava et al. 2009).

Likewise, evidence showing the existence of species "complexes" in certain geographic regions, such as the "cajennese complex" in South America, indicate that there are taxonomic divergences within the group. Therefore, further studies on the ecology, biogeography, morphology, and molecular biology of this family are needed (Guglielmone et al. 2003; Labruna et al. 2011). *A. cajennese* and *A. aureolatum* are directly related to the transmission of *Rickettsia rickettsii*, the causative agent of the Brazilian spotted fever in endemic regions of the country, where they are found parasitizing wildlife (passerines, rodents) and domestic animals (horses, dogs), as well as humans (Arzua et al. 2003; Guglielmone et al. 2003; Ogrzewalska et al. 2010).

The morphology and development of the male reproductive system and germ cells of arthropods have been used as a tool to obtain information about important aspects of the taxonomy and phylogeny of this group (Dallai et al. 2011). Such information can also be useful for developing new methods of tick control, because the male reproductive system could be targeted by acaricides (Oliveira et al. 2012).

Hence, given the scarcity of information on the dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks, this study aimed to characterize the morphology, analyze, and compare the male reproductive systems of two tick species of great medical importance in Brazil: *A. aureolatum* and *A. cajennese*. Individuals were studied when unfed and after 4 days of feeding, thus showing relevant morphological evidence for the genus phylogeny and what could be a new target to control these ectoparasites.

Materials and methods

Bioassays

In this study, 30 *A. cajennense* specimens (20 males and 10 females) and 30 *A. aureolatum* (20 males and 10 females) were used. *A. cajennense* specimens were obtained from colonies maintained in the Laboratory of Immunopathology at the Department of Veterinary Pathology FCAV-UNESP, Jaboticabal campus, SP, Brazil, and kindly provided by Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, whereas *A. aureolatum* specimens came from the colony maintained in the laboratory of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, at the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics (FMVZ) USP, São Paulo, Brazil.

A total of 10 unfed males of each species were analyzed in this study. In addition, New Zealand white rabbits that have never had contact with ticks were infested with 10 males and 10 females of each species, for female engorgement and oviposition (colony maintenance). Males were collected after 4 days of feeding, when many were in mating position (fixed to the female by ventral contact). Afterwards, they were dissected and fixed for application of histological techniques.

Histology of the male reproductive system

A. cajennense and *A. aureolatum* males, unfed and fed for 4 days, were collected and cold-anesthetized in a refrigerator. Afterwards, the specimens were dissected in Petri dishes containing phosphate-buffered saline—PBS (7.5 g/L NaCl, 2.38 g/

L Na₂HPO₄, and 2.72 g/L KH₂PO₄). Under a dissecting microscope, testes were removed and placed in fixative solution of 4 % paraformaldehyde for 48 h. Then, dehydration was carried out in four baths of 15 min each, with increasing ethyl alcohol concentrations: 70, 80, 90, 95 %. Soon after, they were soaked and embedded in plastic molds with Leica historesin. The blocks were glued on wood frames, sectioned with a microtome (3 μ m), with the sections collected on glass slides. After drying, the slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and mounted on Entellan[®] for observation and photographic documentation under a Leica DM750 photomicroscope.

Results

Morphology

The male reproductive system of unfed *A. aureolatum* and *A. cajennese* ticks was drawn from observations made under a dissecting microscope coupled to a camera lucida. The results showed that, in both species, this system is subdivided in the anterior and posterior regions, comprising a complex of multilobed accessory glands, being ventrally positioned to the opisthosoma and connecting to: (a) the ejaculatory duct at its ventral face and, (b) a pair of seminal vesicles and vasa deferentia at the dorso-lateral region. The posterior region is composed of a pair of elongated tubular testes positioned dorsolaterally to the opisthosoma and connected to the accessory gland complex at its proximal area by the vasa deferentia (Fig. 1). The drawing included only the dorsal view of the reproductive system; therefore, the spongy lobe could not be represented because it is ventrally located.

Histology

Histological analyses showed that *A. aureolatum* and *A. cajennese* testes are divided into three regions, classified according to stage of germ cell development, namely: (a) proximal region, nearest the gland complex and where immature germ cells are found; (b) median region, where germ cells at an intermediate developmental stage are located; and (c) distal region, further away from the gland complex, where germ cells are at an advanced stage of development (Fig. 2).

A. aureolatum males

Unfed ticks

Unfed ticks showed the accessory gland complex externally lined by simple epithelium resting on a basement membrane, and secretory cells with large nuclei (Fig. 3a). The lumens of the main and side lobes are dilated with little secretion (Figs. 3b, c).



Fig. 1 Schematic representation of the male reproductive system of *A. aureolatum* and *A. cajennense*, showing: *RSAR* reproductive system anterior region, *AG* accessory gland complex, *ADL* antero-dorsal lobe, *LDL* latero-dorsal lobe, *PDL* postero-dorsal lobe, *PLL* postero-lateral lobe, *SV* seminal vesicle, *VD* vasa deferentia, *RSPR* reproductive system posterior region, *T* testis

Small spermatocysts with spermatocytes containing large nuclei and condensed chromatin were observed in the distal region of the testes (Fig. 3d, h). Spermatocysts still in formation, with spermatocytes in the final stages of cell division, were observed in the proximal region (Fig. 3e, f).

Fed ticks

After 4 days of feeding, the male reproductive system had the accessory gland complex lined externally by simple epithelium, also resting on a basement membrane (Fig. 4a, b, c, d). Secretory cells are observed below this epithelial layer. These cells are not evidenced by their boundaries, but by the strongly hematoxylin-stained nuclei. Secretion is observed in the lumen of glands that form the complex (Fig. 4a c, d,).

The dorsal and dorso-lateral lobes of the gland complex show cells distributed in layers, making their large and rounded hematoxylin-stained nuclei evident. However, the cell



Fig. 2 Schematic representation of *A. aureolatum* and *A. cajennense* testes, and histological sections showing: *TPR* testis proximal region, where immature germ cells are found; *TMR* testis median region, where germ cells are found at intermediate stage of development; *TDR* testis distal region, where germ cells are found at a more advanced stage of development; *sc* spermatocyst; *st* spermatocyte; *nu* nucleus

boundaries and cytoplasm are not very evident (Fig. 4b, d). The secretory cells located in the layer close to the lumen are covered by secretion, often in the form of granules stained by eosin. The secretion is discharged into the lumen, being therein deposited in the form of granules (with membrane) or in the free form (Fig. 4b, d).

The spongy lobe of the gland complex, located in the ventral region, has also elongated cells with elongated nuclei and cytoplasm filled with large eosin-stained secretory granules (Fig. 4c).

A. aureolatum testes are enveloped by the basement membrane; spermatocytes at different stages of development can be observed (Fig. 4e–g). Spermatocysts are observed at the proximal and median regions, where germ cells (spermatocytes) are seen well compacted. Hence, the cell boundaries cannot be observed, but nuclei immersed in a strongly acidophilic cytoplasm are evident (Figs. 4e, f). Larger spermatocysts containing large spermatocytes with round nuclei and decondensed chromatin, stained cytoplasm and

Fig. 3 Histological sections of the male reproductive system of unfed A. aureolatum. Hematoxylin-eosin stain. a-c Accessory gland complex showing: a antero-dorsal lobe (ADL) and antero-ventral lobe (AVL) lined by simple epithelium (se) with slightly dilated lumen (lu) containing secretion (S). b Lateral lobe with slightly dilated lumen (lu) and apparently without secretion; testis (T) with germ cells at an early organization stage within the spermatocysts (circle) and at the final stage of division (dotted circle). c Magnification of the antero-dorsal lobe (ADL) and antero-ventral lobe (AVL) lined by simple epithelium (se), the latter with slightly dilated lumen (*lu*) containing secretion (S). d-f Testes (T) lined by the basal membrane (Bm), with spermatocysts at an early organization stage (ellipse) containing germ cells at the final division stage (arrow). **g**-**h** testes (t) lined by basement membrane (Bm), with formed spermatocysts (ellipse) containing spermatocytes (st) in maturation process (arrow), nucleus (nu), spermatocyst (sc)



evident cell boundaries are observed in the distal region. At this stage, the presence of cytoplasmic bridges between spermatocytes can be observed (Fig. 4g, h).

A. cajennense males

Unfed ticks

This species has a male reproductive system composed of an accessory gland complex similar to *A. aureolatum*, with simple epithelium lining the complex lobes, secretory cells with large nuclei and secretion in the lobes lumens (Fig. 5a–d).

Spermatocysts with spermatocytes at the intermediate stage of development, with large nuclei spaced closely apart, are observed in the testis proximal region. Cell boundaries are not evident (Fig. 5h).

Spermatocytes in the distal region are larger than those in the anterior region, and cell boundaries are not evident. The nuclei are spaced further apart, which indicates higher cytoplasm development (Fig. 5e–g).

Fed ticks

The histology and general morphology of the male reproductive system in fed *A. cajennense* is similar to *A. aureolatum*.

Fig. 4 Histological sections of the male reproductive system of A. aureolatum after 4 days of feeding. Hematoxylin-eosin stain. **a**–**c** Accessory gland complex showing: (a) antero-dorsal lobe (ADL) and postero-dorsal lobe (PDL) lined by simple epithelium (se) with dilated lumen (lu) containing secretion (arrow); b and d lateral lobes with less dilated lumen (lu) containing secretion (arrow), c spongy lobe (SL) with dilated lumen (lu) filled with secretory granules (arrow). The nuclei (arrowhead) are poorly observed, \mathbf{e} - \mathbf{g} testes (T) lined by basement membrane (Bm) with spermatocysts (sc) containing immature and mature spermatocytes (st); e Testis overview (T). f Testis with spermatocyst (sc) and immature spermatocytes (st). g Mature spermatocytes (st) in the prespermatid stage; nucleus (arrowhead) cytoplasmic bridges (circle) secretion (arrow)



The gland complex is lined by a simple epithelium, and secretory cells are arranged in multiple layers.

As in *A. aureolatum*, the secretion dynamics of these cells results in the release of secretory granules into the lumen. These secretory cells show strongly stained nuclei and apparently condensed chromatin. The spongy lobe of the gland complex is not observed in this species (Fig. 6a-c).

A. cajennese testes have the same elongated tubular shape and are lined by simple squamous epithelium resting on a basement membrane. Spermatocysts with spermatocytes at different developmental stages are observed. Spermatocysts containing spermatocytes, cells with strongly stained nuclei and highly condensed chromatin, are observed in the proximal region. Cell boundaries are not evident (Fig. 6d).

Spermatocysts are larger in the median region than in the proximal region. They contain cells in an intermediate stage of development showing round nuclei with condensed chromatin. Cell boundaries are not very evident (Fig. 6e).

Larger spermatocysts containing large spermatocytes with round nuclei, decondensed chromatin, and strongly stained cytoplasm are observed in the distal region. Cell boundaries are not very evident (Fig. 6f).
Fig. 5 Histological sections of the male reproductive system of unfed A. cajennese. Hematoxylineosin stain. a-c accessory gland complex showing: the anterodorsal lobe (ADL) and lateral lobe (LL) lined by simple epithelium (se) with non-dilated lumen (lu) containing little secretion (S). e Testis (T), spermatocysts (ellipse) containing spermatocytes (st) at an early stage of maturation. f-h Testis (T), where the basement membrane is observed (Bm), spermatocysts (ellipse) containing immature spermatocytes (st), nucleus (nu), spermatocyst (sc)



Discussion

Amblyomma ticks have great medical importance in Brazil, because they are associated with the transmission of pathogens to humans, primarily *R. rickettsii*, which causes the Brazilian spotted fever. *A. cajennese*, also known as star tick and commonly found in areas of urban expansion, is the most important species in the transmission of this disease (Flechtmann 1975; Labruna et al. 2008; Ogrzewalska et al. 2011). However, there are other species in the country that transmit the Brazilian spotted fever, or have the potential to do so, such as *A. aureolatum*, *A. ovale*, and *Rhipicephalus sanguineus* (Gazêta et al. 2009; Labruna et al. 2008).

Besides the medical and veterinary importance of *Amblyomma* ticks, the phylogeny and taxonomy of this group, as for the whole Ixodidae family, is also the subject of many studies, because a high degree of polymorphism is found in some species, when geographically distinct populations are compared (Mangold et al. 1998b). The most evident cases in Latin America resulted in investigations that led to two groups of *Amblyomma* species: the "*cajennense* complex" and "*ovale* complex" (Guglielmone et al. 2003; Labruna et al. 2011).

Even after the determination of the existence of such "complexes", differences in taxonomic classification and phylogenetic position within these groups are significant and have generated controversy, suggesting the need for revisions and new investigations. Thus, comprehensive studies on

Fig. 6 Histological sections of the male reproductive system of A. cajennese after 4 days of feeding. Hematoxylin-eosin stain. **a**–**c** accessory gland complex showing: the antero-dorsal lobe (ADL) and postero-dorsal lobe (PDL) lined by simple epithelium (se) with dilated lumen (lu) containing secretion (arrow) and the lateral lobes with dilated lumen (lu) containing secretions (arrow). \mathbf{d} - \mathbf{f} testes (T), with the basement membrane (Bm), spermatocysts (sc) containing immature, intermediate and mature spermatocytes (st). d and f spermatocysts (sc) with immature spermatocytes (et*). e Intermediate spermatocytes (et**) with condensed nucleus and mature spermatocytes (et***) with rounded nucleus and decondensed chromatin, nucleus (arrowhead), secretion (arrow)



morphology, biology, ecology, and molecular biology of these species are required (Nava et al. 2009).

Therefore, this study aimed to describe and compare the morphology of the male reproductive system of two *Amblyomma* species, *A. aureolatum* and *A. cajennense*, when unfed and after 4 days of feeding on rabbit hosts. These species were chosen because they are representative of the "*ovale*" and "*cajennese* complexes" and are likely to generate useful information on the taxonomy and phylogeny of these groups. In addition, this study can expand actual knowledge on the male reproductive system of ticks, which has been little studied, despite being responsible for germ cell production and the consequent reproductive success of the species. It is worth noting that this system can be an important target of acaricides. Thus, broader knowledge on the male reproductive system can lead to new ways of controlling these parasites.

Histological analyses carried out in this study revealed that *A. cajennese* and *A. aureolatum* have a similar male reproductive system, regarding morphology and the location of the accessory gland complex (antero-ventral region), which is

connected by the seminal vesicles and the vasa deferentia to two elongated tubular testes, dorsolaterally located on the opisthosoma. These findings corroborate previous results by Anholeto (2012) and Oliveira et al. (2012), when analyzing the male reproductive system of *A. cajennese* and *R. sanguineus*, respectively.

The results obtained here also show the high secretory activity in the cells of the accessory gland complex of both species. The presence of secretion in the lumen of the gland lobes, as well as in the secretory cells cytoplasm, was observed mainly in fed animals. According to some authors, secretion production by these glands is related to the need of seminal fluid formation, which is responsible for: (a) the activation of spermatozoa and their mobility, and (b) the production of the spermatophore, which stores and protects the gametes during mating (Anholeto 2012; Sonenshine 1991).

Furthermore, the data also showed that despite the feeding stages being the same for both species (unfed and after 4 days), the secretory activity of the accessory gland complex in A. aureolatum proved to be more intense than in A. cajennese. This is mainly because the spongy lobe has been observed in A. aureolatum, but it was not in A. cajennese. According to Sonenshine (1970), there are two types of lobes in the gland complex: the granular lobe, which represents most lobes found in the complex, and the spongy lobe, which in the early stages of development could be mistaken by the granular type. However, once developed, the spongy lobe shows cells full of secretion, with little evident nuclei and cell boundaries. The spongy lobe in the gland complex of different species may vary, occurring as a single structure or as two or more lobes, as in Ornithodoros kelleyi, which shows a bifurcated spongy lobe, and Hyalomma marginatum, which has three lobes with features similar to the spongy lobe. Unlike the other species previously mentioned, this kind of lobe is not found in Rhipicephalus appendiculatus (Sonenshine 1970).

According to the same author, in studies where the feeding stage was not considered, the spongy lobe: (a) may not be observed; (b) may not be evident; or (c) may have been mistaken by the granular type, since the cells of the spongy lobe initiate secretion synthesis only when ticks are feeding.

The spongy lobe was not observed in unfed *A. aureolatum*, but it could be seen as a single structure after 4 days of feeding. In *A. cajennese*, the spongy lobe was not observed at any of the feeding stages studied, which could indicate: (a) that this species does not have this kind of lobe in the gland complex, or (b) that this species develops this lobe after 5 days of feeding. The first hypothesis seems more likely. Anholeto (2012), when studying the development of the male reproductive system in *A. cajennese*, has not observed the spongy lobe until the tenth day of feeding.

The presence of the spongy lobe in *A. aureolatum* and its absence in *A. cajannense*, in individuals at the same feeding stage (4 days), could indicate an important difference in the gonadotrophic cycle of these species, as they had very similar blood meal periods (between 12 and 16 days under laboratory conditions). Nevertheless, they would be representatives of distinct species complexes, "*cajannense* complex" and "*ovale* complex" within the same genus (Flechtmann 1975; Guglielmone et al. 2003; Labruna et al. 2011).

As for the testes, their morphology and germ cell development were similar. In both species, testes were elongated and tubular, lined by simple squamous epithelium where spermatocytes, stored inside spermatocysts, were found at different developmental stages, depending on the region analyzed. For example, the proximal region had seemingly smaller spermatocytes, with prominent nuclei and inconspicuous cell boundaries, whereas the median region had larger spermatocytes, which were better organized inside spermatocysts showing cell boundaries. Spermatocytes found in the distal region were rounded and even larger, and had very evident cell boundaries. A significant difference in the development of germ cells was observed in unfed individuals. *A. aureolatum* had many spermatocytes undergoing cellular division, but these cells were already individualized and at an early maturation process in *A. cajennense*, indicating a late spermatocyte development in *A. aureolatum*. In *A. cajennense*, cell division would probably terminate at the nymph stage, corroborating Sonenshine (1991) on some Ixodidae species.

In *A. aureolatum*, the process of cell differentiation in more mature spermatocytes was confirmed by the presence of cytoplasmic bridges between some cells. According to Oliver and Brinton (1972), when studying the spermatogenesis of *Dermacentor occidentalis*, this was a phenomenon that would allow the synchronization of this differentiation within the same spermatocyst. Anholeto (2012) also observed these cytoplasmic bridges occurring between spermatocytes in *A. cajennese*, but only after the sixth day of feeding, which would indicate a more rapid development of the germ cells in *A. aureolatum*, although the process of cell division happens later in the first species.

The pattern of germ cell development in male ticks observed here corroborates the results obtained in other studies, confirming the direct and indirect influence of the feeding stage in this process. In adult ticks, feeding is the main stimulus for the development of primary spermatocytes, which were quiescent in the engorged nymphs (Anholeto 2012; Coons and Alberti 1999; Oliveira et al. 2012; Sonenshine 1991). However, the data found in this study show that food is not the only determining factor for spermatocytes to restart their development until they reach the spermatid stage (pre-spermatozoon stage). The development of these cells in individuals of both species at the same feeding period suggested that the male reproductive system matures faster in A. aureolatum than in A. cajennese. This is clear not only by the presence of spermatocytes at later stages in A. aureolatum, but also by the intense secretory activity of the accessory gland complex in the synthesis of the material that will participate in the composition of the seminal fluid and spermatophore.

Dallai et al. (2011), when studying the male reproductive system of insects, have found that spermatid and spermatozoon ultrastructures provide important data that may help to elucidate taxonomic problems within arthropods. This information reinforces the importance of knowledge on the morphology and development of the male reproductive system of *Amblyomma* ticks, object and purpose of the present study.

Acknowledgments This study was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) through grant no. 2012/02384-8, by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoameto de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) through research fellowships to M.I. Camargo-Mathias.

References

- Anholeto LA (2012) Descrição morfo-histológica dos testículos de *Amblyomma cajennese* em jejum e alimentados. Dissertation, UNESP
- Arzua M, Da Silva MAN, Famadas KM, Beati L, Barros-Battesti DM (2003) Amblyomma aureolatum and Ixodes auritulus (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. Exp Appl Acarol 31:283-296
- Barker SC, Murrell A (2002) Phylogeny, evolution and zoogeography of ticks: a review of recent progress. Exp Appl Acarol 28:55–68
- Burger TD, Renfu S, Beati L, Miller H, Barker SC (2012) Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. Mol Phylogenet Evol 64:45–55
- Coons LB, Alberti G (1999) Acari: Ticks. In: Harrison FW (ed) Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley, New York, pp 267–489
- Dallai R, Mercati D, Carapelli A, Nardi F, Machida R, Sekiya KB, Frati FA (2011) Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta. Arthropod Struct Dev 40:77–92
- Dobson SJ, Barker SC (1999) Phylogeny of the hard ticks (ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates thet the genus aponomma is paraphyletic. Mol Phylogenet Evol 2:288–295

Flechtmann CHW (1975) Elementos de Acarologia. Nobel, São Paulo

- Gazeta GS, Souza ER, Abboud-Dutra AE, Amorim M, Barbosa PR, Almeida AB, Gomes B, Gehrke FS, Marrelli MT, Schumaker TTS (2009) Potential vectors and hosts of rickettsia spp: epidemiological studies in the Vale do Paraí'ba, state of Rio de Janeiro/Brazil. Eur Soc Clin Microbiol Infec 15:269-270
- Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, Venzal JM, Arzua M, Keirans JE (2003) Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) and Amblyomma ovale Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Vet Parasitol 113:273–288
- Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins T, Pinter A, Horta MC (2008) Comparative Susceptibility of Larval Stages of Amblyomma aureolatum, Amblyomma cajennense, and Rhipicephalus sanguineus to Infection by Rickettsia rickettsii. J Med Entomol 45(6):1156–1159
- Labruna MB, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Cabrera RR (2011) Cross-mating experiments with geographically different populations

of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 54: 41–49

- Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S (1998a) 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 84:31–37
- Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S (1998b) Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 84:478–484
- Marrelli MT, Souza LF, Marques RC, Labruna MB, Matioli SR, Tonon AP, Ribolla PEM, Marinotti O, Schumaker TTS (2007) Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. J Med Entomol 44(2):222–228
- Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Labruna MB (2010) Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions and identification key. Tick Tick Borne Dis 1:75–99
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ (2009) An overview of systematics and evolution of ticks. Front Biosci 14:2857–2877
- Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB (2010) Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. Parasitol Res 106: 809–816
- Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB (2011) Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. Parasitol Res 108:665–670
- Oliveira PR, Calligaris IB, Roma GC, Bechara GH, Camargo-Mathias MI (2012) Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, tegument, Malpighian tubules and midgut on the detachment day. Micros Res Techniq 75:727–736
- Oliver JH, Brinton LP (1972) Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea) Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, Dermacentor occidentalis Marx (Ixodidae). J Parasitol 58:365–379
- Sonenshine DE (1970) A contribution to the internal anatomy and histology of the bat-tick *Ornithodoros kelleyi* Cooley and Kohls, 1941.
 II. The reproductive, muscular, respiratory, secretory and nervous system. J Med Ent 7:298–312
- Sonenshine DE (1991) Biology of ticks. New York, Oxford

4.2. CAPÍTULO 2

Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of *Amblyomma cajennense*.

Resumo

Os carrapatos do gênero Amblyomma representam um importante grupo de relevância médica e veterinária por estarem relacionados com a transmissão de patógenos a animais domésticos, silvestres, de corte e humanos. No Brasil, a espécie Amblyomma cajennense está intimamente relacionada com a transmissão à humanos da bactéria Rickettsia rickettsii, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB), principalmente em áreas endêmicas no Estado de São Paulo, Brasil. O manejo e controle deste carrapato tem levado produtores de animais de corte a uma má administração de acaricidas químicos sintéticos, o que por sua vez gera problemas ambientais e seleciona populações resistentes a estas substâncias. Sendo assim, a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas no controle de carrapatos é latente, visando sua eficiência e baixa toxicidade ao ambiente e aos organismos não-alvo. Assim, na busca por novos métodos de controle destes carrapatos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona como agentes modificadores da morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de A. cajennense visando um método alternativo no controle destes. Para tanto, os ésteres foram incorporados a alimentação de coelhos hospedeiros nas concentrações de 5g/Kg de ração e 15g/Kg de ração, como dieta especial e a seguir foram infestados com carrapatos A. cajennense. Os carrapatos machos foram coletados dos hospedeiros e tiveram seu sistema reprodutor retirado e processado para as técnicas histológicas e histoquímicas. Os resultados obtidos mostraram que os efeitos do produto foram mais acentuados quando os ésteres foram oferecidos na maior concentração, provocando alterações morfisiológicas nas células secretoras do complexo glandular acessório e alterando o teor da secreção das mesmas, além de ter provocado alterações morfológicas nas espermátides. A ação dos ésteres sobre o sistema reprodutor masculino de carrapatos A. cajennense modificou dinâmica do desenvolvimento e a produção dos gametas afetando provavelmente a produção do espermatóforo e do fluido seminal, confirmando que esse grupo de substâncias tem potencial para interferir num dos processos biológicos mais importantes do animal que é a reprodução.

Research Article

Ricinoleic acid esters from castor oil modifying male reproductive system of Amblyomma cajennense (Fabricius 1787)

Bruno Rodrigues Sampieri, Karim Christina Scopinho Furquim, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, Odair Corrêa Bueno, Maria Izabel Camargo-Mathias

Received: 11 March 2015 Accepted: 2 April 2015

Abstract

Ticks of the genus Amblyomma have medical and veterinary importance because they can transmit pathogens to humans, as well as domestic, wild and livestock animals. The management and control of this tick has led livestock farmers to an inadequate use of synthetic chemical acaricides, consequently creating environmental problems and selecting resistant populations. Thus, the search for new substances that can be efficient in tick control and have low toxicity to the environment and non-target organisms is latent. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of ricinoleic acid esters from castor oil as modifying agents of A. cajennense male reproductive system, seeking an alternative method to control these parasites. Hence, esters from castor oil were incorporated to the diet of rabbits, which were then infested with A. cajennense. Male ticks were collected from the hosts and their reproductive systems were removed and prepared for histological and histochemical techniques. The results showed that the effects of esters became more evident at the highest concentration available, leading to morphophysiological changes in the secretory cells of the accessory gland complex, altering the secretion content and causing morphological changes in spermatids. The esters changed development dynamics and gamete production, probably affecting the production of spermatophores and seminal fluid. Our results confirmed that these substances have the potential to interfere with reproduction, one of the most important biological processes for a species.

Keywords *Amblyomma cajennense*, esters, control, castor oil, testes

Introduction

Ticks of genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) are widely distributed and have great medical and veterinary importance, mainly because they are related to the transmission of pathogens to humans, as well as domestic, wild and livestock animals, in addition to lacking preferred hosts throughout their ontogenic development (Alonso-Diaz et al. 2013, Senra et al. 2013, Krawczak et al. 2014).

In Brazil, *Amblyomma cajennense* is closely related to the human transmission of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the etiologic agent of the Brazilian spotted fever (BSF). The capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) is an important wild host, which acts as an amplifier of infection within *A.cajennense* populations, especially in endemic areas in the State of São Paulo, Brazil (Ogrzewalska et al. 2011, Krawczak, et al. 2014).

A. cajennense, along with *Rhipicephalus* annulatus and *Ripicephalus microplus*, infests livestock in countries, such as Kenya and Tanzania, in West Africa, and Mexico, in North America. This high incidence hinders the management and control of these ticks, leading to an inadequate use of synthetic chemical acaricides, which in turn causes environmental problems and the selection of resistant populations (Alonso-Diaz et al. 2013, Senra et al. 2013).

Thus, the search for new acaricides that can be efficient in tick control and have low toxicity to the environment and non-target organisms is latent.

Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho

UNESP, Department of Improvement and Animal Nutrition, Botucatu-SP.Brazil.

Bruno Rodrigues Sampieri, Karim Christina Scopinho Furquim, Odair Corrêa Bueno, Maria Izabel Camargo-Mathias UNESP, Department of Biology, Rio Claro-SP. Brazil.

Recent investigations have focused mainly on substances of vegetable origin, such as oils and extracts, which have shown good results. For example, eugenol and thymol isolated from Thymus vulgaris and Dianthus carvophylus oils. respectively, have been used on A. cajennense, Dermacentor nitens and R. sanguineus (Senra et al. 2013). Andiroba oil has been tested against R. sanguineus (Vendramini et al. 2012). Tagetes patula extract has been assessed against R. sanguineus larvae (Politi et al. 2012), while ricinoleic acid esters from castor oil have been tested on R. sanguineus (Arnosti et al., 2011a,b, Sampieri et al. 2012, Sampieri et al. 2013).

In addition to the environmental benefits of using substances of vegetable origin, the medical, veterinary and economic importance of A. caiennense has reinforced the need for new control methods. In this sense, the present study aimed to evaluate the effect of ricinoleic acid esters from oil as modifying agents of castor the morphophysiology of Α. cajennense male reproductive system, thus confirming the potential of these substances for tick control.

Material and Methods

Bioassays

Three experimental groups were determined for this study: **Control Group (CG), Treatment Group 5** (**TG5**) and **Treatment Group 15 (TG15).** A host rabbit (New Zealand White, Botucatu variety) was used for each group. The esters of ricinoleic acid from castor oil was produced and kindly provided by Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice from Department of Chemistry and Molecular Physics from USP – São Carlos, SP, Brazil.

The esters were added to the diet of the experimental groups (**TG5** and **TG15**). Standard rabbit food (Nutriara[®]) was crushed, the ricinoleic acid esters from castor oil were added before it was pelletized again, according to the methodology adopted by Arnosti et al. (2011a) and Sampieri et al. (2012). This diet was offered to the hosts for 15 days before *A. cajennense* infestation, in order to familiarize them with the new food. All three rabbits, from each group, were weighed at the beginning of the experiment and at its end. Weight data were collected and organized into a table, and then the differences between the groups (**GC, GT5 and GT15**) were calculated in ANOVA.

The food offered to each rabbit was also weighed daily, registered in a table to average calculation of its consumption. Those results are summarized in Table 1.

 Table 1 Average feed intake by each rabbit from the three

 experimental groups during 30 days of experiment

Experimental Groups	Average Feed Intake
Control Group	149,79 g
Treatment Group 5	188,70 g
Treatment Group 15	169,88 g

The infestation in each experimental group is given as follows:

All hosts received the diet for 15 days before being infested with 16 pairs of *A. cajennense* ticks each. The period of blood feeding on the host lasted about 15 days, for which the host continued to receive the same diet.

Control Group (CG): received standard Rabbit food.

Treatment Group 5 (TG5): received a special diet prepared with standard rabbit food added with ricinoleic acid esters from castor oil (5 g/kg).

Treatment Group 15 (TG15): received a special diet prepared with standard rabbit food added with ricinoleic acid esters from castor oil (15 g/kg).

After the 12th day of infestation, when the germ cells are fully developed, male ticks from the three experimental groups were collected whenever they were in copulation position (ventral contact with the female in engorgement). Male ticks were cold-anesthetized in a refrigerator and dissected to remove the reproductive system, which underwent histological and histochemical analyses.

The present study was approved by the Ethical Committee in Animal Use (Comitê de Ética de Uso Animal-CEUA) from the Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP, Brazil, under process number 017/2012 and protocol 1422.

Histology

The male reproductive system of 24 *A. cajennense*ticks, 8 in each group (CG, TG5 and TG15), were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70, 80, 90 and 95%) for 15 min at each concentration. Then, the samples were embedded in Leica historesin for 72 h and polymerized in Leica historesin. Later, the blocks were sectioned with a

Leica microtome. The sections $(3\mu m)$ were placed on glass slides and stained with hematoxylin-eosin (HE) for photo documentation using a Leica DM750 light microscope.

Histochemistry

Periodic acid-Schiff (PAS) staining for total polysaccharides detection

Eight male ticks from each group (CG, TG5 and TG15) had their reproductive systems removed and fixed in aqueous Bouin's fluid for 72 h. The samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70, 80, 90 and 95%) for

15 min at each concentration. Afterwards, the samples were embedded in Leica historesin for 72 h and polymerized in Leica historesin. Later, the blocks were sectioned with a Leica microtome. The sections $(3\mu m)$ were placed on glass slides and subjected to PAS staining for photo documentation using a Leica DM750 light microscope.

Results

Effect of Feed Intake on Rabbit weight

Rabbits from all three groups ate normally, showing that taste and texture of the special diet was well.



Figure 1 (A-J) Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Control Group (GC) stained with Hematoxylin-Eosin.

(A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the glandular complex lobes, the testes (**T**) connected to the vasa deferentia (**VD**) and the seminal vesicle (**SV**); (B-C) Detail of the postero-dorsal lobe (**PDL**) exhibiting granular (**gc**) and agranular cells (**ac**); (D-E) Detail of the spongy lobe (**SL**) with elongated cells full of secretion; (F-J) Testis exhibiting spermatocysts (**ec**) housing spermatids in development and seminal vesicle full of spermatozoa (**sp**). **ADL**=Antero Dorsal Lobe; circle=cytoplasmic bridges; **ep**=epithelium; **lu**=lumen; **nu**=nucleus; **RDL**=Lobe Distal Region; **RML**=Lobe Midle Region; **RPL**=Lobe Posterior Region; **S**=secretion; **sg**=secretory granules.

accepted by the animals. All three groups showed no health problems as diarrhea or malnutrition consequences. The differences in weight gain between animals were not significant (P=0.30891), confirming the animals nutrition and health status.

Control Group (CG)

The male reproductive system of ticks from this group has general morphology identical to that described in literature, showing a multilobed accessory gland complex, a pair of seminal vesicles, a pair of vasa deferentia and a pair of elongated tubular testes containing germ cells.

A layer of epithelial cells lines the lobes of the accessory gland complex, being more evident in the postero-dorsal lobe (PDL). This lobe shows many secretory cells under the lining epithelium, with their nuclei strongly stained by hematoxylin and secretory granules weakly or strongly stained (Fig. 1A, B and C).



Fig. 2 - Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Control Group (GC) with PAS reaction. (A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the glandular complex lobes stained with variable intensity, the testes (T) connected to the vasa deferentia (VD) and the seminal vesicle (SV); (B) Distal portion of the testis connected to the VD, exhibiting spermatozoa strongly stained by the technique; (C) Spongy lobe (SL) exhibiting elongated cells negative to the PAS technique and intercellular spaces (setae head) housing positive-stained secretion; (D-F) Testis exhibiting spermatocysts (ec) housing spermatids in development and spermatozoa (sp) in its lumen. (H) Detail of spongy lobe, exhibiting elongated cells between intercellular spaces containing secretion positive-stained; (I) Detail of the proximal portion of the testis connected to the vasa deferentia, where it can be observed spermatozoa positive-stained. ADL=Antero Dorsal Lobe; Bm=basal membrane; circle=cytoplasmic bridges; ep=epithelium; LDL=Latero-Dorsal Lobe; lu=lumen; nu=nucleus; PDL= Postero-Dorsal Lobe; S=secretion; sg=secretory granules.



Fig. 3 - Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Treatment Group 5 (**GT5**) stained with Hematoxylin-Eosin. (A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the Antero Dorsal Lobe and the Spongy Lobe of the glandular complex exhibiting tissue disorganization and cell damages; (B-C) Antero Dorsal Lobe in detail showing vacuoles in its cells; (D-E) Seminal vesicles full of spermatozoa with none morphological alterations; (F) Transversal section of the testis exhibiting spermatids in development with vacuoles (circle) in its cytoplasm; (G-I) Detail of the ADL and the SL exhibiting cells with cytoplasmic damaged (vacuoles). **ac**=agranular cells; **ADL**=Antero Dorsal Lobe; **circle**=vacuoles; **ep**=epithelium; **lu**=lumen; **nu**=nucleus; **S**=secretion; **sg**=secretory granules; **SV**=seminal vesicle

; **sp**=spermatozoa; **T**=testis.

In the same lobe, it is possible to classify at least two cell types, based on the released secretion: a) granular cells, when the secreted material is seen in the cytoplasm, as granules; b) agranular cells, where secretion is seen dispersed in the cytoplasm. The granular cells occupy most of the antero-dorsal (ADL) and postero-dorsal lobes (PDL), being observed in the distal and proximal regions with purple secretory granules. Agranular cells are observed in the lobe median region, showing the secretion stained in light purple by hematoxylin (Fig. 1B).

The lateral-dorsal lobes (LDL) have elongated secretory cells, with barely evident nuclei and cytoplasm with large eosin-stained secretory granules. Thus, the LDL are here called spongy lobes (SL) (Fig. 1A, B, D and E).

The testes are covered by a squamous epithelium resting on a basement membrane, with large spermatids enveloped by the same epithelium, in the distal portion. Spermatids are seen in the spermatocysts at an advanced stage of development, with large and rounded nuclei, heterogeneous cytoplasm, evident cell boundaries and cytoplasmic bridges (Fig. 1F, G, I and J). Some spermatozoa at the final stages of maturation are observed in the testis lumen (Fig. 1F and G).

Spermatozoa reaching the lumen of the vasa deferentia are seen in the testes proximal region. The vasa deferentia are tubular and lined by stratified cuboidal epithelium, with an outer layer facing the cavity of the tick body and an inner layer facing the lumen (Fig. 1A and D).

The spermatozoa seen reaching the lumen of the vasa deferentia are completely different from the spermatids observed in the testis distal region, and the cell as a whole is strongly stained by hematoxylin (Fig. 1A and H).

The seminal vesicles are parallel and have the appearance of bags lined by simple squamous epithelium, showing a lumen filled with mature spermatozoa (Fig. 1A, D and H).The accessory gland complex shows variation in PAS staining, according to the type of lobe analyzed. In the PDL and ADL, the cytoplasm of granular and agranular cells, as well as the epithelial cells, are general positively stained. However, the secretory granules show moderately to strongly positive staining (Fig. 2A, G and H).

The SL basement membrane is positively stained through the PAS method, but the secretory cells in these lobes are negative. Some SL regions



Fig. 4 - Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Treatment Group 5 (**GT5**) with PAS reaction(A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the Antero-Dorsal Lobe (**ADL**), Postero-Dorsal Lobe (**PDL**) and the Spongy Lobe (**SL**) of the glandular complex connected to a pair of Seminal Vesicles (**SV**); (B-C) Transversal section of the testis exhibiting spermatids in development with vacuoles (circle) in its cytoplasm which shows a medium-positive stained; (D-E) Detail of the ADL with negative-stained agranular cells and secretion granules in its lumen; (F) SL in detail with elongated cells negative-stained and intracellular secretion weakly-stained (ellipse); (E) Detail of spermatozoa inside the SV strongly-positive to the technique. **ac**=agranular cells; **Bm**=basal membrane; **ep**=epithelium; **lu**=lumen; **nu**=nucleus; **S**=secretion; **sg**=secretory granules; **sp**=spermatozoa; **T**=testis; **v**=vacuoles.

show intercellular spaces filled with PAS-stained secretion (Fig. 2A, C and I).

The testes basement membrane shows a positive staining, as well as the SL. Spermatids within spermatocysts present homogeneous

cytoplasm and cellular boundaries with positive staining. PAS-positive spermatozoa are seen in the lumen (Fig. 2D, E and F). Spermatozoa located in the testis proximal region are strongly PAS-positive (Fig. 2B and J).

Treatment Group 5 (TG5)

The male reproductive system of ticks from this group shows the accessory gland complex lined by an intact epithelium where morphological changes are not observed. Certain tissue disorganization is observed in the ADL, where secretory cells exhibit vacuolization around their nuclei and between the cytoplasmic secretory granules. Heterogeneous material different from that observed in the **CG** is seen in the lumen of this lobe, suggesting the presence of secretory cells from the glandular tissue (Fig. 3A, B, C and H).

The testes are almost fully developed and filled with spermatozoa. Germ cells organized in spermatocysts are not seen (Fig. 3A). However, in the testis transverse section is possible to note a region with widely dilated lumen containing some spermatozoa.



Fig. 5 - Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Treatment Group 15 (**GT15**) stained with Hematoxylin-Eosin. (A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the Postero-Dorsal Lobe (**PDL**), the Spongy Lobe (**SL**), the Lateral Dorsal Lobe (**LDL**) of the glandular complex with its cells damaged by the esters; (B-C) Detail of the Seminal Vesicles and the Antero-Lateral Lobe (ALL); (D) Testis (T) and SL in detail showing high level of cell damage and tissue disorganization; (E-G) Detail of the PDL and the SL exhibiting vacuolized cells (circles) and tissue damage; (H-I) Testis exhibiting spermatids with vacuoles around the nucleus. **ac**=agranular cells; **Bm**=basal membrane; **ep**=epithelium; **lu**=lumen; **n**=nucleus; **PLL**=Postero-Latero Lobe; **S**=secretion; **setae**=cell bridges; **SV**=Seminal vesicles; **sg**=secretory granules; **sp**=spermatozoa; **T**=testis; **v**=vacuoles.

The layers of germ cells are disorganized (under the basement membrane) and cells with round nuclei and vacuolated cytoplasm are observed. It is impossible to identify the spermatid developmental stage through this morphology (Fig. 3F).

The seminal vesicles show intact morphology, spermatozoa with weakly hematoxylin-stained, when compared with the CG (Fig. 3D and E). The polysaccharides detection method (PAS) in this group shows decreased staining intensity, mainly in the lobes of the glandular complex. ADL staining is moderately positive, with some negative areas being observed, which are probably agranular cells (4A, D and E). The secretory granules visible in the anterior and posterior lobes also show varying staining intensity (positive to moderately positive) (Fig. 4A, D and E).

The SL basement membrane and the few secretory granules found in the intercellular spaces are positively stained. The secretory cell cytoplasm is negative (Fig. 4F). The spermatozoa in the seminal vesicles are strongly stained, as in the **GC** (Fig. 4A-C and G). An area in the testes containing spermatids is positively stained, and some spermatozoa in the lumen show moderately positive staining (Fig. 4B, C and G).

Treatment Group 15 (TG15)

In this group, the morphological and histochemical changes observed in the male reproductive system are more pronounced than in the TG5. The accessory gland complex shows the PDL with secretory cells having strongly hematoxylin-stained nuclei and disorganized and vacuolated cytoplasm, especially around the nuclei (Fig. 5A, E and F). The lateral-dorsal lobe (LDL) shows secretory cells with containing changed morphology, large vacuolization areas in the cytoplasm (Fig. 5A). The completely disorganized testes contain spermatocysts sheltering spermatocytes at different stages of development, which are thus seen in varying sizes with heterogeneous cytoplasm and large areas of vacuolization around the nuclei. Several germ cells interconnected by cytoplasmic bridges are also visible (5D, H and I). The spermatozoa in the seminal vesicles are weakly stained by hematoxylin, in comparison with the groups previously described (Fig. 5B and C).

PAS staining resulted in a more intense color variation in the glandular complex lobes. Positive or

emergent

strongly positive staining is observed. Cells in the PDL have positive cytoplasm, whereas secretory granules show strongly positive staining. Some areas of the cytoplasm are negatively stained, with a likely concentration of vacuoles. Fused secretory granules are strongly stained (Fig. 6A, E and G).Secretory cells show positive cytoplasm in the LDL, and areas with large vacuoles. The secretory granules that leave the secretory cell and reach the lumen are strongly positive (Fig. 6A and H). The testes are supported by a positive basement membrane. A detachment of the epithelium that lines the spermatocysts is observed. Spermatocysts disorganized sheltering spermatids are with moderately positive cell boundaries and heterogeneous, vacuolated cytoplasm (Fig. 6B, F and J). Moderately positive spermatozoa are observed in the lumen of the testes (Fig. 6B and F). Spermatozoa in the seminal vesicles are strongly positive (Fig. 6D and L). The results of the polysaccharide detecting method (PAS) are summarized in Table 2.

Table 2

Results summary from the application of hystochemical tests for polysaccharides detection in *Amblyomma cajenensse* reproductive system: control group (CG), treatment group 5 (TG5) and treatment group 15 (TG15).

	PAS (Polysaccharides)		
	GC	GT5	GT15
Granular cells	+	+	+
Agranular cells	+	_	_
Spongy Lobe	_	_	_
Spermatids	+	+	+
Spermatozoon (testis)	+++	++	++
Spermatozoon (seminal vesicle)	+++	+++	++

(-)negative; (+) positive; (++) medium positive; (+++) strongly positive.



Fig. 6 - Histological sections of male reproductive system of *Amblyomma cajennense* from Treatment Group 15 (**GT15**) with PAS reaction. (A) Overview of the male reproductive system, where it can be observed the Postero-Dorsal Lobe (**PDL**), the Spongy Lobe (**SL**), the Lateral Dorsal Lobe (**LDL**), the Postero-Lateral Lobe (**PLL**) and the Spongy Lobe (**SL**) of the glandular complex, the last one highly damaged by the esters; (B) Detail of the SL and Testis (**T**) exhibiting spermatocysts with spermatids inside it weakly-positive for the technique; (C-D) Detail of the Seminal Vesicles full of spermatozoa, apparently with none morphological or histochemical alterations; (E) Detail of the **PDL** with agranular and granular cells releasing secretion granules in its lumen; (F) Testis exhibiting spermatids with vacuolized cytoplasm and disrupted cell boundaries; (G-I) Detail of secretion granules of granular cells from PDL fused and surrounded by an white halo (circle), the LDL with highly vacuolized granular cells and the SL showing its elongated cells negative for the technique. (J) Detail of spermatids exhibiting a heterogeneous cytoplasm with vacuolized areas. **ac**=agranular cells; **Bm**=basal membrane; **ep**=epithelium; **gc**=granular cells; **lu**=lumen; **n**=nucleus; **PLL**=Postero-Latero Lobe; **S**=secretion; **setae**=cell bridges; **sg**=secretory granules; **sp**=spermatozoa; **v**=vacuoles

Discussion

Ticks of the genus *Amblyomma* are currently important for the medical and scientific communities, as well as farmers around the globe, because they are closely related to losses in animal by-products industries and public health problems in tropical and subtropical regions (Rodriguez-Valle et al. 2012, Alonso-Díaz et al. 2013, Senra et al. 2013, Nava et al. 2014).

Recent studies have shown that *A. cajennense* populations in South America have

developed resistance (mortality rates lower than 80%) to some acaricides, especially amitraz and deltamethrin, widely used by farmers for the control of *Rhipicephalus microplus* in cattle (Freitas et al. 2011, Alonso-Díaz et al. 2013, Rodriguez-Valle et al. 2013).

Therefore, given the importance of *A*. *cajennense* and the demand for new control methods, the results obtained in this study indicate that the esters of ricinoleic acid from castor oil, when incorporated to the host feeding, may act against hematophagous ectoparasites, being a

promising alternative for the management of rural and urban pests.

The data obtained from the CG allowed not only a comparison with TG5 and TG15, but also to expand the knowledge on the male reproductive system of Ixodidae, which is basically composed of an accessory gland complex and a pair of testes. The accessory gland complex is responsible for the production and secretion of the spermatic fluid and spermatophore synthesis, both essential for the transfer of spermatozoa into the female reproductive tract. On the other hand, testes are responsible for the production and maturation of germ cells until they reach the spermatid stage and reach the lumen as spermatozoa, moving toward the seminal vesicles.

The accessory gland complex is morphologically composed of lobes that develop and secrete material, a process dependent on the tick feeding stage. Sonenshine (1970) classified the gland complex lobes as granular and agranular according to the type of material secreted by the cells. The granular type is most often found in the tick species analyzed to date. Sampieri et al. (2014) reported that the presence or observation of SL could be directly linked to feeding stage, which was confirmed in this study.

To our knowledge, A. cajennense SL had not been described previously. In this study, there was an indication that the secretion produced by this lobe was used in the final stages of the tick reproduction. probably when producing the spermatophores, because it has not been observed in individuals that fed less than 10 days on the host. This was confirmed by the PAS staining, which showed that the large volume of secretion in the cytoplasm of SL cells is not of polysaccharide nature. Instead, this secretion has a protein or glycoprotein nature, as large sacs containing proteinaceous material were found in the spermatophores of some tick species. This material is formed only at the final stages of the reproductive process, when the male detaches from the host to complete the synthesis of the spermatophore and transfer it into the female reproductive tract (Feldman-Muhsan et al. 1973).

From a morphological point of view, the SL found in the **TG5** did not undergo significant changes, except for the presence of some cytoplasmic vacuoles. However, SL cells showed extensive areas of vacuolization in the **TG15**,

indicating that the increased concentration of esters in the diet also increases the damage to SL cells. The PDL, ADL and LDL of individuals from **TG5** and **TG15** showed morphophysiological changes, mainly cytoplasmic vacuolization, tissue disorganization and changes in the secretion process as a whole. In the **CG**, the PDL showed granular cells located in the anterior and posterior regions and agranular cells in the median lobe region. This organization seems to have changed as the concentration of esters increased, becoming more evident in the **TG15**.

Morphological changes certainly caused physiological damage, altering the production and release pattern of cellular secretion, compromising the quantity and composition of the seminal fluid and the spermatophore constituent material, which probably interfered or even delayed insemination. Furthermore, a protein of 12.000 DA seems to be involved in spermatids maturation already in the female tract and synthetized in the male glandular complex (Shepherd et al. 1981). Since the morphophysiology of the glandular complex appears to be altered, the synthesis of this protein and the process involved may be compromised.

The effect of exposure to esters became more evident in the spermatids and testes, perhaps because these cells are more sensitive to changes and more exposed to the medium elements. In TG5, testes showed intact spermatozoa. most Identification of spermatid developmental stage was hindered due to the action of the esters on the system morphology. Thus, it was confirmed in this group (TG5) that the esters acted on the testes and directly, their cells: a) causing extensive vacuolization in the cytoplasm of the few observed spermatids; b) indirectly, by inducing the individual to accelerate the maturation of spermatids, probably in an attempt to preserve these cells from the toxic effect of the product.

However, the concentration of esters did not germ cell maturation in TG15. alter as spermatocysts with developing spermatids were clearly observed in this group. Nevertheless, a complete disorganization was evident in spermatocysts, accompanied by the basement membrane detachment and disruption of the testis epithelial lining. Spermatids were also affected by the esters, showing a highly vacuolated cytoplasm, especially around the nuclei. In some cases, a reduction in the size of spermatids was observed, as

if they were in early stages of development. Some seemed to be at an advanced stage of degeneration, even showing cell lysis.

In TG5 and TG15, the spermatozoa showed no significant morphological changes, except in staining with hematoxylin and PAS, when compared to the CG. Mainly in the TG15, the hematoxylin and the PAS staining were less intense than in the CG. This may indicate that a weak PAS staining was a result of the esters action, which was effective in the hydrolysis of polysaccharides. Leonardo et al. (2001), Ferreira et al. (2002) and Messeti et al. (2010), who showed the esters ability to hydrolyze the walls (proteoglycans) of the bacteria Fusobacterium nucleatum, Prevotella nigrescens, Clostridium perfringens and Leuconostocmes enteroides, have previously proved this.

Conclusions

Arnosti et al. (2011 a, b) and Sampieri et al. (2013) subjected *R. sanguineus* ticks to esters, reporting significant morphological and ultrastructural changes in the female reproductive system, with evident effect on the process of vitellogenesis in oocytes. However, the results obtained by these authors, added to those presented in this paper, confirm that the esters should be effectively tested as an acaricides, since it is clear that this product can interfere with reproductive parameters. Thus, ricinoleic acid esters from castor oil could be also used in the integrated management in combination with other methods of tick control in the field.

Acknowledgements

This study was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) through grant no. 2012/02384-8, by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoameto de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) through research fellowships to M.I. Camargo-Mathias. The authors have no conflict of interests to declare.

References

A.Arnosti, P.D. Brienza, K.C.S. Furquim, G.O. Chierice, G.H. Bechara, I.B. Calligaris, M.I. Camargo-Mathias (2011a). Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus*

communis on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. Exp. Parasitol., **127**: 575–580.

- A.Arnosti, P.D. Brienza, K.C.S. Furquim, G.O. Chierice, S.C. Neto, G.H. Bechara, B.R. Sampieri, M.I. Camargo-Mathias (2011b). Effects of *Ricinus communis* oil esters on salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Exp. Parasitol., 127: 569–574.
- B. Feldman-Muhsan, S. Borut, S. Saliternik-Givant, C. Eden (1973). On the evacuation of sperm from the spermatophore of the tick, *Ornithodoros savignyi*. J. Insect. Physiol.,19: 951-962.
- B.R. Sampieri, A. Arnosti, P.H. Nunes, K.C.S. Furquim, G.O. Chierice, M.I. Camargo-Mathias (**2012**). Ultrastructural changes in the ovary cells os engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks trated with esters of ricinoleic acid from castor oil (*Ricinus communis*). Micros. Res. Techniq. **75**: 683-690.
- B.R. Sampieri, K.C.S. Furquim, P.H. Nunes, M.I. Camargo-Mathias (2013). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (*Ricinus communis*): an ultrastructural overview. Parasitol. Res., 12: 611-619.
- B.R. Sampieri, M.B. Labruna, O.C. Bueno, M.I. Camargo-Mathias (2014). Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. Parasitol. Res., 113: 1511-1519.
- C.M. Ferreira, O.P.S. Rosa, S.A. Torres, F.B.A. Ferreira, N. Bernardinelli (**2002**). Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. Braz. Dent. J.,**13**: 118-122.
- D.E. Sonenshine(**1970**). A contribution to the internal anatomy and histology of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* Cooley and Kohls 1941. J. Med. Ent., **7**: 289-312.
- D.E Sonenshine(**1991**). Biology of ticks. Oxford University Press.
- E.P.S. Freitas, M.T.A.G. Zapata, F.F. Fernandes (2011). Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of

Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goias, Brazil. Exp. Appl. Acarol., **53**: 189-202.

- F.A. Politi, G.M. Figueira, A.M. Araújo, B.R. Sampieri, M.I. Camargo-Mathias, M.P. Szabó, G.H. Bechara, L.C. Dos Santos, W. Vilegas, R.C. Pietro (2012). Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of Tagetespatula L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Parasite. Vector. 5: 295-300.
- F.S. Krawczak, F.A. Nieri-Bastos, F.P. Nunes, J.F. Soares, J. Moraes-Filho, M.B. Labruna (2014).Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted feverendemic area. Parasite. Vector., 7: 7.
- M. Ogrzewalska, A. Uezu, M.B. Labruna (2011). Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. Parasitol. Res., 108: 665-670.
- M. Rodriguez-Valle, A. Taoufik, M. Váldes, C. Montero, H. Ibrahin, S.M. Hassan, F. Jongejan, J. De La Fuente (2012). Efficacy of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 against *Hyalomma dromedarii* and *Amblyomma cajennense* tick infestations in camels and cattle. Vaccine, 30: 3453-3458.
- M.A. Alonso-Diaz, A. Fernández-Salas, F. Martínez-Ibáñez, J. Osorio-Miranda (2013). *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) tick populations susceptible or resistant to acaricides in the Mexican Tropics. Vet. Parasitol, 197: 326-331.
- M.A. Messetti, A.M. Santos, D.F. Angelis, G.O. Chierice, S.C. Neto (2010). Estudo dos derivados do óleo de *Ricinus communisL*. (Mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. Arq. Inst. Biol. 77: 301-308.

- M.C.R. Vendramini, M.I. Camargo-Mathias, A.U. De Faria, K.C.S. Furquim, L.P. De Souza, G.H. Bechara, G.C. Roma (2012). Action of Andiroba Oil (Carapa guianensis) on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) Semi-engorged Females: Morphophysiological Evaluation of Reproductive System. Micros. Res. Techniq., 75: 1745-1754.
- M.I. Camargo-Mathias (2013). Guia Básico de Morfologia Interna de Carrapatos Ixodídeos. EDUNESP.
- M.R. Leonardo, L.A.B. Silva, M. Tanomaru Filho, K.C. Bonifacio, I.Y. Ito (**2001**). *Invitro* evaluacion of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J. Endodont.**12**: 717-719.
- S. Nava, L. Beati, M.B. Labruna, A.G. Cáceres, A.J. Mangold, A.A. Guglielmone(2014). Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese 1888 (Ixodida: Ixodidae). Tick. Tick. Borne. Dis., 5: 252-276.
- T.O.S. Senra, F. Calmon, V. Zeringóta, C.M.O. Monteiro, R. Maturano, R.S. Matos, D. Melo, G.A. Gomes, M.G. De Carvalho, E. Daemon (2013). Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*(Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 112: 3471-3476.
- J. Shephered, J.H. Oilver Jr, J.D. Hall (1981). A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. Int. J. Inver. Rep., **5**: 129-137.

4.3. CAPÍTULO 3

Comparative analysis of spermatids of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Ixodidae) and *Ornithodoros rostratus* ticks (Argasidae): morphophysiology aimed at systematics.

Resumo

As relações filogenéticas entre as espécies de carrapatos (Acari: Ixodida) vêm sendo revistas por diversos pesquisadores ao longo das últimas décadas. Duas subfamílias, Rhipicephalinae (Ixodidae) e Ornithodorinae (Argasidae) merecem especial atenção devido a primeira abrigar espécies polimórficas de importância médicoveterinária e a segunda pelo fato de não se saber com exatidão tratar-se de um grupo taxonomicamente válido. A morfologia do sistema reprodutor masculino, bem como a ultraestrutura das suas células germinativas podem fornecer informações importantes para a sistemática filogenética de grupos animais, sendo que os espermatozoides exibem características espécie-específica, ou seja, cada espécie animal apresenta estas células com morfologia típica que podem servir então para estudos taxonômicos. Diante destas informações, o presente trabalho buscou avalliar por meio de análise comparada a morfologia do sistema reprodutor masculino e das suas células germinativas nas espécies Rhipicephalus sanguineus e Ornithodoros rostratus. Para tanto foram utilizadas técnicas de histologia e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que apesar da semelhança da morfologia geral do sistema reprodutor masculino entre os Ixodida estudados até então, há diferenças significativas entre as espécies aqui estudadas, tanto quanto a morfologia do sistema como um todo quanto à ultramorfologia das espermátides tardias, chamadas aqui de espermátides V. Os dados gerados no presente trabalho evidenciaram a importância dos estudos de morfologia interna comparada, principalmente no que tange a espermiologia, pois apesar dos dados morfológicos aqui obtidos ainda não serem suficientes para a produção de um cladograma (espermiocladistica), já foi possível observar diferenças notórias entre as famílias Argasidae e Ixodidae quanto à organização do sistema reprodutor masculino, bem como quanto à morfologia externa dos epermatozóides. Dados ainda à serem obtidos com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão possibilitarão a aplicação da espermiocladística e espermiotaxonomia como ferramentas para a sistemática de carrapatos.

ORIGINAL PAPER



Comparative analysis of spermatids of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Ixodidae) and *Ornithodoros rostratus* ticks (Argasidae): morphophysiology aimed at systematics

Bruno Rodrigues Sampieri¹ · Izabela Bragião Calligaris¹ · Renata da Silva Matos^{1,2} · Fredy Arvey Rivera Páez^{1,3} · Odair Corrêa Bueno¹ · Maria Izabel Camargo-Mathias¹

Received: 29 September 2015 / Accepted: 12 October 2015 / Published online: 19 October 2015 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The phylogenetic relationships among tick species (Acari: Ixodida) have been revisited by several researchers over the last decades. Two subfamilies, Rhipicephalinae (Ixodidae) and Ornithodorinae (Argasidae), deserve special attention. The male reproductive system morphology, as well as the ultrastructure of the germ cells, may provide important information for phylogeny and systematics of metazoan groups, with spermatozoa exhibiting characters that can be used for this purpose. With that information in mind, this study aimed at evaluating, through a comparative analysis, the morphology of the male reproductive systems and germ cells of ticks species Rhipicephalus sanguineus and Ornithodoros rostratus. In order to do that, histology and scanning electron microscopy techniques were used. The results have shown that despite the similarities in the general morphology of the male reproductive system among studied Ixodida so far, there are morphological differences among the species studied herein, mainly the U-shaped testis (ancestral character) in O. rostratus and the pair testes (derived character) in R. sanguineus, and the general morphology of germ cells (spermatids V). Besides that, the morphological changes observed during the spermiogenesis appear to be different between the species studied here, probably characterizing the two families considered. The data generated in this study showed the importance of comparative internal morphology

Maria Izabel Camargo-Mathias micm@rc.unesp.br

- ¹ UNESP, Av. 24A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, Brasil
- ² UFJF, Rua José Lourenço Kelmer, Martelos, Juiz de Fora, MG, Brasil
- ³ Universidad de Caldas, Calle 65 Nro 26-10, AA 275, Manizales, Caldas, Colombia

studies, mainly in regard to spermatology, despite the morphological data obtained herein not being enough to product a cladogram (sperm cladistics), it was already possible to observe clear differences among families Argasidae and Ixodidae in regard to the organization of their male reproductive systems and concerning the external morphology of spermatids. Data yet to be obtained through transmission electron microscopy techniques will allow the application of spermiocladistics and spermiotaxonomy as tools for tick systematics.

Keywords Sperm taxonomy · Testes · Ticks · Comparative histology

Introduction

The phylogenetic relationships among tick species (Acari: Ixodida) have been reviewed by several researchers since the work published by Hoogstraal and Aeschlimann (1982), who proposed their phylogeny based on morphological characters and on the tick/host specificity, to the most recent reviews, which were based on their molecular systematics (Barker and Murrell 2002; Black et al. 1997; Burguer et al. 2012).

Two subfamilies, Rhipicephalinae (Ixodidae) and Ornithodorinae (Argasidae), deserve special attention. Rhipicephalinae includes polymorphic species of medical and veterinary importance, and the second one due to the fact it is not exactly known whether it is a taxonomically valid group (Black and Piesman 1994; Black et al. 1997, Dantas-Torres and Otranto 2015; Nava et al. 2015; Politi et al. 2013; Remedio et al. 2015).

Within the Rhipicephalinae, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) is an important species which parasite domestic animals in urban and peripheral areas with a wide

geographical distribution (Dantas-Torres 2010). Its taxonomic status, however, has been questioned, firstly due to the fact that its holotype was lost, and secondly, for its shallow and non-illustrated first description, which led to an erroneous identification of the individuals collected around the world. Because of that, *R. sanguineus* sl nowadays does not represent one species, but a complex of species (Dantas-Torres and Otranto 2015; Nava et al. 2015).

The representatives in the second subfamily mentioned herein (Ornithodorinae) have recently been more usual targets for phylogenetic reviews. Once, in the past, more relevance was given to studies with Ixodidae; there is still a knowledge void to be filled on Argasidae groups, including the Ornithodorinae species (Estrada-Peña et al. 2010). Thus, recent observations have been demonstrating that the variety of species in this groups and their geographical distribution is very different than what it was thought to be, and so is the new evidence on the medical and veterinary importance of those ectoparasites in the transmission of viruses and bacteria to livestock and humans (Ribeiro et al. 2013; Dantas-Torres et al. 2012; Hubálek and Rudolf 2012; Ravaomanana et al. 2010; Reck et al. 2013; Tavassoli et al. 2012).

Their male reproductive system morphology, as well as the ultrastructure of their germ cells, may provide important information for their phylogenetic systematics, as demonstrated by studies with insects, arachnids, and mites (Alberti et al. 2008; Dallai et al. 2005; Michalik et al. 2004). Many researchers assure that mature male germ cell morphology have species-specific characteristics; that is, each animal species has spermatozoa with typical characters, the reason by which they can be analyzed in taxonomic studies (Birkhead et al. 2009).

With that information in mind, this study aimed at studying, through a comparative analysis, the morphology of the male reproductive systems and the ultramorphology of germ cells in species *R. sanguineus* sl and *Ornithodoros rostratus*, and also at characterizing how the spermiogenesis process takes place, in order to identify possible characters for future taxonomic studies, and to confirm sperm taxonomy as an important tool to understand the systematics of Ixodida.

Materials and methods

Ticks

In order to conduct this study, 10 couples of *R. sanguineus* sl were used (10 males and 10 females). They were kept in a colony at the Biology Department of Unesp Rio Claro, SP state, Brazil. Rabbits (White New Zealand—Botucatu Variety), which had never been infested before, received the ticks infestation. The males were collected from the host after feeding for 6 days.

The individuals of species *O rostratus* were also placed on rabbits (White New Zealand—Botucatu Variety) which had never been infested before. The ticks were placed on the rabbits at their nymphal stage. After they molted into their adult stage, 10 males in the fasted state were collected.

Afterwards, males from each species were anesthetized through thermal shock in a freezer under -1 °C of temperature for 5 min, dissected in a petri dish with saline solution in PBS buffer. Then, their reproductive systems were taken out and fixed so that microscopy techniques could be applied.

This study was approved by the Ethical Committee in Animal Use (Comitê de Ética de Uso Animal-CEUA) at the Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP, Brazil, under process number 017/2012 and protocol 1422.

Histology

The male reproductive systems of five individuals of each species were fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 48 h and dehydrated in rising ethanol concentrations (70, 80, 90, and 95 %)—15 min in each concentration. After that, samples were embedded in Leica historesin (embedding) for 72 h, and then polymerized in this historesin, to later section of the blocks (3 μ m) in microtome. The sections were then collected in glass slides and stained with hematoxylin-eosin (HE), to be photographed later by a DM750 Leica Microscope.

Scanning electron microscopy

The male reproductive systems of five individuals from each species were fixed in 2.5 % glutaraldehyde for 48 h. Then, the material was dehydrated in rising acetone concentrations (80, 85, 90, 95 %, and 100 %) in 5-min baths for each concentration. The systems were immersed twice in the 100 % concentration, for equal amounts of time. After the Critical Point Drying desiccation, the specimens were bonded with double-coated tape to aluminum brackets, plated with gold through sputtering, examined, and photographed in a Hitachi TM3000 scanning electron microscope.

Results

Rhipicephalus sanguineus sl

The male reproductive system in that species has a multilobed accessory gland complex that is located anteriorly to the body of the animal, and antero-dorsally are the seminal vesicles, which are connected to the vasa deferentia. These are connected to the independent testicles (right and left) with tubular shapes, which extend laterally to the tick body, increasing in diameter the more distal to the glandular complex they go (Fig. 1a).

Throughout the testicles, the presence of the developing germ cells is observed. In their proximal region are the initial spermiogenesis stages, and in the distal region, the advanced stages of that process. In the seminal vesicles are the germ cells in their last stage, ready for mating (Fig. 1b, c).

The germ cells observed herein are spermatids I, the first stage of ticks spermiogenesis (spI); that is, they have already undergone the cell division processes (mitosis and meiosis).

B D ec E F ec sp II n sp I n 100 um G H n cb sp II sp III n T sp IV J sp mo

Fig. 1 Morphology and histology of the reproductive system and germ cells of Rhipicephalus sanguineus sl males. a Scanning photomicrograph of the reproductive system, comprising the glandular complex (GC), seminal vesicles (asterisk), and testicles (T); b-c Histological sections with an overview of the reproductive system, in which the glandular complex lobes and the testicles that are full of spermatids in different stages can be observed; d Cross-section of the proximal region of the testicle; e Spermatids I (spl); f-g Spermatids II (spII); h Spermatids III (spIII); i-j Spermatids IV (spIV); k-m Spermatids V (spV) showing the operculum without a rim in its base. c cisternae, sc spermatocyst, ep epithelium, DLL dorsolateral lobe, mc membranous complex, np nuclear process, n nucleus, op operculum, PDL posterodorsal lobe; r rim, SV seminal vesicle. Arrow indicates acrosomal vesicle Those cells, sheltered inside the spermatocysts, have large nuclei, and no cell limits evident (Fig. 1d, e).

The spermatids II (spII) are located in the median region of the testes, and they are characterized for having large and round nuclei and also for having clear cell limits. Besides that, among cells in that stage, cytoplasmic bridges (between two or more cells) are noticed. Sets of cells are sheltered within spermatocysts (Fig. 1f, g).

The spermatids at stage III (spIII) are located more distally in the testicles. The presence of cisternae can be noticed in the cell limit, building up in its internal side. Besides that, the SpIII have an oval shape with chromatin in its periphery and a filamentous structure that is stained by hematoxylin, and it is located in the cytoplasm, anteriorly to the nucleus, next to the cell limit, herein called acrosomal vesicle (Fig. 1h).

The spermatids, now at stage IV (spIV), undergo expressive morphological changes, not being organized in spermatocysts anymore, going through lengthening, and suggesting the fusion of membranous cisternae. The acrosomal vesicle is not so evident anymore, and the nucleus, at this stage, is shaped like a half-moon, and it is located in the anterior region of the cell (Fig. 1i, j).

The last stage is the one of spermatids V (spV), observed in the most distal region of the testicles, and in the seminal vesicles. Scanning microscopy shows that those cells are filiform, with their anterior regions resembling heads and their posterior regions resembling tails. In the anterior region is the operculum, which does not have a rim around its base. Applying histological techniques, it is possible to notice the fusion of the cisternae into a membranous complex which runs along the cell limit. The nuclear process can also be observed with a screw-shaped aspect, located between the membranous complex and the cell limit (Fig. 1k, l, m).

Ornithodoros rostratus

The male reproductive system of *O. rostratus* has a multilobed accessory gland complex that is located anteriorly to the tick's body. Dorsally, two large lobes are observed to be arranged parallel to one another (ADL). No seminal vesicles are observed. The testicle is observed as a single horse-shoeshaped organ (Fig. 2a, b).

In the proximal region of the testicle, the germ cells are in more advanced development stages. In the distal portion are the cells in the early spermiogenesis stages (Fig. 2b). The spI in that species are globe-like cells that are found to be compacted inside the spermatocysts, with clear cell limits, large and round nuclei, and heterogeneous cytoplasm, due to the presence of granulation (Fig. 2c).

The next stage, the spII, is characterized by the formation of membranous cisternae which initially occupy the whole cell perimeter, and then they are grouped in the cell pole that is opposite to the nucleus, assuming a very peculiar shape. The nucleus is barely observed, suggesting that at this stage, this organelle loses its covering, and only some of the chromatin is stained. The acrosomal filament can be observed next to the nucleus. The cytoplasm, in a general way, has coarser granules, and, therefore, more evident (Fig. 2d).

In spIII, the cisternae, undergoing the fusion process, still occupy one pole of the cell and display subtriangular shape. The nucleus, the acrosomal filament, and the cytoplasm display the same characteristics of the previously described stage (Fig. 2e).

SpIV cells are under a lengthening process. At this stage, the cisternae have already fused, and they are now part of the membranous complex, which also follows the lengthening of the cell. At that time, the cell as a whole is hypertrophied, with a long cytoplasm area that is present between the cell limit and the membranous complex. The very small nucleus that is located in one of the poles is barely observed in most cells at this stage, but when it is, its color is mixed with the one of the cytoplasm (Fig. 2f).

The cells at the last spermiogenesis stage are found next to the accessory gland complex. They are long and, in their anterior regions, they have an operculum with a rim in its border. Next to the operculum, between the membranous complex and the cell limit, is the nuclear process, also lengthened and heavily stained by hematoxylin (Fig. 2g, h, i).

Discussion

Studies on the male reproductive system, germ cells, and the spermiogenesis process in ticks are scarce and limited to some species of small geographical distribution. Also, most published articles are outdated, which compromises image quality. Besides that, there are no comparative studies on the phylogeny and taxonomy of tick groups.

Still, available literature's data enable some comparison and inference on the relationship between morphological data and the systematics of the group under study.

In this study, comparing the morphology of male reproductive system of two tick species that are classified in different families, it was possible to find some important characters. In *R. sanguineus* sl, two seminal vesicles were observed, and they were arranged parallel to and on the dorsal region of the accessory gland complex. In *O. rostratus*, in turn, the vesicles were not observed. In other Ixodidae species, these organs occupy the same region in the reproductive system as *R. sanguineus* sl (Anholeto et al. 2014; Sampieri et al. 2014). The last only vary in size, as they depend on the volume of germ cells that are in the lumen; in turn, for members of the Argasidae family, when they are observed, they are located ventrally to and below the gland complex (Roshdy 1961; Sonenshine 1970).

Fig. 2 Morphology and histology of the reproductive system and germ cells of Ornithodoros rostratus males. a Scanning photomicrograph of the reproductive system, comprising the glandular complex (GC), and testicles (T); **b-c** Histological section with an overview of the reproductive system, in which the gland complex lobes and the testicles that are full of spermatids can be observed; c Spermatids I (spI); d Spermatids II (spII); e Spermatids III (spIII); f Spermatids IV (spIV); g-h Scanning photomicrograph of a spermatid V(spV) showing the operculum and the rim in its base. i Spermatids V. ADL anterodorsal lobe, c cisternae, sc spermatocyst, ep epithelium, mc membranous complex, np nuclear process, n nucleus, op operculum, PDL posterodorsal lobe, r rim. Arrow indicates acrosomal vesicle. Circle indicates nucleus



The morphological variation of tick testicles may also be considered important characters that can be used in taxonomy and in phylogeny. In species, in the Ixodidae family, testicles occur in pairs, and the right and the left ones are individualized—that is, they are not connected to each other. That pattern was also observed in *Dermacentor andersoni and Dermacentor* *variabilis* (Dumser and Oliver 1981), *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma sculptum*, *and Amblyomma aureolatum* (Anholeto et al. 2014; Sampieri et al. 2014; Sampieri et al. personal information), in *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus evertsi evertsi*, and *Rhipicephalus simus* (Wysoki and Bolland 1978), and now in *R. sanguineus* sl. In a recent study, however, Sampieri et al. (unpublished data) observed the presence of a connection between the testicles of *A. triste*, under the format of a tubular isthmus at the distal region, a situation which is also found in *Ornithodoros moubata* (Wagner-Jevsenko 1958 cited in Sonenshine 1970). In *O. rostratus*, on the other hand, there is only one U-shaped testicle.

Generally, the single testicle is considered as a synapomorphic ancestor condition. Therefore, the "individualized testicle" would be a derived apomorphic character, and, consequently, "individualized testicles with distal connection" could be considered an intermediate one. If that hypothesis is correct, the condition regarding individualized testicles would be the most recent one, and it would have evolved more than once among the Ixodida, once individualized testicles have already been observed for Argasidae species (Pagenstecher, 1861 cited in Sonenshine, 1970). However, the access to that publication is compromised, as it is very old.

Concerning the morphology of germ cells and to the spermiogenesisprocess, some differences were observed among the species studied herein, which should be probably related to their biology. In *R. sanguineus* sl, spermatogenesis probable starts during the period in which nymphs are fed, and it is probably finished during the molting process. However, dividing spermatocytes have been observed in fasted *R. appendiculatus*, *R. evertsi evertsi*, and *R. simus* (Oliveira et al. 2012; Wysoki and Bolland 1978), indicating an interspecific variation at late spermatogenesis and early spermiogenesis. For *R. sanguineus* sl adult individuals with six feeding days, it is possible to observe spermiogenesis from the beginning; that is, when immature spermatids (spI) start to hypertrophy, which causes significant morphological alterations (five different stages).

For other Ixodidae, as in the previously mentioned *Amblyomma*, the end of spermatogenesis and beginning of spermiogenesis also undergo interspecific variations. Spermatogenesis ends either during maturing from nymph to adult, or already in the adult stage, after ticks start feeding from hosts. For adults, in advanced feeding stages, it is possible to observe all five stages of that process, making it clear that this is a character that may be common to the Ixodidae family.

For *O. rostratus*, the studies do not include consistent information regarding when spermiogenesis starts, but the first spermatid stage found is very distinct from the one observed in *R. sanguineus* sl and for other Ixodidae. The first cell is large with an already evident limit (formation of cisternae), also presenting large interphase nucleus—characteristics that indicate that spermiogenesis in this Argasidae starts at the nymphal stage. It is therefore considered to be a common character among species of the *Ornithodoros* genus, according to studies conducted by Feldman-Muhsam and Filshie (1976) with *Ornithodoros tholozani*, and Pinkerton et al. (1982) with *O. moubata*. Unlike what occurs with *Ornithodoros*, for *Argas persicus*, according to Monstasser et al. (2005), spermiogenesis usually lasts 2 weeks, after the adult individual feeds from the host. However, further studies are required to confirm whether it is a common characteristic of the Argas genus—and if so, which are the remaining existing patterns in that family.

Tick spermatozoa, as the ones in Acari as a whole, are aflagellate, and that type is also found in diplopoda and less frequently in other arthropods such as insects and crustaceans (Baccetti 1973; Krantz and Walter 2009; Reger 1963;). One of the characteristics of this sperm is the loss of its nuclear envelope, followed by morphological changes concerning the chromatin shape, which becomes highly condensed (nuclear process). After that, it is impossible to differentiate the nucleoplasm from cytoplasm (Reger 1962).

The so-called nuclear process can be clearly observed, albeit with differences between the two species. For *R. sanguineus* sl, the nuclear changes seem to have actually started in the spIII, when the nucleus still presented normal morphology. In the spIV, that morphology is lost, and the formation of the nuclear process is started, yet the organelle can still be seen. In the spV, the nuclear process formation has an end, and the genetic material, now called chromatin body, is arranged in the shape of a screw and is located in the anterior region of the cell, indicating that the nuclear envelope has be reabsorbed.

In turn, in *O. rostratus*, the nuclear process formation is started at the spII, where the nucleoplasm becomes indistinguishable from the cytoplasm, and the genetic material is weekly stained, a characteristic which is still maintained until the cell reaches stage IV. In the spV, the nuclear process is finished and the genetic material (chromatin body) is restricted to a filamentous structure that is strongly stained through the technique in the anterior region of the cell.

Finally, the histological and ultramorphology characterization of spV that were conducted in this study allowed comparing the different tick species already studied with that purpose and corroborated statements concerning the existence of a species-specific relationship between male germ cell morphology and the species which produced it. This fact became evident when the spVs of *R. sanguineus* sl and *O. rostratus* were observed and compared in this study, and to other previously described species, which characters such as the operculum shape, the presence or absence of a rim at the operculum base, and the shape of that rim would be specific to each species, as the study conducted by Wüest et al (1978) describing the spermatozoa of *Amblyomma hebraeum*.

In order to better visualize the information, the data from the comparative analysis of spermiogenesis processes and spermatid morphologies of *R. sanguineus* sl and *O. rostratus* are summarized in Fig. 3.

Fig. 3 Schematic diagram of the spermiogenesis process of *Rhipicephalus sanguineus* sl (a-e) and *Ornithodoros rostratus* (f-j). a, f Spermatid I; b, g Spermatid II; c, h Spermatid III; d, i Spermatid IV; e, j Spermatid V. *av* acrosomal vesicle, *c* cisternae, *mc* membranous complex, *np* nuclear process, *n* nucleus



Conclusions

Generally speaking, tick sperm biology and evolution has not yet been fully explained, to the extent it could allow phylogenetic analysis per se, in order to compare it to the phylogenies of ticks in the current literature, especially in regard to the need to study other species which may generate enough data to allow the definition of common characters at subfamily and genus levels. The data obtained in this study, besides contributing to the analysis of characters for future studies in the different tick groups, has shown that this kind of analysis is promising to solve problems that are of systematic and phylogenetic nature. Besides that, the use of transmission electron microscopy techniques may reveal new characters in a subcell level, at the same time that will allow the construction of cladograms, and the comparison with trees generated from the molecular systematics.

Compliance with Ethical Standards

Ethical approval This study was approved by the Ethical Committee in Animal Use (Comitê de Ética de Uso Animal-CEUA) at the Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP, Brazil, under process number 017/2012 and protocol 1422.

References

- Anholeto A, Nunes PH, Remédio RN, Camargo-Mathias MI (2014) Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae) first morphological data. Acta zool-stockholm. doi:10. 1111/az o.12083
- Alberti G, Carrera P, Martin P, Smit H (2008) Comparative spermatology of freshwater mites (Hydrachnidia, Acari). Soil Organ 80:155–169
- Baccetti B, Dallai R, Fratello B (1973) The spermatozoon of arthropoda. XXII. The 12+0', 14+0' or aflagellate sperm of protura. J Cell Sci 13:321–335
- Barker SC, Murrell A (2002) Phylogeny, evolution and hitorical zoogeography of ticks: a review of recente progress. Exp Appl Acarol 28: 55–68
- Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S (2009) Sperm biology: An evolutionary perspective. Academic Press, Oxford
- Black WC IV, Piesman J (1994) Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 91:10034–10038
- Black WC IV, Klompen JSH, Keirans JE (1997) Phylogenetic relationships among tick sub-families (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. Mol Phylogenet Evol 7:129–144
- Burguer TD, Shao R, Beati L, Miller H, Barker SC (2012) Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. Mol Phylogenet Evol 64:45–55
- Dallai R, Machida R, Uchifune T, Lupetti P, Frati F (2005) The sperm structure of *Galloisiana yuasai* (Insecta, Grylloblattodea) and implications for the phylogenetic position of Grylloblattodea. Zoomorphology 124:205–212
- Dantas-Torres F (2010) Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasitol Vector 26:1–11
- Dantas-Torres F, Venzal JM, Bernardi LFO, Ferreira RL, Onófrio VC, Marcili A, Bermudez SE, Ribeiro AF, Barros-Battesti DM, Labruna MB (2012) Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. J Parasitol 98:36–45
- Dantas-Torres F, Otranto D (2015) Further thoughts on the on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. Vet Parasitol. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.014
- Dumser JB, Oliver JH (1981) Kinetics of spermatogenesis, cell-cycle analysis, and testis development in nymphs of the tick Dermacentor variabilis. J Insect Physiol 27:743–753. doi: 10.1016/ 0022-1910(81)90064-0
- Estrada-Peña A, Mangold AJ, Nava S, Venzal JM, Labruna MB, Guglielmone AA (2010) A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). Acarologia 50:317–333

- Feldman-Muhsam B, Filshie BK (1976) Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of Ornithodoros ticks: an attempt to explain their motility. Tissue Cell 8:411–419
- Hoogstraal H, Aeschlimann A (1982) Tick host specificity. Bull Soc Entomol Suisse 55:3–32
- Hubálek Z, Rudolf I (2012) Tick-borne viruses in Europe. Parasitol Res 111:9–36
- Krantz GW, Walter DE (2009) A manual of acarology. Texas Tech University Press, Lubock
- Michalik P, Dallai R, Giusti F, Alberti G (2004) The ultrastructure of the peculiar synspermia of some Dysderidae (Aranae, Arachnida). Tissue Cell 36:447–460
- Montasser A, Gadelhak GG, Tariq S (2005) Impact of ivermectin on the ultrastructure of the testis of Argas (Persicargas) persicus (Ixodoidea:Argasidae). Exp Appl Acarol 36:119–129. doi:10. 1007/s10493-005-1270-2
- Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MPJ, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA (2015) The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Vet Parasitol 208:2–8
- Oliveira PR, Calligaris IB, Roma GC, et al (2012) Morphological characterization of the nymphs Rhipicephalus sanguineus ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. Microsc Res Tech 75:727–36. doi:10.1002/jemt.21118
- Pinkerton AM, Hall JD, Shepherd J (1982) Scanning electron microscopy of post-ejaculatory spermiogenesis in the tick Ornithodoros moubata. Tissue Cell 14:785–797
- Politi FAS, Souza-Moreira TM, Rodrigues ER, Queiroz GM, Figueira GM, Januário AH, Berenger JM, Scolovschi C, Parola P, Pietro RCLR (2013) Chemical characterization and acaricide potential of essential oil from aerial parts of Tagetes patula L. (Asteraceae) against engorged adult females of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806). Parasitol Res 112:2261–2268
- Ravaomanana J, Michaud V, Jori F, Andriatsimahavandy A, Roger F, Albina E, Laurence V (2010) First detection of African swine fever vírus in Ornithodoros porcinus in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. Parasitol Vector 3:115
- Reck J, Marks FS, Termignoni C, Guimarães JA, Martins JR (2013) Ornithodoros brasiliensis (mouro tick) salivary gland homogenates inhibit in vivo wound healing and in vitro endothelial cell proliferation. Parasitol Res 112:1749–1753
- Reger JF (1962) A fine-structure study on spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili*, with special reference to the motile process. J Ultrastruct Mol Struct R 7:550–565
- Reger JF (1963) Spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili*, as revealed by electron microscopy. J Ultrastruct Mol Struct R 8: 607–621
- Remedio RN, Nunes PH, Anholeto LA, Oliveira PR, Camargo-Mathias MI (2015) Morphological effects of neem (Azadirachta indica a. Juss) seed oil with known azadirachtin concentrations on the oocytes of semi-engorged Rhipicephalus sanguineus ticks (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 114:431–444
- Ribeiro CCDU, Faccini JLH, Cançado PHD, et al (2013) Life cycle of Ornithodoros rostratus (Acari: Argasidae) under experimental conditions and comments on the host-parasite relationship in the Pantanal wetland region, Brazil. Exp Appl Acarol 61:139–46. doi: 10.1007/s10493-013-9669-7
- Roshdy MA (1961) Comprataive internal morphology of subgenera of Argas ticks (Ixodidea, Argasidae). I. Subgenus *Carios: Argas vespertilionis* (Latreille, 1802). J Parasitol 47:987–994
- Sampieri BR, Labruna MB, Bueno OC, Camargo-Mathias MI (2014) Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. Parasitol Res 113:1511–1519

- Sonenshine DE (1970) A contribution to the internal anatomy and histology of the bat-tick *Ornithodoros Kelley* Cooley and Kohls, 1941. II. The reproductive, muscular, respiratory, secretory and nervous system. J Med Entomol 7:298–312
- Tavassoli M, Malekifard F, Soleimanzadeh A, Pourseyed SH, Bernousi I, Mardani K (2012) Susceptibility of different life stages of Ornithodoros lahorensis to entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana. Parasitol Res 111:1779–1783
- Wüest J, Said AE, Swiderski Z, Aeschlimann K (1978) Morphology of spermatid and spermatozoon of Amblyomma hebraeum Koch (Acarina, Ixodidae). Z Parasitenkd 55:91–99
- Wysoki M, Bolland HR (1978) Spermatogenesis, chromosomes and sex determination of four Rhipicephalus species (Acari: Ixodidae) from East Africa. Genetica 48: 233–238

4.4. CAPÍTULO 4

Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics.

Resumo

Entre os artrópodes os carrapatos do gênero Amblyomma são de grande importância médica e veterinária, apresentando divergências filogenéticas e taxonômicas devido a polimorfismos e plasticidade fenotípica entre subpopulações. De modo geral, o sistema reprodutivo masculino e os espermatozoides exibem morfologia e ultraestrutura diversificada espécie-específicas, trazendo novas possibilidades para questões filogenéticas e taxonômicas. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo descrever e comparar a morfologia do sistema reprodutor masculino e suas células germinativas de Amblyomma aureolatum, A. sculptum, e A. triste, com a intenção de identificar possíveis caracteres diagnósticos. Para tanto, casais das três espécies de carrapatos foram mantidos em colônia, infestado em coelhos e coletados após 12 dias de alimentação. Os machos tiveram seus sistemas reprodutores dissecados, fixados e processados para microscopia eletrônica de varredura e histologia. Os resultados aqui obtidos permitiram a determinação das fases da espermiogênese e a comparação da morfologia das espermátides, último estágio de desenvolvimento. Além disso, os testículos de A. triste apresentam um istmo de ligação entre a região distal de ambos, enquanto que nas outras duas espécies esta estrutura não pôde ser observada. Foram identificadas algumas características anatômicas que podem ser utilizadas para estudos taxonômicos e filogenéticos, como a presença ou ausência do istmo ligando os testículos, forma da célula SPV, a forma do opérculo e a presença ou ausência do aro sobre a sua base.

Contents lists available at ScienceDirect





CrossMark

Journal of Microscopy and Ultrastructure

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmau

Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics

B.R. Sampieri^a, J.C.S. Moreira^a, F.A.R. Páez^{a,b}, M.I. Camargo-Mathias^{a,*}

^a UNESP, Department of Biology, Av. 24A, 1515, Bela Vista. Rio Claro-SP, Brazil

^b Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Calle 65 Nro 26-10, AA 275, Manizales, Caldas, Colombia

ARTICLE INFO

Article history: Received 3 September 2015 Received in revised form 5 November 2015 Accepted 17 November 2015 Available online 27 November 2015

Keywords: Amblyomma sp. Comparative morphology Reproductive system Spermiotaxonomy Ticks

ABSTRACT

Among arthropods, ticks of the genus Amblyomma are of great medical and veterinary importance and present phylogenetic and taxonomic divergences given polymorphisms and phenotypic plasticity between subpopulations. Generally, the male reproductive system and spermatozoon exhibit diversified morphology and ultrastructure species-specific, bringing new possibilities for phylogenetic and taxonomic issues. Therefore, the present study aimed to describe and compare the morphology of the male reproductive system and its germ cells of Amblyomma aureolatum, A. sculptum, and A. triste, intending to identify possible diagnostic features. Couples of the three tick's species were kept in colony. infested on rabbits and collected over 12 days of feeding. The males had their reproductive systems dissected, fixed and processed for histology and scanning electron microscopy. The results obtained here allowed the description of spermiogenesis stages and the comparison of spermatids morphology in the last stage of development. Furthermore, the testis of A. triste present an isthmus connecting the distal region of both, while in the other two species this structure could not be observed. Some anatomical features were identified which can be used for taxonomic and phylogenetic studies, like the presence or absence of the isthmus connecting testis, spV cell shape, the shape of the operculum and the presence or absence of the rim on its base.

© 2015 Saudi Society of Microscopes. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks from the *Amblyomma* genus are of great medical and veterinary importance. Its ubiquitous geographic distribuition, through the tropical and subtropical regions, and the occurrence of polymorphisms and phenotypic plasticity cause classification divergence between taxonomists. In the Americas, there are at least three "species complexes" within *Amblyomma*, namely: the "*cajennense* complex", the "*maculatum* complex" and the "*ovale* complex" and in Brazil, important species belonging to these complexes can be found, such as the *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888), the *A. triste* (Koch, 1844) and the *A. aureolatum* (Pallas, 1772), grouped respectively. Therefore, it is clear how difficult it is to identify and classify individuals from this genus as well as reinforce the importance of new studies that seek to find the solution for these issues [1,3–6].

Species complexes are groups of subpopulations whose individuals, in principle, are identified as the same species due to the similarity in diagnostic characters. However, wide geographic distribution, distinct ecological niches and important genetic differences show that, in most cases,

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 19 35264151; fax: +55 19 35340009. *E-mail address:* micm@rc.unesp.br (M.I. Camargo-Mathias).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2015.11.003

²²¹³⁻⁸⁷⁹X/© 2015 Saudi Society of Microscopes. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

there is more than one species grouped in these complexes. The species classified in these *Amblyomma* complexes have subtle variations related to its external morphology that complicate their identification and relocation within the clade, in addition to the fact the material-type of these group fails to submit adequate quality of preservation and/or a shallow description [1–4,6].

The spermatozoon–male germ cells–have a diversified morphology and ultrastructure that differs depending on the animal species, therefore, assuming that specificity, thorough investigation of its form could be defined the phylum and even the male species that produced them [7,8]. In various groups of invertebrates, such as insects and annelids, the development of the germ cells, especially in spermiogenesis, as well as the morphology and the ultrastructure of the spermatozoon, shed scientific light on the resolutions for phylogenetic and taxonomic issues that could not be solved by the traditional taxonomy [8–13].

Based on the aforementioned, this study aimed to describe and compare the morphology of the male reproductive system of three species of tick from the *Amblyomma* genus that exist in Brazil, namely the *A. aureolatum*, the *A. sculptum*, and the *A. triste*, through histological and ultramorphological techniques in order to identify possible diagnostic characters at the species level.

2. Material and methods

2.1. Ticks

Conducting this study involved 10 couples (10 males and 10 females) of each tick species, the *A. aureolatum*, the *A. sculptum* and the *A. triste*. The *A. aureolatum* couples were obtained from colonies kept in Dr. Marcelo Bahia Labruna's laboratory, at the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) at the University of São Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil. The *A. sculptum* couples were collected in the campus of the UFSCar of Araras, São Paulo, Brazil, 22°18′37.0′1S 47°23′06.2′1W, and identified according to taxonomic keys established in the literature (Nava et al., 2014). The *A. triste* couples were obtained from colonies kept by Dr. Marcos Andre's team in the Departamento de Patologia Veterinária at the FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Three Rabbits (New Zealand White–Botucatu Variety) that had never been previously infested (age = 6 months; sex = females; weight average = 2.339 grams) were infested with the couples of each species of tick. The males of each species were collected from the host within more than 12 days of feeding (period counted from the tick first attachment to the host skin) a period in which developed germ cells can already be observed. After collection, the ticks were immediately dissected in PBS buffer and had their reproductive systems fixed so that microscopy techniques could be performed.

2.2. Histology

The male reproductive systems of five individuals of each species were fixed in 2.5% Glutaraldehyde in PBS (this fixative allows the germ cells to be better preserved) for 48 hours and dehydrated in escalating concentrations of ethanol (70, 80, 90 and 95%) for 15 minutes in each concentration. The samples were subsequently embedded in Leica historesin (embedding) for 72 hours and polymerized in the same historesin for later section of the blocks (3 μ m) in a microtome. The latter were collected on glass slides and stained with hematoxylin and eosin stain (HE stain) for later photo-documentation on a Leica DM750 Photomicroscope.

2.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The male reproductive systems of five individuals of each species were fixed in 2.5% Glutaraldehyde in PBS for 48 hours. The material was subsequently dehydrated in escalating concentrations of acetone (80, 85, 90, 95 and 100%) in five-minute baths in each concentration; during the 100% acetone procedure, specifically, two baths with the same time duration were run. After desiccation in a Critical Point Dryer, the specimens were pasted onto aluminum brackets with double-sided bonding tape, sputter-coated with gold, examined and photographed on a Hitachi TM3000 scanning electron microscope.

This study was approved by the Ethical Committee in Animal Use (Comitê de Ética de Uso Animal-CEUA) at the Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP, Brazil, under process number 017/2012 and protocol 1422.

3. Results

The results obtained here show that the ticks male reproductive system studied herein, as well as those of other species of Ixodidae, are morphologically similar. However, significant differences can be observed occuring in particular gonads and cellular structures.

3.1. Gonopore

The gonopore is found in the anteroventral region of the body distal to the anal opening. In the *A. aureolatum* species, the gonopore does not have roughness or setae on its surface, which is concave and rectangular, but with rounded corners and no lateral grooves (Fig. 1A, B). In the *A. sculptum* species, the gonopore can be observed as an elliptical/oval-shaped structure, with a smooth surface and no lateral grooves (Fig. 2A and B). The gonopore of the *A. triste* species on the other hand is rounded, with a concave surface and no setae; it is even laterally surrounded by evident marginal grooves of the ventral-anal scale (Fig. 3A and B).

3.2. *Reproductive System and Germ Cells* (ultramorphology)

The reproductive system of the three species studied here under scanning electronic microscopy, contains organs of similar morphology. The system exhibit a multilobed accessory gland complex located anteriorly to the body; a pair of seminal vesicles positioned antero-dorsally to the glandular complex each one connected to the vasa



Fig. 1. External and internal ultramorphology of *Ambyomma aureolatum* male. (**A-B**) Overview and details of the ventral region, highlighting the gonopore (**GP**). (**C**) Testis (T) and gland complex (GC). (**D-E**) Detail of glandular complex and its lobes. (**F**) Spermatocysts (SC) housing spermatids in the first development stage (**sp I**). (**G**) **splI** spermatids showing cytoplasmic bridges (arrow). (**H-J**) Overview and detail of **spV**. **AA**= anal aperture; **AR** = anterior region; **arrow head** = operculum rim; **cr** = constriction region; **LDL** = Lateral Dorsal Lobe; **op** = operculum; **PDL** = Postero-Dorsal Lobe; **PLE** = Postero-Lateral Lobe; **PR**= posterior region; **SV** = seminal vesicle; **VAS** = ventral-anal shield.

defentia (Fig. 1D and E; 2C and D, 3C and D). The vasa differentia are short and positioned lateral to the gland complex connecting the seminal vesicles to the testes (Fig. 1D, 2D and E).

The testes, in turn, are connected to the vasa deferentia in its proximal region and extend (in length) laterally along the body. They are tubular organs that house, proximally, germ cells in their initial stages of development and



Fig. 2. External and internal ultramorphology of *Ambyomma sculptum* male. (A-B) Overview and details of the ventral region, highlighting the gonopore (GP). (C-D) Overview and Detail of gland complex (GC) and its lobes. (E-F) Testis (T) and vasa deferentia (dd). (G-H) Overview and detail of spV. AA = anal aperture; AR = anterior region; cr = constriction region; LDL = Lateral Dorsal Lobe; op = operculum; PDL = Postero-Dorsal Lobe; PLE = Postero-Lateral Lobe; PR = posterior region; r = operculum rim; SV = seminal vesicle; VAS = ventral-anal shield.

in the distal region, the cells are already in advanced stages of this process (Fig. 1F, G, H; 2E, F and G). In the *A. aureolatum* and *A. sculptum*, testes are separated and the only point of connection between them and the other organs of the reproductive system are the vasa deferentia (Fig. 4A and B). However, in the *A. triste* species, there is an elongation of the tissue that covers the organs connecting both. (Fig. 3E, F and 4C).



Fig. 3. External and internal ultramorphology of *Ambyomma triste* male. (**A-B**) Overview and details of the ventral region, highlighting the gonopore (**GP**). (**C-D**) Overview and Detail of gland complex (GC) and its lobes. (**E**) Photomicrograph in stereomicroscope of the paired testis distal region, where it can be observed the isthmus connecting both. (**F**) Ultramorphology of the same region shown in **E**, where the isthmus is broken. (**G-H**) Spermatids **sp IV** e **sp V**, overview and detail. (**I**) **Sp V** and its rim in detail. **AA** = anal aperture; **AR** = anterior region; **cr** = constriction region; **ct** = isthmus; **DR** = distal region; **LAL**= Antero-Lateral Lobe; **LDL** = Lateral Dorsal Lobe; **op** = operculum; **PLL**= Postero-Lateral Lobe; **PR**= posterior region; **r** = operculum rim; **SV** = seminal vesicle; **VAS** = ventral-anal shield.


Fig. 4. Schematic Drawing of male reproductive system of *A. aureolatum*, *A. sculptum* e *A. triste* species. The main difference observed is the isthmus (CT) between testis in *A. triste*. AGC = accessory gland complex; AR = anterior region; CT = isthmus; PR = posterior region; SV = seminal vesicule; T = testis; VD = vasa deferentia. Not in scale.

The germ cells, which occurs along the entire length of the testes, are spermatids in differentiation process, which are in different stages of development depending on the region analyzed. In the proximal region, the compacted spermatids are deposited inside the spermatocysts (Fig. 1F). In the median region, the spermatids are bigger, less compacted and shows a rounded shape and cytoplasmic bridges (Fig. 1G). The late spermatids can be found distally in the testes, which are elongated cells that can be divided into the two anterior and posterior regions. In the anterior region an operculum can be observed, which varies in shape according to the species, and the posterior region has a tail-like shape (Fig. 1I and J; 2G and H; 3G and H).

In *A. aureolatum*, the two regions of the late spermatids are very distinct, marked by a constriction in their median portion; while the operculum has the shape of a parabola, on its base an edge that faces toward the inside of the cell can be seen (Fig. 1I, 1J and 5A). In *A. sculptum*, the anterior and posterior regions of these cells are distinct. In the anterior region, the conical operculum with a lighter rim on its base can be observed, whereas the extremity of the posterior one has a rounded shape tail-like (Fig. 2G and H, 5B). The regions of the spermatids in the *A. triste* species are very distinct. In the anterior region there is also a long and sharp operculum (which looks like the bird beak), but it has no evident rim on its base (Fig. 5C). The anterior region differs because of a slight median constriction in the cell, which gives the posterior region a tail-like shape (3G and H).

A summary of the comparative results obtained from the SEM of the reproductive system and its germ cells can be seen in Figs. 4 and 5.

3.3. Reproductive system and Spermiogenesis (histology)

The accessory gland complex of the species studied herein have well-developed anterior (ADL) and posterior (PDL) dorsal lobes, with narrow lumen and secretory cells whose cytoplasm is filled with granules. These granules are strongly stained by the hematoxylin (Fig. 6A and C; 7A, B and D; 8A). Two lateral dorsal lobes (LDL) can also be observed which most of their cells show cytoplasm filled with basophilic secretion. However, there are others whose secretion has the shape of granules similar to the other lobes (Fig. 6A; 7C; 8A, B and C). In addition to these, only in A. aureolatum can the anterior ventral lobe (AVL) also be observed, in which the secretory cells are present (Fig. 1A). In the accessory gland complex, pairs of seminal vesicles, which extend in length along the entire extension of the complex, can be observed, presenting a simple cuboidal epithelium overlay and showing a lumen filled with spermatids (Fig. 6C; 7A and B; 8A and C).

The testes of the three species studied herein have a similar morphology and also have germ cells in the same stages of development. By relating the feeding stage and the development of the germ cells, five different stages of the spermiogenesis process can be observed according to the following description. All five stages described here are summarized in Fig. 9.

In the anterior region of the testes the spermatocysts can be observed, which are cysts covered by a simple squamous epithelium, housing spermatids at the same stage. The spermatids from this region will be referred to as spermatids I (**sp I**). Sp I are small cells in which it is not



Fig. 5. Schematic drawing of **sp V** of the three species studied, (**A**) *A. aureolatum*, (**B**) *A. sculptum* and (**C**) *A. triste.* Main difference: operculum morphology (**a**) and form, presence or absence of the rim (**b**).

possible to observe its limits, exhibiting a cytoplasm strongly stained by eosin and a round interphase nucleus stained by the hematoxylin (Fig. 6D).

In the testes median region, the spermatids are still inside the spermatocysts. These cells are in stage II (**sp II**) and already have an evident cellular limit and a round or polygonal shape due to the packaging process inside the spermatocyst. They exhibit a large, round nucleus containing one or two nucleoli. It is possible to observe cytoplasmic bridges between some of the spermatids (Fig. 7E and F).

Between the testes median and distal region, the organization and arrangement of the germ cells into the organ undergo changes. The spermatocysts can no longer be observed and the spermatids are in three distincts stages, namely: spermatid III (**sp III**), IV (**sp IV**) and V (**sp V**). Each of those stages have characteristics of their own. The sp III are rounded, showing an oval-shaped nucleus with the heterochromatin with some condensation points in one of the cell poles. Close to the cell's internal limit, a thick, darker, eosin-colored band can be observed, which has a striated form. In addition, it is possible to notice a structure that looks like a thin, dark thread at the cell pole anterior to the nucleus, which belongs to the acrosome vesicule (Fig. 6E and F; 7G; 8H).

The sp IV undergo a cell-elongation process that changes their previous morphology, including the the nucleus. The cytoplasm is medially stained by the eosin, but it is still possible to observe the cell's external limit. In the sp IV proximal region, the nucleus is strongly stained by the hematoxylin, which evidences a high condensation level of chromatin and the occurrence of an elongation process known as the nuclear process. In the cytoplasm a membranous cisternae can be observerd, which also follows the lengthening of the cell (Fig. 6E and G; 7H; 8G).

Sp V is the last stage in the spermiogenesis. The cell's external limit is visible and there is a slender structure in the center of the cell, which is probably the result of the cisternae fusion observed in the sp IV. The nucleus is located in the cell periphery and is strongly stained by the hematoxylin, following the morphology of the cell (Fig. 6H; 7I; 8F). In the extremity of the anterior region of the sp V a structure that is possibly the operculum can be observed (in greater detail on the SEM) (Fig. 6H, 7I and 8F).

4. Discussion

The knowledge regarding the morphology and development of the male reproductive system of ticks have been increased during the last decades, however its evident the lack of comparative analyses addressing phylogenetic and taxonomic issues. The data available in the literature are old and aimed different purposes, like the morphology and the spermatogenesis description or even the physiology of



Fig. 6. Histological photomicrograph of the gland complex and testis of *A. aureolatum*. (**A**) Overview of the gland complex and its lobes. (**B**) Section of the testes distal region (T) showing spermatids in different stages of development. (**C**) Detail of seminal vesicles. (**D**) Testes proximal region with immature spermatids. (**E-F**) Detail of spermatids III e IV. (**G-H**) Detail of spermatids IV during cellular elongation process. (I) Spermatids V inside the seminal vesicle, showing the helical nucleus (n) and the operculum (op). **ADL** = Antero-Dorsal Lobe; **c** = cisternae; **arrow head** = acrossomal vesicle; **ep** = epthelium; **LDL** = Latero-Dorsal Lobe; **FDL** = Postero-Dorsal Lobe; **sp III** = spermatid III; **sp IV** = spermatid IV; **sp V** = spermatid V; **SV** = seminal vesicle; VAL = Ventro-Anterior Lobe.



Fig. 7. Histological photomicrograph of the gland complex and testis of *A. sculptum*. (**A-B**) Overview of the gland complex showing the seminal vesicles (SV) and the lobes. (**C-D**) Detail of the LDL during transition from granular type to agranular type. (**E-F**) Spermatids II showing cytoplasmic bridges (arrows) between cells. (**G**) Spermatids III full of cisternae and showing the acrossomal vesicle (arrow head). (**H**) Spermatids IV during elongation process, which notes the membrane complex (arrow). (**I**) Sp V showing helical nucleus (n) and the operculum (arrow head). **ADL** = Antero-Dorsal Lobe; **c** = cisternae; **arrow** head = acrossomal vesicle; **ep** = epthelium; **LDL** = Latero-Dorsal Lobe; **PDL** = Postero-Dorsal Lobe; **sc** = spermatocyst; **sp III** = spermatid III; **sp IV** = spermatid IV; **sp V** = spermatid V; **SV** = spermatid V



Fig. 8. Histological photomicrograph of the gland complex and testis of *A. triste.* (**A**) Overview of the gland complex showing the seminal vesicles (**SV**) and the lobes. (**B**) Detail of the proximal region of the testes (T). (**C**) Detail of spermatids I. (**D-E**) Detail of spermatids III full of cisternae and showing the acrossomal vesicule (arrow head). (**F**) Spermatids IV during elongation process, including the nuclear process (n). (**G-H**) Sp V showing helical nucleus (n). **ADL** = Antero-Dorsal Lobe; **c** = cisternae; **arrow head** = acrossomal vesicle; **ep** = epthelium; **LDL** = Latero-Dorsal Lobe; **PDL** = Postero-Dorsal Lobe; **sc** = spermatocyst; **sp** III = spermatid III; **sp IV** = spermatid IV; **sp V** = spermatid V; **SV** = seminal vesicle; **VAL** = Ventro-Anterior Lobe.



Fig. 9. Schematic drawing of spermiogenesis process in the genus *Amblyomma*. (A) First development stage, **sp l**, into spermatocysts. (B) Second stage, **sp ll**, characterized by the cellular limit and bridges (*). (C) Third stage, **sp lll**, which cisternae and acrossomal vesicle are observed. (D) Fourth stage, **sp lV**, characterized by the elongation and nuclear process. (E) Final stage, **sp V**. **ap**=acrosssomal vesicle; **c**=cisternae; **ep**=epithelium; **n**=nucleus; **mc**=membrane complex; **op**=operculum; **sc**=spermatocyst.

the system as a hole, but in none of the published work, an evolutionary approach was given. Additionally, these studies contain data on a few species, which makes difficult any comparative analyses [21–25].

Ticks male reproductive system presents some peculiarities as its morphology, but generally, it seems to be very similar among the species studied to date. According to Soneshine [22,26] the system is composed by a multilobed accessory gland complex which houses dorsally a pair of seminal vesicles, connected laterally to a pair of vasa deferentia, extending then in a pair of tubular testes or in a single horseshoe-shaped testis depending on the species.

The same anatomical pattern was observed in ticks from the Ixodidae family as well as in Argasidae family and in the *Ixodes* (Prostriata) genus. However, the studies conducted so far have pointed out an important difference regarding testes morphology. In the Argasidae ticks Ornithodoros savignyi, O. kelleyi and Argas persicus the authors described the testis as a single horseshoe-shaped organ, whereas in O. moubata species it was observed a pair of testes coneccted by a thin isthmus in its distal region and yet, in the Ar. reflexus species, a pair of testes was observed totally individualized, without any kind of interconnection [22,26].

Studies on specimens of the *lxodes* genus have shown that they have a distally interconnection between these organs, while most of representatives of the Ixodidae family, for all the species studied to date, have a pair of individualized testes [22,26,28].

During this study only *A. triste* specimens presented the testes connected in its distal region by a thin tubularshaped isthmus. For the first time this kind of organization was observed in a tick species from the *Amblyomma* genus, which indicates an apomorphic character among this group of ticks, since most of the Argasidae species, considered basal, present a "single testis" as a product of the plesiomorphic condition. Thus the "separated testes" character would be derived or apomorphic when compared to the "paired testes".

As regards spermatogenesis, this occurs in the same way in ticks from the *Amblyomma* genus, as is demonstrated in this work and in studies conducted by Reger [21] and Wüest et al. [24] on *A. dissimilli* and *A. hebraeum*, respectively. It is important to emphasize that the development process of the germ cells described in the present study is the spermiogenesis, which is the final stage from a series of morphological changes that spermatids go through until it become a mature spermatozoon. Thus, the data obtained to date makes it possible to conclude that: a) the cells in the last stage of spermiogenesis in the male genital tract are late spermatids, classified herein as sp V; and b) the spermatogenesis ends at the nymph instar or when adult is in fasting feeding stage, depending on the species under consideration.

In fed *A. triste* individuals, a portion of the testis was observed to contain some spermatocytes II, a fact that was unreported for ticks from the *Amblyomma* genus in these stages of life and feeding, indicating that spermatogenesis in this species must depend on the adult tick's nutritional state. Anholeto et al. [29] and Sampieri et al. [28] observed spermatocytes II in *A. aureolatum* but not in *A. sculptum*.

With the exception of this subtle difference, spermiogenesis in three species occurred in the same way, being with the sp I (originated from the meiosis of spermatocytes II) which, due to hypertrophy, started to occupy larger areas in the cysts. Following the accentuated hypertrophy event from which originates sp II, the cells become round and show striations, which remain internally attached to the cell limit, also known as cisternae. These structures were also observed by Reger [21] in *A. dissimili*, by Wüest [24] in *A. hebraeum* and by Brinton et al. [23] in *Dermacentor andersoni* which have the same arrangement inside the cell; a characteristic that is apparently shared by the Ixodidae family.

The sp III observed in the three species studied herein had a thin thread anterior to the nucleus, strongly stained by hematoxylin. This thread represents part of the acrosomal complex and probably represents the acrosomal vesicle itself. Reger [21] assumed that this structure would be the acrosomal vesicle in the sp III of *A. dissimili*; In this case, if it is confirmed that this thin thread is in fact the acrosomal vesicle, this would be a feature (a synapomorphy) shared among Arachnida, including free-living mites [31,32].

The sp IV undergo accentuated morphological changes from the sp III, such as cell elongation, high condensation of the nuclear material, fusion of the cisternae in a membranous complex, development of the acrosomal vesicle and formation of the operculum, which are changes that were also observed by other authors when studying spermiogenesis in ticks from the Ixodidae and Argasidae families [21,26].

In addition, in the sp IV, changes that give the nucleus the appearance showed in the sp V (phylliform and helical) also seem to occur in the spermatids of water and phytophagous mites, where this organelle loses its envelope and start to be called as chromatin body. Similarly, the membranous complex formed from the cisternae fusion in the sp IV matches with the descriptions made by the same authors when studying these same water and phytophagous mites [23,26,30–32].

Therefore, regardless of the fact that spermiogenesis in ticks only ends in the female genital tract after mating, the late spermatids or sp V observed in the male genital tract have ultramorphological characteristics which allows us to make a distinction between the three species studied herein, making spermiotaxonomy a useful tool for ticks.

Thus, based on the external cell surface morphology, it was possible to schematically propose a comparison between the sp V of each species, showing how they are different from one another, and find evidence that the sp V of *A. sculptum* is similar to the *A. hebraeum* studied by Wüest et al. [24]. Whereas *A. aureolatum* and *A. triste* sp V exhibits characteristics that until now were never observed in any other studied species from the *Amblyomma* genus.

5. Conclusions

The results obtained herein confirm that there is a species-specific connection between the morphology of ticks male germ cells, setting precedents for the necessity of a thorough investigation regarding the ultrastructure of these cells with spermiotaxonomic and spermiocladistic purposes.

Finally, comparing the morphology of male ticks' reproductive system–as well as its germ cells–can contribute toward understanding problems related to their classification and evolution, especially in groups that present probable polyphyletism, as is the case in the species from the *Amblyomma* genus.

Acknowledgements

This study was financially supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) through grant no. 2012/02384-8, by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoameto de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) through research fellowships to M.I. Camargo-Mathias. The authors have no conflict of interests to declare.

References

- [1] Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, et al. Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) and Amblyomma ovale Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Vet Par 2003;113:273–88.
- [2] Venzal JM, Estrada-Peña A, Castro O, de Souza CG, Félix ML, Guglielmone AA. Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Hosts and seasonality of the vector of Rickettsia parkeri in Uruguay. Vet Par 2008;155:104–9.
- [3] Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone AA. Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick:phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol Biol 2013;13:267.
- [4] Guglielmone AA, Nava S, Mastropaolo M, Mangold AJ. Distribution and genetic variation of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae)in Argentina. Tick Tick Borne Dis 2013;4:386–90.
- [5] Labruna MB, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Cabrera RR. Crossmating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 2011;54:41–9.
- [6] Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA, et al. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with the description of three new species, Amblyomma tonelliae n. sp., Amblyomma interandinum n. sp. and Amblyomma patinoi n. sp., and reinstatement of Amblyomma mixtum Koch 1844, and Amblyomma sculptum Berlese 1888 (Ixodida: Ixodidae). Tick Tick Borne Dis 2014;5:252–76.
- [7] Jamieson BGM. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.
- [8] Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S. Sperm Biology: An Evolutionary Perspective. 1st ed. Oxford: Academic Press; 2009.
- [9] Jamieson BGM. Reproductive biology of invertebrates. 1st ed New York: John Wiley & Sons; 1999.
- [10] Michalik P, Dallai R, Giusti F, Alberti G. The ultrastructure of the peculiar synspermia of some Dysderidae (Aranae, Arachnida). Tissue. Cell 2004;36:447–60.
- [11] Dallai R, Machida R, Uchifune T, Lupetti P, Frati F. The sperm structure of *Galloisiana yuasai* (Insecta, Grylloblattodea) and implications for the phylogenetic position of Grylloblattodea. Zoomorphology 2005;124:205–12.
- [12] Alberti G, Carrera P, Martin P, Smit H. Comparative spermatology of freshwater mites (Hydrachnidia, Acari). Soil Organisms 2008;80:155–69.

- [13] Dallai R, Mercati D, Carapelli A, Nardi F, Machida R, Sekiya K, Frati F. Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta s.s. Arthropod Struct Dev 2011;40: 77–92.
- [21] Reger JF. Spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili*, as revealed by electron microscopy. J Ultra Mol Struct R 1963;8:607–21.
- [22] Sonenshine DE. A contribution to the internal anatomy and histology of the bat-tick Ornithodoros Kelley Cooley and Kohls, 1941, II. The reproductive, muscular, respiratory, secretory and nervous system. J Med Ent 1970;7:298–312.
- [23] Brinton LP, Burgdorfer W, Oliver Jr JH. Histology and fine structure of spermatozoa and egg passage in the female tract of Dermacentor andersoni stiles (Acari-Ixodidae). Tissue Cell 1974;6:109–25.
- [24] Wüest J, El Said A, Swideski Z, Aeschlimann A. Morphology of the spermatid and spermatozoon of *Amblyomma hebraeum* Koch (Acarina; Ixodidae). Z Parasitenkd 1978;55:91–9.
- [25] Shepherd J, Oliver JH, Hall JD. A polypeptide from male acessory glands wich triggers maturation of tick spermatozoa. Int J Inver Rep Dev 1982;5:129–37.
- [26] Sonenshine DE. Biology of ticks. 1st ed. New York: Oxford University Press; 1991.

- [28] Sampieri BR, Labruna MB, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) and *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772): a comparative analysis. Parasitol Res 2014;113:1511–9.
- [29] Anholeto A, Nunes PH, Remédio RN, Camargo-Mathias MI. Testes of fed and unfed *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae), First morphological data. Acta zool-stockholm 2014, http://dx.doi.org/10.1111/az o.12083.
- [30] Reger JF, Cooper DP. Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa from the millipede *Polydesmus sp.* J Ultra Mol Struct R 1968;23:60–70.
- [31] Alberti G. Chelicerata, Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny. In: Jamieson BGM, Adiyodi KG, Adiyodi RG, editors. Reproductive Biology of the Invertebrates. New York: Wiley & Sons; 2000.
- [32] Pepato AR, Antoniazzi MM, Jared C. Spermatogenesis, sperm cell morphology and accompanying secretions from two interstitial marine mites. Acta Zool-Stockholm 2014, <u>http://dx.doi.org/</u> 10.1111/azo.12105.

4.5. CAPÍTULO 5

Espermiocladística e filogenia molecular de espécies do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). Novas perspectivas na sistemática de carrapatos. Espermiocladística e filogenia molecular de espécies do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). Novas perspectivas na sistemática de carrapatos.

Bruno Rodrigues Sampieri¹; Fredy Arvey Rivera Páez²; Gilberto Orivaldo Chierice³; Elen Fernanda Nodari¹; Maria Izabel Camargo Mathias^{1*}.

¹UNESP, Av. 24^a, 1515, Bela Vista. Rio Claro-SP.

²Universidade de Caldas, Manizales-Caldas, Colômbia.

³Departameto de Química e Física Molecular, USP, São Carlos-SP, Brasil.

*autor correspondente: micm@rc.unesp.br, 5519 3526-4151

Resumo

A espermiocladística e a espermiotaxonomia tem se mostrado ferramentas valiosas na solução de conflitos na sistemática de Metazoa. Técnicas de biologia molecular e análise genética vem sendo utilizadas também com o objetivo de solucionar tais conflitos, tornando as análises filogenéticas mais robustas e gerando propostas aceitáveis. Dentre os carrapatos, as espécies abrigadas na subfamília Amblyomminae vem recebendo especial atenção devido a ocorrência de espécies crípticas, complexos de espécies e polimorfismos que resultam numa difícil classificação dos indivíduos e compreensão das suas relações de parentesco. Dentro deste contexto, o presente trabalho fez uso de um levantamento de caracteres morfohistológicos do sistema reprodutor masculino de carrapatos do gênero Amblyomma com o objetivo de testar tais caracteres dentro das propostas de agrupamento já existentes das espécies Amblyomma aureolatum, A. triste e A. sculptum. Além disso foram realizadas análises moleculares dos genes 16S, ITS2 e COI e construção de árvores filogenéticas com base nestes genes para comparação destes com as propostas já existentes na literatura e com o dendograma gerado através das análises morfológicas. Assim, os resultados aqui obtidos mostraram que: a) A. aureolatum e A. triste são aparentados com suporte na morfologia e na biologia molecular; b) a monofilia da subfamília Amblyomminae foi confirmada agrupando as espécies deste gênero aqui estudadas tanto pela análise cladística como pela filogenia molecular; e c) confirmou-se a proposta de existência dos complexos "cajennense", sendo A. cajennnese, A. mixtum e A. scultpum espécies geneticamente distintas, e do complexo "maculatum" onde as espécies A. maculatum e A. triste são provavelmente espécies monotípicas. Sendo assim, o sistema reprodutor masculino de carrapatos e suas células germinativas exibem caracteres elegíveis para análises cladísticas, sendo então a espermiocladística e a espermiotaxonomia ferramentas úteis para o estudo de Ixodida.

Palavras-chave: espermiocladística, filogenia, taxonomia, carrapatos.

Introdução

A sistemática de carrapatos (Ixodida) vem sendo discutida há décadas, sendo que periodicamente a filogenia de vários grupos é reavaliada através de novas ferramentas de análise que, frequentemente, as tornam mais robustas quando considerados dados que são gerados de maneira integrativa.

Dentre as subfamílias de carrapatos mais conhecidas, Amblyomminae tem recebido especial atenção por abrigar espécies crípticas que até então eram consideradas polimórficas por autores que aderiam às análises de Hoogstral e Aeschliman. Com isso, algumas importantes revisões foram realizadas fazendo uso de técnicas de filogenia molecular e de biogeografia. Estudos desenvolvidos por Black e Piesman (1994), Burger et al. (2012), Beati et al (2013) e Nava et al (2014), já demonstraram a origem polifilética da subfamília, bem como a sua distribuição atual no continente americano e o real status taxonômico de algumas espécies de grande importância médica e veterinária, caso de *Amblyomma cajennense* ss.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de reunir os resultados até agora obtidos a partir das descrições realizadas por Sampieri et al. (2014; 2015 a, b) da anatomia e da morfologia do sistema reprodutor masculino de carrapatos do gênero *Amblyomma*, único gênero de Amblyomminae, de ocorrência no Brasil. A partir dos dados gerados nestes estudos, buscou-se listar os caracteres que podem ser utilizados numa análise cladística, bem como relacioná-los numa tabela para posteriormente obter-se um dendograma. Este dendograma foi então comparado às árvores filogenéticas geradas a partir dos genes 16S, ITS2 e COI na tentativa de confirmar o sistema reprodutor masculino e suas células germinativas como fonte de caracteres elegíveis para a sistemática de carrapatos.

Material e Métodos

Caracteres morfológicos e construção do dendograma

Para a realização deste estudo foram utilizados caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino de carrapatos obtidos em estudos morfohistológicos previamente publicados na literatura (SAMPIERI et al., 2014, 2015a, 2015b).

Os caracteres dizem respeito a três táxons representantes do gênero *Amblyomma* (Ixodidae, Amblyomminae): *A. aureolatum* (A), *A. triste* (B) e *A. sculptum* (C). A espécie *Ornithodoros rostratus* foi utilizada como Grupo Externo (GE), visto a mesma pertencer à família Argasidae.

Os caracteres elegíveis com variação relevante foram baseados na observação da morfologia e ultramorfologia do sistema reprodutor masculino destas espécies e codificados conforme o estado do caractere como: apomórfico = 1 e plesiomórfico = 0. Em seguida foi elaborada uma matriz de caracteres contendo: os táxons, os caracteres e o código de estado de cada um deles (0 ou 1) (Tabela 1).

A partir desta matriz foi elaborado manualmente um dendograma para o agrupamento dos táxons.

Filogenia molecular

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do grupo de pesquisa GEBIOME, liderado pelo Prof. Associado Fredy Arvey Rivera Páez, do Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, da Universidade de Caldas, Manizales-Caldas, Colômbia.

Além das espécies do gênero *Amblyomma* utilizadas nos estudos morfológicos, para esta etapa foram incluídas também: *A. cajennense ss* (Brasil) e *A. mixtum* (Colômbia) como representantes do complexo "*cajennense*"; *A. maculatum* (Brasil) pertencente ao complexo "*maculatum*"; e *Dermacentor nitens* (Colômbia) e *Rhipicephalus sanguineus* sl (linhagem tropical) (Brasil) como representantes da subfamília Rhipicephalinae.

Extração de DNA

Foi realizada fazendo-se uso do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) (conforme protocolo padrão sugerido pelo fabricante). A quantidade e qualidade do DNA foram determinadas mediante espectrofotometria utilizando para isso o espectrofotômetro Nanovue Plus.

Amplificação

O DNA extraído de cada espécimen de carrapato foi submetido à reação em cadeia de polimerase (PCR), amplificando um fragmento do segundo espaço transcrito interno (ITS2) do DNA ribossômico nuclear, presente em todas as espécies de carrapatos. Para a PCR, foi utilizado um par de iniciadores "primers" ITS2 (F) 5'-

CCATCGATGTGAAYTGCAGGACA-3' (ZAHLER; GOTHE; RINDER, 1995) e MCLN (R) 5'-GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGGT-3' (MCLAIN et al., 1995), os quais correspondem a sequências da região 5.8S e 28S, respectivamente, portanto amplificando um fragmento de DNA contendo a sequência completa do ITS2 do rDNA, possuindo em torno de 1100 pb em carrapatos do gênero *Amblyomma*, com algumas pequenas variações intra e interespecíficas (MARRELLI et al., 2007).

Além disso, foi amplificado dois genes mitocondriais, um DNA *barcoding* da região 5' do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (COI) utilizando os primers standard para invertebrados LCO1490 (F) 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HCO2198 (R) 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (FOLMER et al., 1994) que amplificam um fragmento aproximado de 700pb para carrapatos, além do DNA mitocondrial 16S rDNA também foi amplificado utilizando os primers F 5' – CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT – 3' e R 5' – CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG – 3' (NORRIS et al. 1996) que amplificam um fragmento de aproximadamente de 460pb.

A reação de amplificação foi feita em microtubos de 200 μ L e volume final de 50 μ L que contem 28.4 μ L de agua ultrapura, 10 μ L de buffer 5X, 3 μ L de MgCl₂ (25mM), 4 μ L da mescla (10 mM) de dNTP's, 0.6 μ L de cada primer (25 μ M), 2 unidades de GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega), 3 μ L de DNA do carrapato (aproximadamente 300 ng do DNA). A amplificação do gene COI mtDNA foi feita em termociclador (Techne *-TC-Plus*) tendo em conta as seguintes condições para: desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 5 ciclos de 94°C por 5 min, 46°C por 1 min 30s e 72°C por 1 min e 30 seg, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min, concluindo a reação com uma extensão final a 72°C por 5 min. A amplificação do gene ITS2 foi feita com o seguinte perfil térmico: desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 36 ciclos de 95°C por 45s, 57°C por 1 min, e 72°C por 1 min e 30 s, concluindo a reação com uma extensão final a 72°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 48 °C por 45 s, e 72°C por 45 s, concluindo a reação com uma extensão final a 72°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 7 min.

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com tampão de corrida TBE 1X pH 8.0 à 110v/50mA. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio e visualizado em foto documentador **Gel Doc-It2 310** (UVP). Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit Wizard®

SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo as instruções do fabricante e enviados para obter as sequencias de DNA a Macrogen Advancing Through Genomics – Corea do Sul (as sequencias obtidas serão depositadas no GenBank).

Para o gene ITS2 foram utilizadas sequências adicionais como base para comparação retiradas do Genbank, bem como para o gene 16S também do Genbank e para o COI, do Genbank e do BOLD – Barcode of Life Data System. As espécies e os respectivos códigos de acesso constam na Tabela 2. Todas as espécies estudadas encontram-se listadas na mesma tabela.

Análises das Sequências

A análise da qualidade das sequências de DNA foi realizada no programa Geneios Trial v8.14 (DRUMMOND et al., 2009). O alinhamento das sequências realizou-se no programa ClustaW (THOMPSON; GIBSON; HIGGINS, 2002) incluído no programa Mega 6 (TAMURA et al., 2013).

A variação de sequência foi estimada utilizando-se o padrão Kimura 2-K2P (KIMURA, 1980). Das árvores foram construídas com base em Maximum Likelihood (ML) para o gene nuclear ITS2 e mitocondrial 16S rDNA, sendo que uma árvore foi contrída a partir do método de Neighbor-Joining (NJ) para o gene mitocondrial COI. Ambos os métodos foram realizados com 1000 réplicas de bootstrap. Os parâmetros de K2P foram selecionados para se encontrar a distância genética em Mega 6 (TAMURA et al., 2013).

Resultados

Morfologia

A espécie *O. rostratus* (Argasidae) utilizada como grupo externo teve seus caracteres estabelecidos como plesiomórficos pois sabe-se que os representantes de Argasidae são basais e, provavelmente, o ancestral que originou os Ixodida se assemelhava aos membros desta família.

Sendo assim os caracteres elegíveis e seus estados utilizados neste trabalho foram: **1) Anatomia do Testículo** - Testículo único (0), Testículo pareado com conexão (1), Testículo pareado individualizado (1); **2) Vesícula seminal** – Disposição Lateral (0); Dorsal (1); **3) Espermatogênese** - Finalizando em estágio imaturo (0), Finalizando no estágio adulto (1); **4) Pontes citoplasmáticas** - Ausentes (0), Presentes (1); **5) Forma do** núcleo e condensação da cromatina nas espermátides imaturas - Redondo com cromatina centralizada (0), Oval com cromatina periférica (1); 6) Número de estágios de formação das cisternas membranosas nas espermátides - Três (0), Dois (1); 7) Formação do processo nuclear - Não evidente (0); Evidente (1), 8) Aro do opérculo - Presente (0); Ausente (1); 9) Constrição do tipo cauda na espermátide madura - Presente (0); Ausente (1); e 10) Forma do núcleo da espermátide madura – Filiforme (0); Espiral (1).

	Caráter										
Táxons		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Α	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	В	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	С	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
	GE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ABC	ABC	AB	ABC	ABC	ABC	ABC	В	С	AB

Tabela 1 - Matriz de Caracteres Elegíveis para Hipótese de Homologia

Legenda: GE - Grupo Externo; A - A. aureolatum; B - A. triste; C - A. sculptum

A reunião dessas informações possibilitou a construção da Tabela 1 onde fica evidenciado que: a) os caracteres **8** e **9** são apomorfias de *A. triste* e de *A. sculptum*, respectivamente, caracterizando uma autapomorfia nesta análise, b) os caracteres **3** e **10** são sinapomorfias de *A. aureolatum* e *A. triste*, o que agrupa estes dois táxons e c) os caracteres **1**, **2**, **4**, **5**, **6** e **7** agrupam os três táxons foco do presente estudo, estabelecendose assim a ocorrência de seis sinapomorfias que sustentam o agrupamento sugerido.

Desta forma, a sugestão de agrupamento dos táxons estudados com o grupo externo e exibida pelo dendograma gerado manualmente, seria:

Figura 1 - Dendograma e Apomorfias que o suportam



Legenda: GE - Grupo Externo; A - A. aureolatum; B - A. triste; C - A. sculptum.

Análises moleculares

Os genes aqui utilizados, 16S, ITS2 e COI, mostraram árvores filogenéticas de topologia semelhante, apesar das análises com ITS2 não terem sido realizadas com o grupo externo. Nesta análise, utilizou-se um maior número de táxons para comparação devido à base de dados moleculares de carrapatos ser vasta e de fácil acesso.

	ITS2	168	COI	
A. aureolatum	AF469611	JN800433		
A. cajennense ss	JN866864	KM042849		
A. maculatum		KT037681		
A. mixtum	KF527295	KM519935	KF200097	
A. sculptum	JN866846	KT238826	GBCH10808-13 (BOLD)	
A 41 4 -	41/007444	AY498563 (Brasil)		
A. irisie	A100/114	JN180848 (Chile)		

Tabela 2 - Espécies de estudo e Códigos de Acesso para os genes estudados

D. nitens	KC503275		KF200099	
O. rostratus		DQ295780	NC_023372	
R. sanguineus sl	KF958400	JX997391		
Linhagem tropical				

*Para alguns genes não foi necessário a utilização de base de dados

Desta forma, o gene 16S rDNA das espécies aqui analisadas mostra que há um suporte de 74% da hipótese de parentesco entre *A. aureolatum* e *A. triste* e de 81% deste agrupamento com *A. sculptum* e as demais espécies do complexo "*cajennense*". Além disso fica evidente o suporte de 97% do complexo "*maculatum*" que inclui *A. triste* e *A. maculatum*. As espécies que fazem parte do complexo "*cajennense*" utilizadas neste estudo apresentam um suporte de 99%, incluindo *A. sculptum*, *A. mixtum* (Colômbia) e *A. cajennense ss.*

As distâncias genéticas do gene 16S dentro das espécies do complexo "*cajennense*" mostram um valor máximo de 4.4% e mínimo de 0.3%, sendo 10.4% - 7% entre estas espécies. A divergência genética entre *A. triste* e *A. maculatum* é de 1.8% - 1.2% e entre o complexo "*maculatum*" e a espécie *A. aureulatum* fica entre 12.5% - 11.4%. Entre as espécies do complexo "*cajennense*" e as demais do gênero *Amblyomma* mostram um valor máximo de 21.6% e mínimo de 17.6%, além de uma distância genética entre 27.4%-24% com o gênero *Rhipicephalus* e de 23.3% -19.6% com o gênero *Dermacentor*. A distância genética do grupo externo (*O. rostratus*) com as espécies da família Ixodidae é de 42.3% -31.9%.



Figura 2 - Árvore Filogenética baseada em um fragmento de 460 pb do gene 16S rDNA de espécies do gênero Amblyomma obtida com o método Kimura 2K2P. O Bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acesso no GenBank estão indicados entre parênteses. Ornithodoros rostratus foi utilizado como "outgroup".

O gene ITS2 mostra um resultado similar quanto ao complexo "*cajennense*" de 98% de suporte e de correlação entre *A. aureolatum* e *A. triste* de 100%. A relação entre *A. aureolatum* e *A. triste* com *A. sculptum* apresenta suporte de 70%. Além disso, fica clara a monofilia entre *Dermacentor nitens* e *R. sanguineus* (Ripicephalinae).

Este mesmo gene mostra resultados similares ao 16S quanto a distância genética, ficando entre a máxima de 1.3% e mínima de 0.0% dentro das espécies do complexo "*cajennense*", e uma divergência genética de 5.3% - 0.9 entre as espécies do mesmo complexo. A distância entre *A. triste* e *A. aureulatum* é de 28.3% -15%. As espécies do género *Amblyomma* apresentam distâncias genéticas entre 91.3%-75.4% com o gênero *Riphicephalus* e entre 87.7 -76.3% como o gênero *Dermacentor*.



Figura 1 - Árvore Filogenética baseada na sequência completa de 1100 pb do gene ITS2 de espécies do gênero Amblyomma obtida com o método Kimura 2K2P. O Bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acesso no GenBank estão indicados entre parênteses. Rhipicephalus sanguineus e Dermacentor nitens foram utilizados como "outgroup".

O DNA barcode COI, confirma a identidade das espécies estudadas com distância genética máxima de 4.9% e mínima de 0.2% dentro das espécies do complexo "*cajennense*" (*A. cajennense ss*, *A. mixtum*, *A. scultptum*) e distâncias genéticas variando de 20.2% -14,6% entre as mesmas. A distâncias genéticas entre as espécies do gênero Amblyomma e o gênero Dermacentor fica entre 20.6% -27.2%.

O COI, analisado pelo método Neighbor Joinig (NJ), confirma com 100% de suporte que os espécimes de *A. aureolatum* coletados constituem a mesma espécie, evidenciando uma relação de parentesco desta com *A. sculptum* e o complexo "*cajennense*" de 51%, confirmando a identidade das espécies aqui estudadas.



Figura 2 - Árvore Filogenética baseada em um fragmento de 700 pb do gene COI de espécies do gênero Amblyomma obtida com o método NJ. O Bootstrap está representado nos nós da árvore e os números de acesso no GenBank estão indicados entre parênteses. Ornithodoros rostratus foi utilizado como "outgroup".

Discussão

A análise cladística realizada neste estudo traz informações importantes à respeito da filogenia de carrapatos do gênero *Amblyomm*a, foco de controvérsias e reavaliações constantes nos últimos anos. Apesar de ficar evidente a necessidade da utilização de uma amostragem maior de táxons do gênero e até de grupos externos (seria o caso de incluir membros da subfamília Rhipicephalinae e mais espécies da família Argasidae) o dendograma gerado confirmou a relação de parentesco já conhecida através de outras análises de filogenômica.

A novidade neste estudo é a utilização de caracteres morfológicos até então nunca utilizados para se compreender as relações de parentesco entre carrapatos. Como mostrado nos trabalhos de Sampieri et al. (2015 a, b), a espermiotaxonomia mostrou ser uma promissora ferramenta na separação de espécies de Ixodida, da mesma forma que a filogenia destes também pode ser beneficiada por informações geradas através da análise e compreensão da morfologia e ultraestrutura do sistema reprodutor e de suas células germinativas em carrapatos.

As hipóteses de homologia das estruturas do sistema reprodutor mostraram-se sólidas, uma vez que o agrupamento sugerido no dendograma (mesmo não tendo sido utilizado o método de parcimônia) corroboraram as análises moleculares aqui também realizadas, bem como em outros estudos, nos quais a subfamília Amblyomminae é de gênero único e monofilética e *A. auraolatum* e *A. triste* são mais aparentadas entre si do

que com *A. sculptum* e outras espécies do complexo "*cajennense*" (BLACK; PIESMAN, 1994; BURGER et al., 2012; DOBSON; BARKER, 1999; GUGLIELMONE et al., 2003; KLOMPEN, 2000; NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009; NAVA et al., 2014).

A filogenia proposta a partir das árvores obtidas dos três genes aqui estudados corroborou as propostas encontradas na literatura atual, bem como a análise cladística realizada neste estudo. Isso ficou evidente com a separação das subfamílias Amblyominnae e Rhipicephalinae, e dos complexos de espécies conhecidos dentro do gênero *Amblyomma*, como foi o caso das espécies *A. maculatum* e *A. triste* que compõe o complexo "*maculatum*". No presente estudo os dados obtidos sinalizaram que possivelmente estas espécies são na verdade uma só, como já proposto por outros autores (ESTRADA-PEÑA et al., 2005).

Da mesma forma, as espécies do complexo "*cajennense*" tiveram seu agrupamento evidenciado nas árvores aqui geradas, nas quais as espécies *A. cajennense*, *A. mixtum* e *A. sculptum* seriam agrupadas e fortemente suportadas. Na análise do gene COI a separação entre as três espécies, até então classificadas todas como sendo *A. cajennense*, ficou bem clara com suporte na ordem de 94% para o complexo e com distâncias genéticas de até 20%, ou seja, seriam espécies distintas, porém muito próximas.

Embora este estudo seja ainda preliminar os dados obtidos já sinalizaram que a morfologia e a ultraestrutura do sistema reprodutor masculino de carrapatos podem gerar caracteres elegíveis para o estabelecimento de hipóteses de homologia e de estudos cladísticos. Através de estudos pormenorizados destes caracteres poder-se-á obter a construção de uma filogenia robusta de Ixodida, principalmente fazendo-se uso de análises ultraestruturais, relacionando então evolutivamente os carrapatos com outros ácaros Parasitiformes que já tiveram seus sistemas reprodutores e espermatozoides amplamente estudados.

Referências

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034–10038, 1994.

BURGER, T. D. et al. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic.

Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 64, n. 1, p. 45–55, 2012.

DOBSON, S. J.; BARKER, S. C. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus Aponomma is paraphyletic. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 11, n. 2, p. 288–295, 1999.

ESTRADA-PEÑA, A. et al. The Amblyomma maculatum Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of A. parvitarsum Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. **Systematic parasitology**, v. 60, n. 2, p. 99–112, 2005.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294–299, 1994.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) and Amblyomma ovale Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273–288, 2003.

KLOMPEN, J. Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. Cladistics, v. 16, n. 1, p. 70–102, 2000.

MARRELLI, M. T. et al. Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 222–228, 2007.

MCLAIN, D. K. et al. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spaces 1 among eastern populations of Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, v. 32, p. 353–360, 1995.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with the description of three new species, Amblyomma tonelliae n. sp., Amblyomma interandinum n. sp. and Amblyomma patinoi n. sp., and reinstatement of Amblyomma mixtum Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, v. 14, p.

2857-2877, 2009.

SAMPIERI, B. R. et al. Dynamics of cell and tissue genesis in the male reproductive system of ticks (Acari: Ixodidae) Amblyomma cajennense [corrected] (Fabricius, 1787) and Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772): a comparative analysis. **Parasitology research**, v. 113, n. 4, p. 1511–9, 2014.

SAMPIERI, B. R. et al. Comparative analysis of spermatids of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Ixodidae) and Ornithodoros rostratus ticks (Argasidae): morphophysiology aimed at systematics. **Parasitology Research**, 2015a.

SAMPIERI, B. R. et al. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of Amblyomma ticks (Acari : Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2015b.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. mst197, p. 11–25, 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics, v. 00:2.3:2.3, 2002.

ZAHLER, M.; GOTHE, R.; RINDER, H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of Dermacentor reticulatus and D. marginatus (Acari: Ixodidae). International Journal for Parasitology, v. 25, p. 1413–1419, 1995.

5. Discussão Geral

Morfologia do Sistema Reprodutor

O sistema reprodutor masculino (SRM) de carrapatos apresenta um padrão anatômico-morfológico que é observado em diversos grupos de artrópodes terrestres (MICHALIK; MERCATI, 2010; MICHALIK, 2007; PEPATO; ANTONIAZZI; JARED, 2016; SONENSHINE; ROE, 2014), estando o mesmo composto essencialmente por: a) uma glândula seminal, denominada por Sonenshine e Roe (2014) de complexo glandular acessório, a qual é ainda por sua vez subdividida em lobos. Esta glândula é responsável pela síntese e secreção de substâncias envolvidas na composição do fluído seminal e do espermatóforo; b) um par de testículos tubulares posicionados lateralmente ao corpo do animal. Dependendo do táxon considerado pode encontrar um par de testículos os quais por sua vez podem estar: individualizados (sem nenhum tipo de conexão), conectados apenas na sua porção mais distal por meio de um fino fio de tecido conectivo, ou ainda o testículo pode ser único e em forma de "U" (MONTASSER; GADELHAK; TARIQ, 2005; REGER, 1963; ROSHDY, 2014; SONENSHINE; ROE, 2014; SONENSHINE, 1970).

Este padrão morfológico (presença de glândula seminal e testículos pareados) é encontrado em todos os Ixodida estudados até o momento e, como já mencionado, de acordo com o táxon considerado, pequenas variações podem estar presentes. Ao se comparar o SRM de Ixodida com outros grupos de Acari observa-se que estas variações são mais frequentes. Em muitos acariformes também como já mencionado anteriormente, o SRM se reduz a um órgão que é único, ou seja, o testículo representa todo o sistema e exibe duas porções distintas observadas apenas em secções histológicas visto as mesmas terem funções diferentes. Estas duas porções desempenham funções diferentes, sendo que a anterior é secretora (semelhante ao observado no complexo glandular acessório dos carrapatos) e a posterior é germinativa, ou seja, tem a função de originar as células reprodutivas (ALBERTI et al., 2008; KRANTZ; WALTER, 2009; PEPATO; DA ROCHA, 2010).

Este plano de organização estrutural e celular do SRM nos acariformes tem sido considerada como uma condição plesiomórfica dentre os Acari, sendo que um par de testículos representaria a condição apomórfica neste clado, ou ainda uma homoplasia surgindo de maneira independente nos táxons inferiores.

Os registros da literatura têm demonstrado que em Aranae (Chelicerata, Arachnida), que é uma ordem com relações de parentesco com Acari, o SRM limita-se à um par de testículos tubulares e um par de ductos deferentes que se fundem em sua extremidade proximal, vindo então a formar a chamada ampola. Na maioria das famílias de Aranae descritas, os testículos são pares e totalmente individualizados, no entanto Michalik et al. (2007) descreveram em Mesothelae, a presença de um fino tecido fazendo a conexão entre as regiões distais dos mesmos, caráter morfológico este que não foi até o momento observado em outras famílias. Estes mesmos autores consideraram que este seria um caráter apomórfico em Aranae.

Da mesma forma, para Ixodida, essa característica dos testículos (par individualizado ou par conectado distalmente) tem sido considerada apomórfica em Ixodidae e a plesiomórfica seria caracterizada pela presença do testículo único e em forma de "U", como observado em *Ornithodoros rostratus* mostrado aqui e em outros membros de Argasidae, registros estes já disponíveis na literatura. Sendo assim, fica claro que a ferramenta morfologia agrega subsídios que podem ser uma fonte de caracteres a qual deve também ser considerada quando da realização de análises cladísticas, aqui utilizadas para agrupar os carrapatos do gênero *Amblyomma* (ROSHDY, 2014; SONENSHINE, 1970).

O complexo glandular acessório (CGA) encontrado no SEM de carrapatos é morfologicamente descrito como sendo uma glândula secretora multilobada cuja atividade de síntese e de secreção fica intensificada conforme o estado de alimentação em que o carrapato se encontra, visto este ser fator limitante para o desenvolvimento das células germinativas. Os lobos que compõe essas glândulas foram classificados por Sonenshine e Roe (2014) de acordo com a sua localização no interior do carrapato, a saber: ventral, dorsal ou lateral, além de nessa classificação também ter sido considerado que tipo de secreção as mesmas produziriam (granular ou não), chamados então de lobos granulares e não-granulares (esponjoso).

Nos Ixodidae, de modo geral, tem-se observado a ocorrência de glândulas com apenas um lobo principal o qual se estende desde a região ventral até a dorsal. Além desta são também observados mais quatro pares de lobos laterais, totalizando então nove lobos, todos classificados como granulares (SONENSHINE; ROE, 2014). Nos Argasidae os registros mostram a ocorrência de um lobo dorsal e um ventral, ambos classificados como granulares, além de um segundo lobo ventral, só que este classificado como não-granular (esponjoso). Registra-se ainda a presença de três pares de lobos laterais sendo todos granulares (SONENSHINE; ROE, 2014; SONENSHINE, 1970).

Desta forma, analisando os registros disponíveis na literatura há uma sinalização que o número de lobos do CGA não varia significativamente entre as famílias de carrapatos, não sendo, portanto, este caráter elegível para análises de hipóteses de homologia. Contudo, foram detectadas divergências com as descrições na literatura relacionadas ao tipo de secreção produzida pelos lobos em Ixodidae. Assim sendo, a ocorrência em *A. aureolatum* e em *A. sculptum* de um lobo não-granular é uma informação inédita para o grupo, uma vez que até então a ocorrência deste tipo de lobo só havia sido registrada para carrapatos Argasidae.

No presente trabalho também ficou evidente que o lobo não-granular encontrado em *A. aureolatum* e *A. sculptum* não seria de fato um tipo de lobo, mas sim um estado fisiológico dos lobos do CGA conforme se aproxima o momento da cópula. Isso é evidenciado no Capítulo 4 do presente trabalho, onde observa-se um dos lobos desta glândula em fase de transição entre o que seria um lobo granular e um não-granular. Isso indica que a dinâmica de secreção dos lobos pode ser alterada conforme a necessidade do indivíduo no momento da produção tanto do fluído seminal quanto do espermatóforo.

As ordens Chelicerata, Aranae e Scorpiones, não possuem glândula seminal ou acessória desenvolvidas, e assim a função secretora do fluído seminal ficaria sob a responsabilidade das células do ducto deferente e da ampola. Em Ricinulei (ordem mais aparentada de Acari) registrou-se a ocorrência de uma vesícula seminal a qual seria responsável pela síntese e liberação de secreção neste grupo, surgindo então um órgão específico para esta função. Já em Acari a complexidade morfológica desta glândula aumenta muito no desenvolvimento, como é o caso de Ixodidae. No caso de Acari, as únicas exceções seriam alguns Acariformes nos quais os testículos desempenhariam este papel secretor (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; MICHALIK; MERCATI, 2010; MICHALIK, 2007; SONENSHINE; ROE, 2014).

É provável então que, estudos mais detalhados sobre a glândula seminal em Chelicerata, possam resultar em novos caracteres elegíveis para análises cladísticas e assim subsidiar a compreensão da evolução do sistema reprodutor masculino neste grupo de Arthropoda.

Espermatogênese e Espermiogênese

Os estudos desenvolvidos com Ixodidae têm levado os pesquisadores a concordarem que as células germinativas encontradas no interior dos testículos passariam pelo processo de espermatogênese (diferenciação das espermatogônias em espermatócitos I e II) apenas após o ingurgitamento da ninfa período que antecederia a muda para o estágio adulto. Sendo assim, nos testículos de um carrapato adulto e no estágio de jejum alimentar seriam observadas espermatogônias em divisão celular, bem como espermatócitos nas fases I e II de desenvolvimento (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; KRANTZ; WALTER, 2009; SONENSHINE; ROE, 2014).

As células que são denominadas de espermátides podem estar em diversos estágios de diferenciação no interior dos testículos. E ainda aquelas classificadas como imaturas seriam células que acabaram de passar por divisão meiótica e teriam características morfológicas que as diferenciariam dos espermatócitos, como: a) tamanho reduzido quando comparadas aos espermatócitos, devido a divisão meiótica reducional; e b) citoplasma reduzido e pouco evidente abrigando um núcleo grande e central, com cromatina semicondensada.

Nos carrapatos especificamente estas células sofreriam hiperplasia tão logo o animal entrasse em contato com o hospedeiro, processo este que continuaria quando o macho encontra-se as fêmeas em repasto sanguíneo. Durante a ocorrência do processo de hiperplasia celular, as espermátides agora em desenvolvimento teriam como característica importante a presença de pontes citoplasmáticas ligando uma célula à outra, tendo então no estágio seguinte sua morfologia alterada durante o processo de alongamento celular.

No presente estudo, inicialmente acatou-se a classificação de Sonenshine e Roe (2014) e sua interpretação do desenvolvimento das células germinativas masculinas de carrapatos. Porém, ao longo da execução do projeto, percebeu-se a necessidade de mudar a abordagem deste processo. Assim *A. aureolatum* e *A. triste* foram as espécies nas quais observou-se machos em jejum com as células germinativas em fase final de divisão, fenômeno este que foi considerado como a etapa final da espermatogênese que originaria as espermátides imaturas, ou sp I. Em machos em jejum de *A. sculptum* e de *R. sanguineus* foram encontradas apenas espermátides imaturas, concluindo-se então que nestas duas espécies no adulto ocorreria apenas a espermiogênese.

Essas características levaram os autores deste trabalho a concluírem que o processo de espermatogênese pode ser finalizado: ou ainda no estágio ninfal do indivíduo ou no momento da ecdise de ninfa para o adulto em Ixodidae (Metastriata), semelhante

ao que ocorre no gênero *Ixodes* e na família Argasidae, além de ter também sido registrado em ácaros Acariformes e em quelicerados da ordem Solifugae (KLANN et al., 2009; PEPATO; ANTONIAZZI; JARED, 2016; PEPATO; DA ROCHA, 2010).

Segundo a literatura, quando a espermatogênese é concluída no final do estágio imaturo ela é considerada em Ixodida como sendo um caráter plesiomórfico, e a sua condição apomórfica aproxima *A. aureolatum* e *A. triste* entre si e posteriormente com *A. sculptum*.

Outros autores que também realizaram trabalhos abordando o desenvolvimento, a morfologia e a ultratestrutura das células germinativas de carrapatos reforçaram a idéia de que o processo observado nos testículos de machos adultos de carrapatos Ixodida seria realmente a espermiogênese (BRINTON; BURGDORFER; OLIVER JR., 1974; DUMSER; OLIVER, 1981; REGER, 1961, 1963, 1974; WÜEST et al., 1978).

Reger (1961, 1963, 1974) e Wüest et al. (1978), descrevendo a espermiogênese em carrapatos do gênero *Amblyomma*, evidenciaram três estágios (de cinco no total) neste processo, além de terem demonstrado as características específicas de cada um deles, as quais incluiriam a formação de pontes citoplasmáticas nas sp II, a presença de cisternas membranosas na face interna da membrana citoplasmática das sp III, de opérculo (estrutura que se abre durante a maturação do espermatozoide para liberação do complexo membranoso já no trato feminino), do complexo membranoso e do processo motor das sp V. Estes mesmos cinco estágios foram também encontrados na espermiogênese de Acariformes, com marcada semelhança na morfologia e ultraestrutura entre as células nos estágios sp III (PEPATO; ANTONIAZZI; JARED, 2016; PEPATO; DA ROCHA, 2010).

Histologia e Ultramorfologia das Espermátides Maduras

Segundo Krantz e Walter (2009) os espermatozoides de Acari são células que não possuem flagelos, sendo então classificados como "derivados" ou "modificados" (os que são flagelados são denominados como do tipo "primitivo") (BIRKHEAD; HOSKEN; PITNICK, 2009; JAMIESON; ROUSE, 1989). Este tipo "modificado", na maioria dos casos, passaria por um processo final de maturação conhecido como capacitação da espermátide (ou capacitação do espermatozoide), o que poderia ocorrer ou no próprio SRM, no interior do espermatóforo (quando o organismo em questão o produz), ou após a cópula, neste caso no interior do trato reprodutor feminino (espermateca, âmpola, útero, receptáculo seminal) (HODGSON, 1986; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; SONENSHINE; ROE, 2014).

Em carrapatos sabe-se ainda que o processo de maturação das espermátides tem início ainda no interior do espermatóforo, no SRM, e se completa apenas após alcançar o lúmen do receptáculo seminal na fêmea (FELDMAN-MUHSAM; BORUT, 1978, 1983; RESLER et al., 2009). Sendo assim, o estágio celular mais avançado da espermiogênese que poderia ser encontrado no SRM de carrapatos, incluindo nos das espécies aqui estudadas, seria a espermátide madura, classificada como espermátide V ou sp V. Estas seriam então definidas como células alongadas filiformes que, em secções histológicas, exibiriam estrutura membranosa em duas ou quatro unidades (REGER, 1974; RESLER et al., 2009). Sob microscopia de luz de campo claro, seriam ainda observadas estruturas membranosa no interior celular, as quais formariam um complexo membranoso originário da fusão de parte das cisternas nas sp III que, segundo Reger (1974) e Sonenshine e Roe (2014) formariam o canal acrossomal.

Segundo estes mesmos autores, as demais cisternas das sp III poderiam exercer duas outras funções: armazenar glicogênio fixando-se na face interna da membrana plasmática próxima aos feixes de miofibrilas e de microtúbulos; ou se fundiriam a membrana plasmática da espermátide formando estruturas em forma de "ganchos" na face externa da membrana, o que auxiliaria no movimento da célula após a capacitação. A formação destas cisternas intracelulares foi também observada em ácaros Acariformes, principalmente em Trombidiformes, mas sua função parece limitar-se a armazenar glicogênio.

Nas espermátides em estágio V (maduras) são observados caracteres que podem ser de relevância nas análises de sistemática, tais como: a forma do núcleo, a forma do opérculo e a presença ou ausência do aro na base do opérculo. Especificamente, o núcleo pode ser filiforme, ou em espiral (em forma de saca-rolhas) neste último caso como é observado em Aranae na maioria das famílias estudadas. A forma do opérculo pode ser um caractere útil para a taxonomia, uma vez que apresenta variações intraespecíficas, que permitem a separação de espécies muito próximas através de sua descrição. Já a presença ou ausência de um aro em sua base trata-se de um caractere elegível para análise cladística, sendo sua ocorrência uma condição plesiomórfica entre os Ixodida.

O sistema reprodutor masculino como potencial alvo de substâncias acaricidas

O sistema reprodutor e sua organização celular e tecidual, tanto nos machos quanto nas fêmeas de carrapatos, tem sido alvo de estudos da ação de substâncias que

Bruno Rodrigues Sampieri

apresentam potencial acaricida, visto já se ter registros de que as mesmas interfeririam nestes sistemas, alterando os parâmetros reprodutivos do ectoparasita e consequentemente modificando a dinâmica populacional no ambiente (infestações naturais) (ARNOSTI et al., 2011a; DA SILVA MATOS et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2012; POLITI et al., 2012; SAMPIERI et al., 2012, 2013b; VENDRAMINI et al., 2012).

No caso do sistema reprodutor masculino de carrapatos sabe-se que as células germinativas em processo de desenvolvimento (espermatogênese e espermiogênese) são sensíveis a quaisquer alterações fisiológicas do animal, incluindo-se aí a situação de exposição dos indivíduos às substâncias com comprovado potencial tóxico. Contudo, quando estas células atingem o último estágio sp V da espermiogênese, ou seja, quando as mesmas estão totalmente diferenciadas, elas tornam-se como que "blindadas" à ação direta de alguns agentes externos uma vez que o encapsulamento da célula espermática de carrapatos serve como barreira contra estes agentes (MONTASSER; GADELHAK; TARIQ, 2005; RESLER et al., 2009; ROSHDY, 2014; SHEPHERD; OLIVER; HALL, 1982).

Sendo assim, no presente trabalho a primeira análise dos resultados gerados por meio da exposição de coelhos hospedeiros aos ésteres do ácido ricinoléico do óleo de mamona, mostrou a ocorrência de poucas alterações morfohistológicas e histoquímicas diretas nas espermátides maduras de *A. cajennense sl.* Porém, o que ficou caracterizado foram alterações de nível considerado severo sobre a dinâmica de síntese e de secreção das glândulas que fazem parte do CGA, bem como sobre organização estrutural do tecido dos espermatocistos, evidenciando assim a potencialidade dos ésteres como agentes de controle de ectoparasitas.

Ressalte-se aqui que modificações nestes níveis tornam as células germinativas impotentes para realizarem a fecundação, bem como a modificação da quantidade e da própria qualidade da secreção também limitariam esse sucesso. Possivelmente, com a exposição dos indivíduos aos ésteres em questão houve um prejuízo estrutural na formação do espermatóforo e na composição do fluído seminal a ponto de o processo de capacitação dos espermatozoides ter sido alterado, dificultando e/ou inviabilizando a fertilização dos ovócitos no trato genital feminino. A ação destes ésteres também poderia ser observada no quesito motilidade dos espermatozóides a qual pode ser comprometida uma vez que a fonte de energia na célula animal é o glicogênio (polissacarídeo) armazenado nas cisternas membranosas das espermátides e alvo de ataque dos esteres.

De forma geral, a ação dos ésteres aqui estudados já foi descrita anteriormente por Messetti et al. (2010) sendo efetiva como hidrolisadora de polissacarídeos, o que sinalizaria que os mesmos seriam importantes agentes que alterariam o arranjo dos polissacarídeos e das glicoproteínas elementos envolvidos na organização do tecido, bem como na estrutura celular do SRM. A qualidade do material secretado pelo CGA certamente interferiu na qualidade das espermáitdes maduras produzidas por *A*. *cajennense sl* dos grupos tratados, ainda que isso não tivesse sido evidenciado pela morfologia aparentemente íntegra destas células.

Além disso, a oferta (15 dias antes da infestação + 15 dias durante a infestação) da ração enriquecida com os ésteres aos coelhos hospedeiros foi a forma mais adequada de se realizar a exposição destes animais a esta classe de substâncias, visando assim a obtenção de melhores resultados no controle destes ectoparasitas, bem como aproximando ao máximo os bioensaios realizados em laboratório daqueles que poderiam ser aplicados no campo, objetivo primeiro quando se busca novas estratégias de controle de pragas.

6. Conclusões

 a) A anatomia e a morfologia do sistema reprodutor masculino de carrapatos são caracteres importantes na comparação entre famílias, espécies e táxons, sendo ainda ferramenta importante na elucidação das relações de parentesco entre os diferentes táxons.

 b) A análise ultramorfologica e a ultraestrutural das células germinativas masculinas de carrapatos, trazem informações de suma importância para a taxonomia e filogenia destes organismos.

c) A elucidação das fases e da classificação do desenvolvimento das células germinativas masculinas de carrapatos, fornecem dados importantes quando se estuda a dinâmica celular e tecidual, os quais permitem a melhor compreensão da biologia reprodutiva destes ectoparasitas, e contribuem com a base para os estudos de sistemática e de controle de carrapatos;

 d) O sistema reprodutor masculino de carrapatos é um potencial alvo que deve ser considerado nos estudos com químicos naturais e sintéticos com o objetivo de se realizar o controle destes animais. e) A forma como se dá a transmissão das alterações das células germinativas devido a exposição a agentes tóxicos é uma temática que precisa ser mais explorada, uma vez que a biologia reprodutiva de uma determinada espécie está diretamente relacionada com o sucesso populacional e evolutivo da mesma, além de se mostrar como um alvo alternativo ao sistema nervoso destes animais (a maioria das substâncias pesticidas tem ação sobre o sistema nervoso) de substância com potencial para controlar pragas urbanas e agrícolas.

7. Referências

ALBERTI, G. et al. Comparative spermatology of freshwater mites (Hydrachnidia, Acari). Soil Organisms, v. 80, n. 2, p. 155–169, 2008.

ALONSO-DÍAZ, M. A. et al. Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) tick populations susceptible or resistant to acaricides in the Mexican Tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 326–331, 2013.

ANHOLETO, L. A. et al. Testes of fed and unfed Amblyomma cajennense ticks (Acari: Ixodidae). First morphological data. **Acta Zoologica**, v. 382, n. July, p. n/a–n/a, 2014.

ARNOSTI, A. et al. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of Ricinus communis on the vitellogenesis of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 575–580, 2011a.

ARNOSTI, A. et al. Effects of Ricinus communis oil esters on salivary glands of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 569–74, 2011b.

ARZUA, M. et al. Amblyomma aureolatum and Ixodes auritulus (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental and Applied** Acarology, v. 31, n. Araga 2001, p. 283–296, 2003.

BARKER, S. C.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: A review of recent progress. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 55–68, 2002.

BEATI, L. et al. Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.

BILINSKI, S. M.; DALLAI, R. Gonads and gametes as indicators of speciation, arthropod phylogeny and taxonomic understanding. Arthropod structure & development, v. 43, n. 4, p. 255–6, 2014.

BIRKHEAD, T. R.; HOSKEN, D. J.; PITNICK, S. Sperm Biology. An Evolutionary Perspective. 1 st ed. Burlington: Academic Press, 2009.

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida)

based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034–10038, 1994.

BRINTON, L. P.; BURGDORFER, W.; OLIVER JR., J. H. Histology and fine structure of spermatozoa and egg passage in the female tract of Dermacentro andersoni stiles (acari-Ixodidae). **Tissue & cell**, v. 6, n. 1, p. 109–125, 1974.

BURGER, T. D. et al. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 45–55, 2012.

CAMARGO-MATHIAS, M. I. Comparative Results of Action of Natural and Synthetic Acaricides in Reproductive and Salivar Systems of Rhipicephalus sanguineus - Searching by a Sustainable Ticks Control. In: PERVEEN, F. (Ed.). . Insecticides - Advances in Integrated Pest Management. 1st. ed. Rijeka: InTech, 2012. p. 708.

CASTAGNOLLI, K. C. et al. Acquired resistance of horses to Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 271–283, 2003.

CELESTINO, F. N. et al. TOXICIDADE DO ÓLEO DE MAMONA À BROCA-DO-CAFÉ [Hypothenemus hampei (FERRARI) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE)]. **Coffee Science**, v. 10, p. 329–336, 2015.

COLWELL, D. D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14–21, 2011.

COONS, L. B.; ALBERTI, G. Ticks. In: HARRISON, F. W. (Ed.). . Microscopic Anatomy of Invertebrates. New York: Willey-Liss, 1999.

DA SILVA MATOS, R. et al. Histopathological study of ovaries of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) exposed to different thymol concentrations. **Parasitology research**, v. 113, n. 12, p. 4555–65, 2014.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Spermatozoa of the "primitive type" in Scutigerella (Myriapoda, Symphyla). **Tissue & cell**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 2000.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Axonemal structure and insect phylogeny. **Bolletino di zoologia**, v. 60, n. 4, p. 423–429, 1993.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)

(Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Veterinary Parasitology, v. 152, n. 3-4, p. 173–185, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 43–55, 2015a.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of Rhipicephalus sanguineus group ticks. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 9–13, 2015b.

DE OLIVEIRA, P. R. et al. Morphological characterization of the nymphs Rhipicephalus sanguineus ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian tubules, and midgut on the detachment day. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 6, p. 727–36, 2012.

DUMSER, J. B.; OLIVER, J. H. Kinetics of spermatogenesis, cell-cycle analysis, and testis development in nymphs of the tick Dermacentor variabilis. Journal of Insect **Physiology**, v. 27, n. 11, p. 743–753, 1981.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Further observations on spermatophore formation in argasid ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 24, n. 10-11, p. 693–697, 1978.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. On the spermatophore of ixodid ticks. Journal of Insect Physiology, v. 29, n. 5, p. 449–457, 1983.

FERREIRA, C. M. et al. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. **Brazilian dental journal**, v. 13, n. 2, p. 118–22, 2002.

FLECHTMANN, C. H. W. Elementos de Acarologia. 1st. ed. São Paulo: Nobel, 1975.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294–299, 1994.

FREITAS, E. DE P. E S.; ZAPATA, M. T. A. G.; FERNANDES, F. DE F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental and Applied** Acarology, v. 53, n. 2, p. 189–202, 2011.

GAZETA, G. S. et al. Potential vectors and hosts of rickettsia spp: epidemiological
studies in the 'ba, state of Rio de Janeiro/Brazil Vale do Paraı. v. 15, p. 269–270, 2009.

GRAF, J.-F. et al. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. S427–S442, 2004.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) and Amblyomma ovale Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273–288, 2003.

GUGLIELMONE, A. A. et al. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. **Zootaxa**, v. 28, n. 2528, p. 1–28, 2010.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Distribution and genetic variation of Amblyomma triste (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 5, p. 386–390, 2013.

HODGSON, A. N. Invertebrate Spermatozoa—Structure and Spermatogenesis. Archives of Andrology: Journal of Reproductive Systems, v. 17, n. 2, p. 105–114, 1986.

HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A. **Tick-Host Specificity**Bulletin de la Société Entomologique Suisse. **Anais**...1982Disponível em: http://doc.rero.ch/record/19829>

JAMIESON, B. G. M.; ROUSE, G. W. THE SPERMATOZOA OF THE POLYCHAETA (ANNELIDA): AN ULTRASTRUCTURAL REVIEW. **Biological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 93–157, maio 1989.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KELLY, P. J. et al. Efficacy of slow-release tags impregnated with aggregationattachment pheromone and deltamethrin for control of Amblyomma variegatum on St. Kitts, West Indies. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 182, 2014.

KISZEWSKI, A. E.; MATUSCHKA, F.; SPIELMAN, A. MATING STRATEGIES AND SPERMIOGENESIS IN IXODID TICKS. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 46, p. 167– 182, 2001.

KLANN, A E. et al. Ultrastructure of spermatozoa of Solifuges (Arachnida, Solifugae): possible characters for their phylogeny? **Tissue & cell**, v. 41, n. 2, p. 91–103, 2009.

KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. A Manual of Acarology. 3. ed. Lubbock: Texas Tech

University Press, 2009.

LABRUNA, M. B. et al. Cross-mating experiments with geographically different populations of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied** Acarology, v. 54, n. 1, p. 41–49, 2011.

LANDAU, S. Y. et al. Neem-tree (Azadirachta indica Juss.) extract as a feed additive against the American dog tick (Dermacentor variabilis) in sheep (Ovis aries). **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 311–317, 2009.

LEONARDO, M. R. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oilbased irrigant. **Journal of endodontics**, v. 27, n. 12, p. 717–9, 2001.

LIMA, V. L. S. et al. Atividade inseticida do óleo de mamona sobre Diaphania nitidalis (Stoll) (Lepidoptera: Pyralidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 3, p. 347–351, 2015.

MANS, B. J. et al. Nuttalliella namaqua: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23675, 2011.

MANS, B. J. et al. The mitochondrial genomes of Nuttalliella namaqua (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and Argas africolumbae (Ixodoidae: Argasidae): estimation of divergence dates for the major tick lineages and reconstruction of ancestral blood-feeding characters. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49461, 2012.

MARRELLI, M. T. et al. Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. Journal of Medical Entomology, v. 44, p. 222–228, 2007.

MARTINS, T. F. et al. Nymphs of the genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75–99, 2010.

MATOS, M. et al. Parasite control practices and public perception of parasitic diseases : A survey of dog and cat owners. **Preventive Veterinary Medicne**, v. 122, p. 174–180, 2015.

MCLAIN, D. K. et al. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spaces 1 among eastern populations of Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). Journal of Medical

Entomology, v. 32, p. 353–360, 1995.

MENDES, A. D. S. et al. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 183, n. 1-2, p. 136–9, 2011.

MESSETTI, M. A. et al. ESTUDO DO DERIVADO DO ÓLEO DE RICINUS COMMUNIS L . (MAMONA) COMO AGENTE BIOCIDA E REDUTOR DA VISCOSIDADE PRODUZIDA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 301– 308, 2010.

MICHALIK, P. Spermatozoa and spermiogenesis of Liphistius cf. phuketensis (Mesothelae, Araneae, Arachnida) with notes on phylogenetic implications. Arthropod Structure and Development, v. 36, n. 3, p. 327–335, 2007.

MICHALIK, P.; MERCATI, D. First investigation of the spermatozoa of a species of the superfamily Scorpionoidea (Opistophthalmus penrithorum, Scorpionidae) with a revision of the evolutionary and phylogenetic implications of sperm structures in scorpions (Chelicerata, Scorpiones). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, v. 48, n. April, p. 89–101, 2010.

MONTASSER, A.; GADELHAK, G.; TARIQ, S. Impact of ivermectin on the ultrastructure of the testis of Argas (Persicargas) persicus (Ixodoidea: Argasidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 119–129, 2005.

MUSCO, L. et al. Sperm ultrastructure of three Syllinae (Annelida, Phyllodocida) species with considerations on syllid phylogeny and Syllis vittata reproductive biology. **Zoomorphology**, v. 129, n. 2, p. 133–139, 2010.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with the description of three new species, Amblyomma tonelliae n. sp., Amblyomma interandinum n. sp. and Amblyomma patinoi n. sp., and reinstatement of Amblyomma mixtum Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 14, p. 2857–2877, 2009.

OHMES, C. M. et al. Comparative Efficacy of an Imidacloprid/Flumethrin Collar

(Seresto®) and an Oral Fluralaner Chewable Tablet (Bravecto®) against Tick (Dermacentor variabilis and Amblyomma americanum) Infestations on Dogs: a Randomised Controlled Trial. **Parasitology Research**, v. 114, n. S1, p. 95–108, 2015.

PEPATO, A. R.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Spermatogenesis, sperm cell morphology and accompanying secretions from two interstitial marine mites. Acta Zoologica, v. 97, n. 1, p. 60–66, 2016.

PEPATO, A. R.; DA ROCHA, C. E. F. On spermiogenesis, sperm cell morphology and accompanying secretions of Copidognathus (Acari: Halacaridae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 249, n. 3-4, p. 151–164, 2010.

PERRY, B. The Genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae) — A Guide to the Brown Ticks of the WorldPreventive Veterinary Medicine, 2001.

POLITI, F. A. S. et al. Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of Tagetes patula L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806). **Parasites & vectors**, v. 5, p. 295, 2012.

REGER, J. F. The Fine Structure of Spermatids from the Tick, Amblyornma dissimili. J. Ultrastructure Research, v. 5, p. 584–599, 1961.

REGER, J. F. Spermiogenesis in the Tick, Amblyomma dissimili, os Revealed by Electron Microscopy. J. Ultrastructure Research, v. 8, n. 5, p. 607–621, 1963.

REGER, J. F. The Origin and Fine Structure of Cellular Processes in Spermatozoa of the Tick Dermacentor andersoni. J. Ultrastructure Research, v. 48, p. 420–434, 1974.

RESLER, J. H. et al. Migration and motility of spermatozoa in the female reproductive tract of the soft tick Ornithodoros moubata (Acari, Argasidae). **Parasitology**, v. 136, n. 5, p. 511–21, 2009.

RODRÍGUEZ-VALLE, M. et al. Efficacy of Rhipicephalus (Boophilus) microplus Bm86 against Hyalomma dromedarii and Amblyomma cajennense tick infestations in camels and cattle. **Vaccine**, v. 30, n. 23, p. 3453–3458, 2012.

ROMER, Y. et al. Rickettsia parkeri Rickettsiosis in Different Ecological Regions of Argentina and Its Association with Amblyomma tigrinum as a Potential Vector. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1156–1160, 2014.

ROSHDY, M. A. Comparative Internal Morphology of Subgenera of Argas Ticks (

Ixodoidea , Argasidae). I . Subgenus Carios : Argas vespertilionis (Latreille , 1802). **The Journal of Parasitology**, v. 47, n. 6, p. 987–994, 2014.

RUBINI, A. S. et al. Acquisition and transmission of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae). Veterinary **Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 324–327, 2009.

S. NAVA, A. ESTRADA-PEÑA, T. PETNEY, L. BEATI, M. B. LABRUNA, M. P. J. SZABÓ, J. M. VENZAL, M. MASTROPAOLO, A. J. MANGOLD, A. A. G. The taxonomic status of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806). Veterinary parasitology, p. 1–11, 2014.

SAMPIERI, B. R. et al. Ultrastructural changes in the ovary cells of engorged Rhipicephalus sanguineus female ticks treated with esters of ricinoleic acid from castor oil (Ricinus communis). **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 5, p. 683–90, 2012.

SAMPIERI, B. R. et al. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to castor oil (Ricinus communis): An ultrastructural overview. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 611–619, 2013a.

SAMPIERI, B. R. et al. Effect of ricinoleic acid esters from castor oil (Ricinus communis) on the oocyte yolk components of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Veterinary parasitology**, v. 191, n. 3-4, p. 315–22, 2013b.

SENRA, T. O. S. et al. Investigation of activity of monoterpenes and phenylpropanoids against immature stages of Amblyomma cajennense and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 112, n. 10, p. 3471–6, 2013.

SHEPHERD, J.; OLIVER, J. H.; HALL, J. D. A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, v. 5, p. 129–137, 1982.

SONENSHINE, D. E. Contribution to the internal anatomy and histology of the bat tick Ornithodoros kelleyi Cooley and Khols, 1941. II. The Reproductive, muscular, respiratory, excretory and nervous system. **J. Med. Ent.**, v. 7, n. 3, p. 289–312, 1970.

SONENSHINE, D. E.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Tick control: further thoughts on a research agenda. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 550–551, dez. 2006.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of Ticks**. 2 ed ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SWEI, A. et al. The genome sequence of Lone Star virus, a highly divergent bunyavirus found in the Amblyomma americanum tick. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62083, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. mst197, p. 11–25, 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics, v. 00:2.3:2.3, 2002.

VENDRAMINI, M. C. R. et al. Action of andiroba oil (Carapa guianensis) on Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of reproductive system. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 12, p. 1745–1754, 2012.

VENZAL, J. M. et al. Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Hosts and seasonality of the vector of Rickettsia parkeri in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 104–109, 2008.

WILLADSEN, P. Tick control: Thoughts on a research agenda. Veterinary Parasitology, v. 138, n. 1-2, p. 161–168, 2006.

WÜEST, J. et al. Morphology of the Spermatid and Spermatozoon of Amblyomma hebraeum Koch (Acarina; lxodidae). Zeitschrift fur Parasitenkunde, v. 55, p. 91–99, 1978.

ZAHLER, M.; GOTHE, R.; RINDER, H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of Dermacentor reticulatus and D. marginatus (Acari: Ixodidae). International Journal for Parasitology, v. 25, p. 1413–1419, 1995.