



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA
EXTERNA E DO SISTEMA REPRODUTOR
DE FÊMEAS DE *Amblyomma brasiliense*
Aragão, 1908 (ACARI: IXODIDAE).**

GUSTAVO SERON SANCHES

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

Rio Claro/SP.
Junho – 2009.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

**CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA
EXTERNA E DO SISTEMA REPRODUTOR
DE FÊMEAS DE *Amblyomma brasiliense*
Aragão, 1908 (ACARI: IXODIDAE).**

GUSTAVO SERON SANCHES

Orientadora: Profa. Dra. MARIA IZABEL CAMARGO MATHIAS

Co-Orientador: Prof. Dr. GERVÁSIO HENRIQUE BECHARA

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

Rio Claro/SP.
Junho – 2009.

595.42 Sanches, Gustavo Seron
S211c Caracterização da morfologia externa e do sistema
reprodutor de fêmeas de *Amblyomma brasiliense* Aragão,
1908 (Acari : Ixodidae) / Gustavo Seron Sanches. - Rio Claro
: [s.n.], 2009
70 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

Co-orientador: Gervásio Henrique Bechara

1. Ácaro. 2. Carrapatos. 3. Morfologia. 4. Ovário. 5.
Imaturos. 6. Descrição. I. Título

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

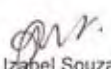
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)


DISSETAÇÃO DE MESTRADO defendida em 30/06/2009

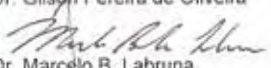
Caracterização da morfologia externa e do sistema reprodutor feminino do carrapato
Amblyomma brasiliense (Aragão, 1908) (Acari: Ixodidae)

GUSTAVO SERON SANCHES

Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo


Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira


Prof. Dr. Marcelo B. Labruna

Dedico este trabalho aos meu pai Miguel, minha mãe Cristina e minha irmã Roberta, por estarem sempre ao meu lado apoiando e incentivando.

“Aventure-se, pois da mais insignificante pista surgiu toda a riqueza que o homem já conheceu” (John Masefield).

Agradecimentos

*Agradeço especialmente a minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias**, por ter aceitado me orientar e desenvolver comigo este trabalho; por seu exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa*

*Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara**, pela atenção e gentileza com o qual sempre me atendeu em seu laboratório; pelas idéias, ensinamentos e correções e por me acompanhar em mais esta etapa.*

*Ao **Prof. Dr. Edílberto Gianotti** por me acompanhar desde o início deste trabalho e pelas sugestões sempre bem vindas.*

*À **Prof. Dra. Darci Moraes Barros-Battesti** pelo incentivo ao estudo de morfologia e pelas dúvidas esclarecidas.*

*Aos **Membros da Banca Examinadora**, pela disponibilidade de análise deste trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.*

*Aos **companheiros de pesquisa do Departamento de Biologia**, Alex, André, Carol, Débora, Érika, Gabby, Gislaine, Karim, Letícia, Luís, Pablo e Patrícia pela amizade e pela ajuda em todos os momentos.*

*A todos os **funcionários do Departamento de Biologia**, em especial ao Gerson, Mônica e Antônio que participaram diretamente deste trabalho.*

Ao funcionário do Departamento de Patologia Veterinária de Jaboticabal, Ronaldo Del Vecchio e à Claudinha do Departamento de Microscopia Eletrônica pela ajuda e disposição.

À desenhista do Departamento de Biologia, Cristiane, pela ajuda e pela sua disposição.

Ao amigo Marcos André pelos momentos de conversa, pelo incentivo e pela ajuda nos momentos difíceis.

À FAPESP pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento desta dissertação.

A todos que em algum momento estiveram presentes em minha vida e que de alguma forma contribuíram para o crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	5
1.1 O carrapato e a importância de estudos de morfologia externa	5
1.2 Morfologia do sistema reprodutor feminino	9
1.3 Importância econômico-sanitária dos carrapatos	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Carrapatos	16
3.2 Morfometria	17
3.3 Ultramorfologia externa	18
3.4 Ultramorfologia interna	18
3.4 Histologia dos Ovários	19
4. RESULTADOS	20
Capítulo 1: Morphological description of <i>Amblyomma brasiliense</i> Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs	22
1. Introduction	24
2. Material and Methods	25
2.1 Origin of ticks	25
2.2 Material preparation	25
3. Results	26

3.1 Larva	26
3.2 Nymph	27
4. Discussion	29
5. Acknowledgements	32
6. References	32
Capítulo 2: Ovary and oocytes vitellogenesis description of the tick <i>Amblyomma brasiliense</i> Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae)	39
1. Introduction	41
2. Material and Methods	41
2.1 Ticks	41
2.2 Morphology	41
2.3 Scanning electron microscopy	42
2.4 Histology	42
3. Results	42
3.1 Ultramorphology	42
3.2 Histology	42
3.3 Classification of oocytes	43
4. Discussion	44
5. Acknowledgements	46
6. References	47
5. DISCUSSÃO GERAL	53
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	68

RESUMO

O presente estudo apresenta a descrição da morfologia externa de larvas e a redescrição de ninfas do carrapato *Amblyomma brasiliense*, utilizando microscopia de luz, lupa estereoscópica e microscopia eletrônica de varredura. As larvas apresentaram a base do capítulo retangular, palpos curtos e idiossoma arredondado, coxa I com dois espinhos, sendo o externo mais longo que o interno e coxas II e III com um espinho, enquanto as ninfas apresentaram a base do capítulo também retangular, com córnua pontiaguda, idiossoma oval, coxa I com dois espinhos evidentes, sendo o externo mais longo que o interno, coxas II e III com um espinho curto em cada uma, e coxa IV, com um espinho muito pequeno e a presença de tubérculos quitinosos na superfície interna da borda posterior dos festões.

Além disso, a morfologia do ovário e o processo de dinâmica da vitelogênese dos ovócitos de fêmeas ingurgiradas desta espécie de carrapato também são apresentados. O ovário, classificado como panoístico por não apresentar células foliculares e nutridoras, consiste em estrutura tubular única e contínua com ovócitos de vários tamanhos e diferentes estádios de desenvolvimento, presos a parede epitelial por meio do pedicelo. Tais ovócitos

são aqui classificados em cinco estádios de acordo com a aparência do citoplasma, observação da vesícula germinal, aspecto dos grãos de vitelo e deposição do córion. Pela primeira vez foi observado em carrapatos ovócitos com o córion esculpado.

ABSTRACT

The present study shows the external morphological description of larvae and the redescription of nymphs of *Amblyomma brasiliense* ticks under light microscope, stereoscopic microscope and scanning electron microscope. Larvae present basis capituli rectangular, short palpi, idiosoma rounded, coxa I with two spurs being the external longer than the internal one and coxae II and III each with one short spur. Nymphs present basis capituli rectangular with a sharp pointed cornua, oval idiosoma with scutum reaching coxa III and coxae I with two evident spurs being the external longer than the internal one; coxae II-III each with one short spur and coxae IV with a very short spur and chitinous tubercles on internal surface of posterior border of festoons.

Furthermore, the ovary morphology and the dynamics of the vitellogenesis process in oocytes of *Amblyomma brasiliense* engorged females. The ovary is classified as the panoistic type; therefore, it lacks nurse and follicular cells. This organ consists of a single tubular structure, continuous, with oocytes of various sizes and at different developmental stages remain attached to the ovary through a cellular pedicel. The oocytes were classified into five stages described according to cytoplasm appearance, presence of the germ

vesicle, yolk granules aspects, and chorion deposition. For the first time was related in ticks oocytes chorium sculptured.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. O carrapato e a importância de estudos de morfologia externa

Carrapatos são ectoparasitos que pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida. A subordem Ixodida compreende três famílias: Argasidae, Nuttalliellidae e Ixodidae.

Dentro da família Ixodidae, o gênero *Amblyomma* Koch 1844 é estimado em 127 espécies, das quais aproximadamente 57 estão descritas e encontradas na região Neotropical, e destas, 33 são relatadas no Brasil (GUIMARÃES et al., 2001; BARROS-BATTESTI et al., 2005). Entretanto, a biologia da maioria dos carrapatos da fauna brasileira silvestre é ainda desconhecida e muitas vezes até o hospedeiro ou seu nicho ecológico original são ignorados.

Além disso, existem poucas informações a respeito das características morfológicas desses carrapatos, principalmente dos estágios imaturos, o que torna difícil sua identificação até o nível de espécie.

Enquanto as descrições de estágios imaturos estão disponíveis para a maioria das espécies africanas e australianas, estas são muito fragmentadas para as de origens neotropicais. Das espécies descritas do Novo Mundo, a maioria é para o estágio adulto, sendo muito incompleta para os imaturos (CAMICAS et al., 1998).

Segundo Barros-Battesti et al. (2005), existem poucos estudos morfológicos sobre as formas imaturas, e a maioria das descrições foram realizadas utilizando-se apenas a microscopia de luz, porém, muitas estruturas são melhor observadas com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura.

Barbieri et al. (2007) relatam a escassez de estudos morfológicos baseados na quetotaxia e na porotaxia de larvas e ninfas do gênero *Amblyomma*.

A característica morfológica mais notável dos carrapatos é a aparente ausência de divisões corporais. A segmentação abdominal desapareceu na maioria das espécies ao longo da ontogenia e o abdômen fundiu-se ao prossomo. O que pode ser erroneamente identificado como cabeça, trata-se de um conjunto de peças bucais quitinizadas que formam o rostro ou capítulo (STORER e STEBBINS, 2000; RUPPERT et al., 2005).

Coincidindo com essa fusão, o corpo inteiro se encontra revestido por um único escudo esclerotizado de formato variável (RUPPERT et al., 2005).

Embora coriáceo, este tegumento é flexível e viabiliza um aumento considerável de volume quando o animal se alimenta de sangue (REY, 2002; RUPPERT et al., 2005).

Ventralmente, nos carrapatos podem ser observadas as seguintes estruturas: abertura genital, abertura anal, placas ou escudos quitinosos e placas espiraculares (REY, 2002).

O carrapato *Amblyomma brasiliense*, cujas ninfas e adultos foram descritos pela primeira vez por Aragão (1908), é um dos representantes da ixodidofauna silvestre brasileira e os poucos relatos existentes dizem respeito à sua biologia e ecologia. Espécie comum parasitando o porco-do-mato (*Tayassu tajacu*), também ocorre em menor número no queixada (*Tayassu pecari*), paca (*Agouti paca*), cotia (*Dasyprocta agouti*), capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*)

e anta (*Tapirus terrestris*). Já foi assinalada também na ave jacu-pemba (*Penelope superciliaris*) (GUIMARÃES et al., 2001).

Nas matas em que porcos-do-mato são abundantes, o homem é muito atacado por esta espécie, principalmente pelas suas larvas, mas ainda desconhece-se sua capacidade vetorial de bioagentes para seres humanos ou mesmo para animais. Sua distribuição se dá na Argentina, Paraguai e Brasil (RJ, SP, ES, PA, MG) (ARAGÃO, 1936).

Recentemente, esta espécie foi encontrada em trilhas de animais em reserva de Mata Atlântica no Parque Estadual de Intervales, no sul do Estado de São Paulo (SZABÓ et al., 2003).

Szabó et al. (2006) observaram que humanos poderiam servir de hospedeiro para ninfas de *A. brasiliense* e de *A. incisum*, permitindo o desenvolvimento destes. Reações às picadas dos carrapatos variam consideravelmente entre indivíduos, e o prurido é a principal resposta de defesa primária e inata contra o ectoparasito, podendo ainda ocorrer a hiperemia e o inchaço no local das picadas.

Estudos realizados no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP Jaboticabal, SP mostraram que esta espécie de carrapato possui um ciclo de vida de aproximadamente um ano em condições de laboratório (20°C, 90% de umidade e fotoperíodo de 12 horas) e que tais condições seriam essenciais para o seu desenvolvimento, com sensibilidade à variações de temperatura e de umidade (SANCHES et al., 2008).

Morfológicamente, os machos possuem a coxa I com dois espinhos, coxas II e III com dois tubérculos, coxa IV com espinho externo e um interno reduzido a um pequeno tubérculo, escudo castanho claro, com manchas amareladas e festões prolongados por lâminas quitinosas, salientes, não incisadas (GUIMARÃES et al., 2001).

Por seu lado, as fêmeas possuem tubérculos quitinosos nos ângulos internos dos festões, base dorsal do gnatossoma retangular com os ângulos posterolaterais salientes, tubérculos quitinosos em todos os festões, exceto no situado ao centro, escudo com bordo escuro e centro acobreado, espinhos da

coxa I curtos, o interno correspondendo à metade do comprimento do externo (GUIMARÃES et al., 2001).

Muitas investigações vêm sendo realizadas com carrapatos, principalmente enfocando aspectos bioeconômicos, ecologia e estudos com anatomia externa principalmente de carrapatos adultos, com vistas à taxonomia (HOOGSTRAAL, 1956; TILL, 1961; OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Amorim e Serra Freire (1999) larvas do gênero *Amblyomma* são de difícil identificação. Keirans e Durden (1998) apontam a mesma dificuldade para as ninfas. Tal fato pode estar relacionado com a escassa quantidade de informações disponíveis na literatura especializada sobre sua morfologia.

Clifford e Anastos (1960) apontam que as deficiências de conhecimento sobre a sistemática de larvas podem ser atribuídas a alguns fatores: poucos caracteres consistentes para a inclusão em chaves taxonômicas; descrições inadequadas; relativamente poucas espécies criadas em laboratório e obtidas à partir de fêmeas identificadas; e a virtual impossibilidade de associar larvas coletadas no campo com adultos correspondentes.

Dessa forma, torna-se necessário alimentar esses instares em hospedeiros de laboratório e aguardar que sofram ecdise a fim de obter o estágio adulto para só então realizar a identificação (LABRUNA et al., 2007). Szabó et al. (2006) utilizaram em seu estudo tal procedimento para identificar as espécies que parasitaram humanos no Parque Estadual de Intervales – SP.

Ressalte-se que, tal metodologia muitas vezes torna-se de difícil aplicação devido ao tempo prolongado do ciclo de vida de alguns carrapatos e a dificuldade de sua manutenção em condições de laboratório, como é o caso do *A. brasiliense* (SANCHES et al., 2008).

Ruppert et al. (2005) ressaltaram a importância de estudos morfológicos de carrapatos e afirmaram que o número, a forma e a localização de cerdas do órgão de Haller seriam constantes para um dado estágio de desenvolvimento de uma espécie de carrapato. No entanto, poderiam variar de um estágio para outro, assim como dentre espécies, o que, para eles, seria uma característica ideal para a sua identificação e classificação.

De acordo com trabalho recente de Guglielmone et al. (2006), existem diversos registros de larvas e ninfas não identificadas encontradas em humanos de regiões neotropicais. Todavia, a inexistência de chaves taxonômicas adequadas para formas imaturas de carrapatos torna difícil sua identificação.

1.2. Morfologia do sistema reprodutor feminino

Os carrapatos são animais dióicos, ou seja, cada um dos sexos possui suas respectivas gônadas (ovário e testículo), abertura genital e glândulas anexas (NUÑES et al., 1982).

O sistema reprodutor feminino consiste fundamentalmente de um grande ovário em forma de U localizado na região posterior do corpo, um par de ovidutos, útero, tubo conector muscular, vagina e abertura genital (SONENSHINE, 1991).

O ovário é um órgão que apresenta lúmen delimitado por células epiteliais, ovogônias e ovócitos. Esses últimos não apresentam desenvolvimento uniforme, sendo encontrados em diferentes estágios (SONENSHINE, 1991).

Trabalhos recentes realizados no Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, SP têm demonstrado por meio de técnicas histológicas e de microscopia eletrônica, que o ovário de *Boophilus microplus* é do tipo panoístico, único, tubular e localizado no terço posterior do corpo, e que os ovócitos aí presentes se desenvolvem simultaneamente, porém com assincronia (SAITO et al., 2005).

Outra espécie de ixodídeo já estudada é a do *Amblyomma triste*, que também apresentou ovário do tipo panoístico com ovócitos presos à sua parede por meio de um pedicelo e desenvolvendo-se em quatro estágios, sincronicamente (OLIVEIRA et al., 2006).

A vagina nos carrapatos divide-se em duas porções: a cervical, onde desembocam os ovidutos, e a vestibular que se estende do receptáculo seminal até a abertura genital. Na porção cervical, localiza-se um par de glândulas acessórias cuja secreção produzida funciona como um lubrificante,

facilitando desse modo, a passagem dos ovos pelos ductos (NUÑES et al., 1982).

A abertura genital se localiza na linha média do corpo e, por vezes, próxima à base do capítulo. Apresenta-se como uma fenda transversal protegida anteriormente por uma prega quitinizada e posteriormente pela elevação da margem tegumentar (RUPPERT et al., 2005).

O processo de cópula, que na maioria dos ixodídeos ocorre durante o repasto sangüíneo no hospedeiro é caracterizado pelo encontro do parceiro sexual, sendo facilitado pela liberação de feromônios com conseqüente união de macho e de fêmea que justapõem suas respectivas superfícies ventrais (SONENSHINE et al., 1991).

Os machos não dispõem de um órgão copulador, utilizando tanto o hipostômio quanto as quelíceras para dilatar o orifício genital da fêmea e forçar a entrada do conteúdo do espermatóforo. Somente no interior do aparelho genital feminino é que os espermatozóides ganharão mobilidade e abandonarão o espermatóforo, fertilizando os óvulos (REY, 2002).

Depois de efetivada a fecundação, o ovário aumenta consideravelmente de tamanho, exibindo ovos em todos os estágios de desenvolvimento (REY, 2002) e logo a seguir, as fêmeas desprender-se-ão do hospedeiro e cairão no solo, onde realizarão a ovipostura (RUPPERT et al., 2005).

A reprodução em carrapatos é controlada por diversos fatores. O processo de alimentação age como estímulo para reprodução, já que materiais nutritivos são necessários para o desenvolvimento de embriões. Dessa forma, alimentação e acasalamento são necessários para o sucesso reprodutivo da maioria das espécies de carrapatos (OLIVER et al., 1984).

O número de ovos produzidos pelas fêmeas depende do volume de sangue ingerido bem como do tamanho dos próprios ovos. Em geral, fêmeas que consomem grande quantidade de sangue produzem mais ovos (SONENSHINE, 1991).

Os ixodídeos possuem um elevado potencial reprodutivo, que tem despertado o interesse de estudos sobre a reprodução de numerosas espécies (DIEHL et al., 1982; OLIVER et al., 1984).

No que diz respeito à anatomia interna, os estudos são mais escassos e a bibliografia muito antiga (DOUGLAS, 1943). Recentemente, alguns autores têm se dedicado a realizar o estudo morfológico do sistema reprodutor e das glândulas salivares de várias espécies de carrapatos de importância médico-veterinária (DENARDI et al., 2004; SAITO et al., 2005; NUNES et al., 2005 e OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

1.3. Importância econômico-sanitária dos carrapatos

Ressalte-se que os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios. Diversas espécies são de interesse e importância na saúde pública e animal, porquanto são vetores de patógenos para o homem e para outros animais, o qual ocorre durante o processo de alimentação (WALKER et al., 2000; HOOGSTRAAL, 1981). De fato, ixodídeos são vetores dos patógenos causadores, dentre outras afecções, da febre maculosa, doença de Lyme, erliquiose monocítica e granulocítica no homem, e teileriose, anaplasmose e babesiose em bovinos (SAUER et al., 2000).

A crescente coexistência do homem, animais domésticos e animais silvestres em um mesmo nicho ecológico, têm aumentado a possibilidade de contato com carrapatos da fauna silvestre e com bioagentes que possam albergar (FIGUEIREDO et al., 1999).

Mamíferos silvestres, principalmente capivaras e veados, vivem em contato próximo à bovinos, eqüinos e cães, com quem compartilham os mesmos carrapatos, oferecendo riscos de transmissão de doenças aos animais domésticos e ao homem. Dessa forma, o homem e animais domésticos podem acidentalmente ser parasitados e desenvolverem doenças infecciosas ou, então, carregarem potenciais vetores para o meio urbano (FIGUEIREDO et al., 1999).

No Brasil, a febre maculosa, causada pela *Rickettsia rickettsii*, é a principal zoonose associada a carrapatos, e sua manutenção também está associada a mamíferos silvestres (CAMPOS PEREIRA e LABRUNA, 1998).

Casos fatais de febre maculosa têm sido registrados desde a primeira metade do século XX e sua transmissão ao homem é atribuída principalmente às espécies *Amblyomma cajennense* e *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2004). Essa doença leva ao aparecimento de casos desde assintomáticos a enfermidades severas com presença de febre repentina, cefaléia, prostração, mialgia e confusão mental, com um curso de aproximadamente duas a três semanas, tendo a necrose vascular como uma complicação comum. É uma doença endêmica em São Paulo e Minas Gerais (FIGUEIREDO et al., 1999).

Mais recentemente, no Uruguai, detectou-se em seres humanos a Febre Botonosa do Mediterrâneo, causada pela *Rickettsia conorii*, a qual parece ser transmitida pelo *Amblyomma triste* (CONTI DIAZ, 2001), espécie de carrapato que, no Brasil, está associada ao cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (SZABÓ et al., 2003). Embora esse hospedeiro seja já extinto no Uruguai, carrapatos *A. triste* ainda são encontrados naquele país (LABRUNA et al., 2004).

Além de sua importância na Sanidade Animal e na Saúde Pública, esses ectoparasitos possuem grande relevância econômica. Os carrapatos espoliam seus hospedeiros e induzem soluções de continuidade cutânea durante seu repasto sanguíneo, determinando perdas econômicas consideráveis na produção animal (RECHAV, 1992).

De fato, somando-se os gastos mundiais com programas de controle do carrapato, especialmente os químicos, os prejuízos são bastante elevados, estimando-se uma perda global anual em cerca de US\$ 8 bilhões (RECHAV, 1992).

No Brasil, segundo Veríssimo (1993), o carrapato *Boophilus microplus* ocasiona as maiores perdas econômicas, e os prejuízos são decorrentes da morte de animais, doenças transmitidas, diminuição na produção de proteína animal, custos com carrapaticidas e, na indústria do couro, por perda na qualidade de matéria-prima. Grisi et al. (2002) estimaram o prejuízo causado pelo *Boophilus microplus* no Brasil em aproximadamente US\$ 2 bilhões anuais.

Levando-se em conta a situação apontada, tanto do ponto de vista econômico como do de saúde pública e animal, têm-se tentado várias formas

alternativas de controle ao método químico, como o biológico utilizando fungos e o imunológico pela indução de resistência ao carrapato por meio de vacinas (WIKEL, 1996).

Estudos biológicos mais avançados sobre a identificação, isolamento e síntese de proteínas protetoras de tecidos e órgãos de carrapato, principalmente do aparelho reprodutor e seu emprego em vacinas, tem aberto uma perspectiva interessante e promissora para o seu controle imunológico (TELLAM et al., 1992).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Descrever a morfologia externa de larvas e de ninfas do carrapato *Amblyomma brasiliense*;
- Estudar a morfologia interna do sistema reprodutor feminino e dinâmica da ovogênese em *A. brasiliense*.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o estudo morfométrico de larvas e ninfas do carrapato *A. brasiliense*;
- Realizar estudo ultramorfológico externo de larvas e ninfas de *A. brasiliense* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

- Realizar estudo ultramorfológico e histológico do ovário de fêmeas ingurgitadas de *A. brasiliense* por meio da aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de rotina histológica em historesina, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Carrapatos

Foram utilizadas 30 larvas, 30 ninfas e cinco fêmeas de *A. brasiliense* obtidos a partir da colônia de carrapatos mantida no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, iniciada a partir de exemplares adultos coletados em trilhas de animais no Parque Estadual de Intervales, São Paulo. Os carrapatos foram identificados como *A. brasiliense*, sob lupa estereoscópica, segundo critérios morfológicos e chave dicotômica proposta por Jones et al., (1972) e modificada por Barros-Battesti et al. (2006).

Para a manutenção da colônia, os carrapatos foram alimentados em hospedeiros virgens de contato (naive) com carrapato, utilizando-se preferencialmente coelhos fornecidos pelo Biotério Central da UNESP – Botucatu, SP. Em caso de dificuldades na manutenção da colônia, adultos de *A. brasiliense* foram alimentados em suínos fornecidos pelo setor de Suinocultura da, FCAV-UNESP, câmpus de Jaboticabal, SP já que nesses

hospedeiros a espécie em questão possui melhor desempenho alimentar e reprodutivo.

Os hospedeiros foram alimentados com ração apropriada e água *ad libitum* e mantidos em locais isentos de carrapatos.

Para o repasto sangüíneo, os carrapatos ficaram restritos aos hospedeiros por câmaras de plástico transparente coladas com material atóxico (Britannia Adhesives® P4104 Latex, Inglaterra) ao seu dorso depilado, de acordo com técnica descrita por Bechara et al. (1995). Para o acompanhamento da metamorfose dos instares ingurgitados, bem como a sua manutenção, os ácaros foram acondicionados em estufa para B.O.D. (modelo CD 347, FANEM) à temperatura de 20°C, umidade de 90% e fotoperíodo de 12 horas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico conforme parecer n° 012/2009 (**Anexo A**).

3.2. Morfometria

Utilizou-se 20 larvas e 20 ninfas selecionadas de diferentes lotes da colônia para serem mensuradas e fotografadas. As larvas foram medidas utilizando-se microscópio de luz (modelo MC80DX) com câmera de captura acoplada e com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0 ML. Para tal, larvas com aproximadamente trinta dias foram fixadas em álcool 70% e montadas em lâminas de vidro com bálsamo do Canadá. As ninfas também foram fixadas em álcool 70%, porém medidos diretamente em placas de Petri com a utilização de um estereomicroscópio (modelo Leica MZ12). O período de trinta dias foi respeitado para que ocorresse a consolidação completa do exoesqueleto dos exemplares.

As estruturas mensuradas foram: comprimento do gnatossoma (do ápice do palpo até a margem da base do capítulo), largura da base do capítulo, comprimento do hipostômio (do ápice até as cerdas pós-hipostomais), largura do hipostômio, comprimento do palpo (do ápice do segmento tibiotarsal até a margem posterior do trocanter), comprimento e largura dos segmentos palpais,

comprimento do idiossoma (do ápice da escápula até a margem posterior do idiossoma), largura máxima do idiossoma, comprimento do escudo (na linha média), largura máxima do escudo, comprimento e largura do tarso I para larvas e comprimento dos tarsos I e IV para ninfas e adultos. As medidas foram obtidas em milímetros e calculou-se a média e o desvio padrão para cada medida, inclusive, os valores mínimo e máximo para cada medida, fornecidos entre parênteses.

3.3. Ultramorfolgia Externa

Cinco larvas e cinco ninfas do carrapato *A. brasiliense* foram fixadas por 24 horas em solução fixadora de Karnovsky e então tratados em banhos de 30 minutos cada, em série crescente de álcool 70%, 80%, 90% e 100%, sendo três vezes na última concentração. Em seguida, o material foi levado ao ponto crítico para completar o processo de desidratação e fixado em suporte de metal com fita adesiva dupla face para o bombardeamento com ouro e carbono.

O material preparado foi então analisado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura (modelo PHILIPS 505) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia no Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, SP, e também no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL JSM 5410). À partir das micrografias obtidas foram realizadas as descrições.

3.4. Ultramorfolgia Interna

Foram utilizados, para o estudo da ultramorfolgia interna, ovários de duas fêmeas adultas e ingurgitadas de *Amblyomma brasiliense*. Para a dissecação e retirada dos ovários, os indivíduos foram colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L).

Sob estereomicroscópio, os ovários foram retirados com auxílio de pinças e micro-tesouras e colocados em solução fixadora de Karnovsky onde permaneceram por 2 horas. A seguir, foram desidratados em banhos de 30 minutos cada, em série crescente de álcool 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, sendo duas vezes na última concentração e levados ao ponto crítico para completar a desidratação.

Finalmente, os ovários foram fixados em suporte de metal com fita adesiva dupla face, bombardeados com ouro e carbono e analisados e fotografado em Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo JEOL JSM 5410) para posterior descrição.

3.5. Histologia dos Ovários

Para a realização da histologia, três fêmeas de *A. brasiliense* depois de sofrerem choque térmico em geladeira foram colocadas em placas de Petri contendo solução fisiológica tamponada com fosfatos-PBS (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L).

Sob estereomicroscópio, os ovários foram retirados com auxílio de pinças e micro-tesouras e, colocados em solução fixadora de paraformaldeído 4% durante 24 horas.

A seguir, foram desidratados em banhos de 30 minutos cada, em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90%, 95%. Logo após, o material foi embebido em historesina Leica e incluído no mesmo material em moldes plásticos. Os blocos foram colados em suportes para serem seccionados em micrótomo de onde foram obtidos cortes com a espessura de 6 µm, os quais foram posteriormente recolhidos em lâminas de vidro previamente limpas.

Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) conforme rotina histológica, montadas com bálsamo do Canadá em lamínula, para posterior observação e documentação fotográfica em fotomicroscópio MOTIC BA 300 acoplado em microcomputador INTEL.

4. RESULTADOS

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

O primeiro artigo traz a descrição da morfologia externa de larvas e de ninfas do carrapato *Amblyomma brasiliense*, e o segundo, aspectos morfológicos dos ovários de fêmeas de *Amblyomma brasiliense* ingurgitadas.

Desta forma, a dissertação está composta por dois capítulos, onde são apresentados os seguintes artigos:

Capítulo 1:

Título do artigo: Morphological description of *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs.

Autores: Gustavo Seron Sanches, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

Periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Situação: Submetido e aceito (**Anexo B**).

Capítulo 2:

Título do artigo: Ovary and oocytes vitellogenesis description of the tick *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae).

Autores: Gustavo Seron Sanches, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

Periódico: Micron.

Situação: Submetido.

Capítulo 1:

Título do artigo: Morphological description of *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs.

Autores: Gustavo Seron Sanches, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

Periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Situação: Submetido e aceito (**Anexo B**).

Resumo: Os estágios imaturos dos carrapatos Neotropicais são pouco conhecidos e, em muitos casos, não estão descritos. Este trabalho apresenta uma descrição morfológica de larvas (F₁) e redescrição de ninfas (F₁) do carrapato *Amblyomma brasiliense*, relatado como um dos ixodídeos mais agressivos ao homem no Brasil. Para este fim, carrapatos imaturos de uma colônia iniciada com espécimes adultos do Parque Estadual de Intervales, São Paulo, Brasil foram analisados sob microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e lupa estereoscópica. Observou-se que larvas têm a base do capítulo retangular, palpos curtos e idiossoma arredondado, coxa I com dois espinhos, sendo o externo mais longo que o interno e coxas II e III com um espinho. Ninfas têm a base do capítulo retangular com córnua pontiaguda, idiossoma oval, coxa I com dois espinhos evidentes, sendo o externo mais longo que o interno, coxas II e III com um espinho curto em cada uma e coxa IV com um espinho muito pequeno, presença de tubérculos quitinosos na superfície interna da borda posterior do idiossoma. Estas características, associadas à quetotaxia e porotaxia, poderão tornar possível a identificação dos estágios imaturos de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

Abstract: The immature stages of Neotropical ticks are poorly known and in many cases have not been described. This work presents a morphological description of *Amblyomma brasiliense* larvae (F₁) and a redescription of nymphs (F₁). *A. brasiliense* is reported as one of the most aggressive ticks to humans in Brazil. Immature ticks obtained from a laboratory colony initiated from adult specimens collected in the Parque Estadual Intervales (24°18'S, 48°24'W), São Paulo, Brazil, were analyzed under scanning electron microscope, and also under light and stereoscopic microscopes. *A. brasiliense* larvae present basis capituli rectangular; short palpi; rounded idiosoma; coxa I with two spurs, the external one being longer than the internal one; and coxae II and III each with one short spur. Nymphs present basis capituli rectangular with a sharp pointed cornua; oval idiosoma with scutum reaching coxa III; coxae I with two evident spurs, the external one being longer than the internal one;

coxae II-III each with one short spur; and coxae IV with a very short spur and chitinous tubercles on internal surface of posterior border of idiosoma.

Key words: *Amblyomma brasiliense*, morphology, description, larva, nymph

1. Introduction

The tick genus *Amblyomma* Koch 1844 is estimated to include 127 species, 57 of which are found in the Neotropical region, with 33 reported in Brazil (Barros-Battesti et al. 2006). However there are few morphological studies about immature stages of this genus, with larvae and nymphs still undescribed for the majority of the species. Unfortunately, most of the existing descriptions were made only under light microscope, and many structures would be better observed with scanning electron microscopy (Barros-Battesti et al. 2005).

The tick *Amblyomma brasiliense* Aragão (1908) is endemic to South America with reports in Argentina, Paraguay and Brazil (Guglielmone et al. 2003), (Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Pará and Espírito Santo States) (Aragão 1936; Szabó et al. 2006; Ogrzewalska et al. 2007). Previous studies reported that larvae and nymphs of *A. brasiliense* are among the most aggressive ticks to humans in Brazil (Aragão 1936), with local reaction to tick attachment varying from almost imperceptible to intense. Itching especially, but hyperemia and swelling as well, were prominent features of the reaction (Szabó et al. 2006). Nevertheless, morphological descriptions of the larval stage of this tick are unknown and nymphal stage descriptions are restricted to a study by Aragão (1908) using light microscopy.

Therefore, the present study aims to describe immature stages of *A. brasiliense* by means of light and scanning electron microscopy, thus to enable making fast, accurate identifications of immature stages of this tick.

2. Material and Methods

2.1 Origin of ticks

Larvae and nymphs were obtained from a laboratory colony derived from unfed adult *A. brasiliense* ticks collected in the Intervales State Park (24°18'S, 48°24'W), São Paulo state, Brazil, from December 2003 to January 2006 and identified to species using the taxonomic keys proposed by Barros-Battesti et al. (2006). The procedures used to obtain larvae and nymphs have been described elsewhere (Sanches et al. 2008).

2.2 Material preparation

A sample of 30 larvae and 30 nymphs originated from different engorged females were kept starving for 30 days, so that the consolidation of exoskeleton took place; afterwards they were preserved in 70% ethanol. Of these, 20 larvae were prepared according to Famadas et al. (1996) to be measured electronically under a MC80DX light microscope coupled with a capture digital camera, using the software Motic Image Plus 2.0 ML. Twenty nymphs were measured under a Leica MZ12 stereomicroscope using the same method and all measurements are given in millimeters, with the mean followed by standard deviation and range in brackets.

Five specimens of each immature stage were prepared for scanning electron microscopy. The material was dehydrated for 30 minutes in each of the following concentrations of alcohol: 70%, 80%, 90%, and 100% (three times). They were then kept in acetone until undergoing critical point drying. Micrographs were taken in the Electron Microscopy Laboratory of the Biology Department at the Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, São Paulo, and Laboratory of Electron Microscopy, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, using a PHILLIPS 505 scanning electron microscope and a JEOL JSM 5410.

The terminology followed Clifford and Anastos (1960) and Hess and Vlimant (1983) for larval idiosomal chaetotaxy, Barbieri et al. (2007) for porotaxy and Famadas et al. (1997) for palpal and Haller's organ terminology

The larvae and nymphs used for the description and the slide-mounted specimens were deposited at the Department of Biology, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, São Paulo for follow-up studies focusing on cuticular structures.

3. Results

3.1 Larva (Figures 1-6)

Gnathosoma: total length from palpal apices to posterior margin of basis capituli 0.221 ± 0.007 (0.202 – 0.231). Dorsal basis capituli (Figure 1) width 0.182 ± 0.005 (0.175 – 0.192), rectangular shape with a lyrifissure pair on median line, postero-lateral angles broad, cornua absent. Ventral basis (Figure 2) with posterior margin slightly convex, lateral angles rounded, auriculae absent. The hypostome length from apices to post hypostomal seta (Ph1) 0.116 ± 0.008 (0.100 – 0.129), width 0.046 ± 0.004 (0.040 – 0.054), spatulate and compact, with a dental formula of 2/2. Short palpi with segments well defined, length from apices of tibiotarsal segment to posterior margin of trochanter 0.139 ± 0.007 (0.126 – 0.148), width 0.049 ± 0.003 (0.043 – 0.054); palpal trochanter (article I) length 0.012 ± 0.002 (0.011 – 0.015), width 0.036 ± 0.002 (0.032 – 0.042); palpal femur (article II) length 0.055 ± 0.004 (0.050 – 0.061), width 0.047 ± 0.004 (0.040 – 0.053) and palpal genu (article III) length 0.047 ± 0.003 (0.040 – 0.054), width 0.040 ± 0.001 (0.038 – 0.042). Palpal setae (Figures 1,2): 12 setae on tibiotarsus; 6 genual setae - 1 antiaxial (Ga1), 3 dorsal (Gd1, Gd2, Gd3), 1 paraxial (Gp1), 1 ventral (Gv1); 6 femoral setae - 1 paraxial (Fp1), 1 dorsal (Fd1, Fd2), 2 antiaxial (Fa1, Fa2), 2 ventral (Fv1, Fv2). Palpal femur with a lyrifissure near the second femoral antiaxial seta (Fa1).

Idiosoma: dorsal surface (Figure 3) rounded, with 11 festoons and a pair of large wax gland near lateral margin of idiosoma, anterior to the festoons. Length from scapular apices to posterior margin of idiosoma 0.598 ± 0.012 (0.584 –

0.620), greatest width 0.598 ± 0.015 (0.575 – 0.628). Scutum outline subtriangular, length along median line 0.273 ± 0.007 (0.260 – 0.289), width 0.448 ± 0.010 (0.435 – 0.480), irregular integument, few punctuations, superficial cervical grooves and shallow and flat eyes on lateral scutum surface. Dorsal setae: 3 scutal setae pairs (Sc1-Sc3), 2 central dorsal setae pairs (Cd1-Cd2), and 8 marginal dorsal setae pairs (Md1-Md8). Ventral surface (Figure 4) with a large wax gland under each coxa and on the 5th festoon of each side, 3 sternal setae pairs (St1-St3), 2 preanal setae pairs (Pa1-Pa2), 1 anal setae pair (A), 4 premarginal setae pairs (Pm1-Pm4), 5 marginal setae pairs (Mv1-Mv5).

Legs (Figure 5): Coxa I with two spurs, the external 2.0 times longer than internal and 3 setae, 1 anterior (Cla), 1 posterior (Clp), and 1 paraxial (Clpa). Coxae II and III each with 1 short spur and 2 setae, 1 anterior (CIIa, CIIIa) and 1 posterior (CIIp, CIIIp). Tarsus I (Figure 6) length 0.232 ± 0.009 (0.222 – 0.252), width 0.080 ± 0.002 (0.076 – 0.083). Setae: Dorsal - 2 in dorsal I group (dI), 7 dorsal II (dII), 2 dorsal III (dIII), 2 dorsal IV (dIV), 0 dorsal V, 2 dorsal VI (dVI). Ventral - 2 in group 1 (vI), 2 in group 2 (vII), 2 in group IV (vIV); lateral - 1 lateral paraxial in group I (LpI) and 1 lateral antiaxial (Lal), 1 lateral paraxial in group II (LpII) and 1 lateral antiaxial in the same group (LalI).

3.2 Nymph (Figures 7-18)

Gnathosoma: total length from palpal apices to posterior margin of basis capituli 0.384 ± 0.028 (0.34 – 0.42). Dorsal basis capituli (Figure 7) width 0.328 ± 0.011 (0.31 – 0.35), rectangular shape, with a sharp pointed cornua and long emargination. Ventral basis (Figure 8) with posterior margin slightly convex, auriculae short and rounded. Short palpi with segments well defined, length from apices of tibiotarsal segment to posterior margin of trochanter 0.250 ± 0.031 (0.2 – 0.3), width 0.093 ± 0.005 (0.09 – 0.1), palpal trochanter (article I) length 0.036 ± 0.002 (0.032 – 0.042), width 0.054 ± 0.003 (0.052 – 0.058); palpal femur (article II) length 0.123 ± 0.004 (0.119 – 0.125), width 0.098 ± 0.009 (0.09 – 0.111) and palpal genu (article III) length 0.118 ± 0.006 (0.105 – 0.122), width 0.082 ± 0.007 (0.068 – 0.085). Palpal setae (Figures 7, 10): 12 setae on tibiotarsus, 5 dorsal genual setae - 1 antiaxial (Ga1), 2 dorsal (Gd1,

Gd2), 2 paraxial (Gp1, Gp2); 3 ventral genual setae - 1 ventral (Gv1), 1 genual ventral paraxial (Gp1), 1 genual ventral antiaxial (Ga1); 3 femoral dorsal setae - 1 paraxial (Fp1), 1 dorsal (Fd1), 1 antiaxial (Fa1); 4 femoral ventral setae - 2 ventral (Fv1, Fv2), 2 ventral paraxial (Fp1, Fp2). The hypostome (Figure 9) length from apices to post hypostomal seta (Ph1) 0.220 ± 0.023 (0.190 – 0.250) width 0.109 ± 0.009 (0.090 – 0.120), spatulate and compact, with a dental formula of 2/2; both paraxial and antiaxial files with 9 teeth each.

Idiosoma: dorsal surface (Figure 11) oval, with 11 festoons and few small setae dispersed; many large and superficial punctuations with regular distribution. Length from scapular apices to posterior margin of idiosoma 1.52 ± 0.072 (1.38 – 1.66), greatest width 1.27 ± 0.055 (1.22 – 1.38). Scutum dark chestnut brown color, outline subtriangular, length along median line 0.273 ± 0.007 (0.260 – 0.289), width 0.448 ± 0.010 (0.435 – 0.480), irregular integument, punctuations large and superficial on lateral region of scutum and fine punctuations on scutal central short region and superficial cervical grooves, opaque and flat eyes on lateral scutum surface. Ventral surface (Figure 12) with few small setae dispersed, festoons with small chitinous tubercle on internal surface of posterior border, anal aperture illustrated (Figure 15), anal groove rounded, posterior to anus, 5 anal setae, spiracular plate (Figure 16) oval with dorsal prolongation, eccentric macula.

Legs: moderately long, coxa I with two spurs, the external longer than the internal and 4 setae, 2 anterior (Cla1, Cla2), 1 posterior (Clp) and 1 paraxial (Clpa). Coxae II and III each with 1 short spur and 3 setae, 1 anterior (CIIa, CIIIa), 1 posterior (CIIp, CIIIp) and 1 paraxial (CIIpa, CIIIpa). Coxa IV with a very short spur and 3 setae, 1 anterior (CIVa), 1 posterior (CIVp), and 1 paraxial (CIVpa) (Figures 13-14). Tarsus I (Figure 17) length 0.408 ± 0.024 (0.370 – 0.450), width 0.151 ± 0.003 (0.148 – 0.153), with a pair of lyrifissures on lateral posterior region. Haller's organ capsule aperture mainly transversely slit-like. Tarsus IV (Figure 18) length 0.298 ± 0.026 (0.260 – 0.340), width 0.102 ± 0.014 (0.084 – 0.126).

4. Discussion

Many times, immature stages of ticks are collected from naturally infested animals and to be identified into species are reared in laboratory hosts and molting until the adult stage, given that taxonomic keys to larvae and nymphs of Neotropic are inexistent or incomplete. This procedure was used by Szabó et al. (2006) and Labruna et al. (2007). Nevertheless, considering that some *A. brasiliense*-like tick species have larvae and nymphs with a long pre-molting period and a low molting success in laboratory (Sanches et al. 2008), it becomes important to be able to make fast, accurate identifications of immature stages by mean of morphological characters.

Some Brazilian studies (Szabó et al. 2006; Ogrzewalska et al. 2007) show that in this country, *A. brasiliense* has been sympatric mainly with *A. incisum* and *A. naponense* with immature stages until now not described (Barros-Battesti et al. 2006), and *A. ovale* with larvae described by Barbieri et al. (2008a).

Therefore, morphological characters and measurements of the idiosoma, gnathosoma, and tarsus I of *A. brasiliense* larva were compared with other previously described species of Neotropic such as *A. parvum* and *A. pseudoparvum* (Guglielmone et al. 1990), *A. cajennense* (Famadas et al. 1997), *A. longirostre* (Barros-Battesti et al. 2005), *A. triste* (Estrada-Peña et al. 2002), *A. parvitarsum* (Estrada-Peña et al. 2005), *A. nodosum* (Amorim & Serra-Freire 1994), *A. ovale* (Barbieri et al. 2008a), and *A. pacae* (Barbieri et al. 2008b).

The basis capituli of *A. brasiliense* larvae is rectangular like in *A. parvitarsum*, with dimensions similar to that tick species, but differs in the length of the palpi - longer in *A. parvitarsum*. On the other hand, *A. parvum* and *A. pseudoparvum* have a basis capituli that is slightly subtriangular or triangular like in *A. pacae* and *A. ovale*. All species used for comparison show a spatulate hypostome with a dental formula of 2/2 and dimensions very close to those in *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. pacae*, and *A. ovale* but shorter than in *A. triste*, *A. longirostre*, and *A. parvitarsum*.

The idiosoma of *A. brasiliense* larvae is rounded, with dimensions similar to *A. parvum*, as measured by Barbieri et al. (2007), and chaetotaxy highly similar and conserved among larvae of *Amblyomma* spp. for idiosoma (exception for tibiotarsus and setae dII on Tarsus I).

Clifford and Anastos (1960) described the presence of four pairs of large wax glands on the idiosoma: one pair located dorsally on the posterior lateral margin of the body, and the others located behind each coxa. Famadas et al. (1997) recorded for the first time a pair of these large wax glands on the fifth festoon of *A. cajennense* larvae and later on Barbieri et al. (2007, 2008b) recorded these pairs in larvae of *A. parvum* and *A. rotundatum* and *A. pacaе* like in *A. brasiliense* larvae. *A. longirostre* presents these pairs and an additional pair on the fourth festoon like *A. ovale* larvae (Barbieri et al. 2008a).

A. brasiliense larvae have two spurs on coxa I, with the external one being longer than the internal one. Coxae II and III each have one short spur, as in *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. pseudoparvum*, and *A. nodosum*, but in *A. brasiliense*, the external spur is twice as long as the internal one.

According to the formula proposed by Clifford and Anastos (1960) for the genus *Amblyomma* Koch, 1844, the dorsal setae of tarsus I of *A. brasiliense* larvae display the 2:2:2:2:2 arrangement.

Summarizing, the main morphological characteristics of *A. brasiliense* larvae are rectangular basis capituli, short palpi, rounded idiosoma, large wax glands recorded on the fifth festoon, and spurs on coxae and chaetotaxy as discussed.

The current re-description using electron microscope complements the one made by Aragão (1908) of the nymphal stage of *A. brasiliense* using light microscopy.

Morphological characteristics and measurements of the idiosoma, gnathosoma, and tarsus I of *A. brasiliense* nymph were compared with other previously described species such as *A. parvum* and *A. pseudoparvum* (Guglielmone et al. 1990), *A. dubitatum* and *A. triste* (Estrada-Peña et al. 2002), and with characteristics of *A. neumanni*, *A. tigrinum*, and *A. maculatum* as listed in a taxonomic key (Estrada-Peña et al. 2005).

The basis capituli of *A. brasiliense* nymphs is rectangular with sharp pointed cornua and short, rounded auriculae, similar to *A. pseudoparvum*. *Amblyomma neumanii* also presents rectangular basis capituli, but differs in cornua shape (rounded) and in palpi (stronger than in *A. brasiliense*). The hypostome is spatulate, with a dental formula of 2/2 for all *Amblyomma* species used for comparison. These characteristics corroborate Aragão (1908).

Idiosoma of *A. brasiliense* nymphs shows oval dorsal surface, with measurements very close to *A. parvum* but differing in the length of scutum (shorter in *A. brasiliense*). Aragão (1908) reported measurements that are relatively bigger, but it is important to consider that (1) in this study the specimens were collected in different geographic regions and (2) Aragão did not specify the exact site of starting and ending measurements.

Amblyomma brasiliense nymphs have long legs, coxa I with two evident spurs, the external longer than the internal; coxae II-III each with one short spur; and coxae IV with a very short spur, consistent with Aragão (1908). These characteristics are similar to *A. parvum*, and differ from *A. dubitatum* in the length of spur on coxa IV (shorter in *A. brasiliense*). The same distribution of spurs is observed in *A. neumanii* but the spurs in *A. brasiliense* are larger. *Amblyomma triste* with triangular external spur on coxa I, *A. tigrinum* with narrow external spur and small internal spur on coxa I, and *A. maculatum* with narrow external spur, all present different numerical and morphological distribution of spurs in comparison with *A. brasiliense*.

Summarizing, the main morphological characteristics of *A. brasiliense* nymphs are rectangular basis capituli with a sharp pointed cornua, oval idiosoma with scutum reaching coxa III, and coxae I with two evident spurs, the external one being longer than the internal one; coxae II-III each with one short spur; and coxae IV with a very short spur and chitinous tubercles on internal surface of posterior border of idiosoma.

The morphological characteristics presented here must be used with caution because larvae of many *Amblyomma* species from the Neotropical region are still unknown. Additional studies of immature stages of other species

of this genus are required to allow accurate identification of *Amblyomma* larvae and nymphs.

5. Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP (G.S. Sanches' scholarship 2007/52046-3, Grant 2007/59020-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant 308733/2006-1; G.H. Bechara and M.I. Camargo Mathias researcher fellowships); thanks are extended to these entities, as well as to Monika Lamonte, Ronaldo del Vecchio, and Antonio Teruyoshi Yabuki for technical support.

6. References

AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899 descrição morfológica do estágio de larva. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 3, n. 2, 131-142, 1994.

ARAGÃO, H. B. Algumas novas espécies de carrapatos brasileiros. *Brasil-médico*, v. 22, n. 12, p. 111-115, 1908.

Aragão, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 31, n. 4, p. 759-841, 1936.

BARBIERI, F. S.; CHACÓN, S.C.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J.; FAMADAS, K. M. Topographical and numerical study of the idiosomal integumentary structures of the larva of four Neotropical species of *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, v. 68, n.1, p. 57-70, 2007.

BARBIERI, F. S.; BRITO, L. G.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma*

ovale Koch, 1884 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Systematic & Applied Acarology*, v. 13, n.2, p. 109-119, 2008a.

BARBIERI, F. S.; BRITO, L. G.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma pacaе* Aragão, 1911 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Systematic & Applied Acarology*, v. 13, n.3, p. 195-203, 2008b.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; REBELLO, V. M. M.; BARBIERI, F. S.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, n. 2, p. 51-57, 2005.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, 2006. 223 p.

CLIFFORD, C. M.; ANASTOS, G. The use of chaetotaxy in the identification of larval ticks (Acarina: Ixodidae). *The Journal of Parasitology*, v. 46, n. 1, p. 567-578, 1960.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma dubitatum* Neumann: description of nymph and redescription of adults, together with the description of immature stages of *A. triste* Koch. *Acarologia*, v. 42, n. 4, p. 323-333, 2002.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; CAFRONE, M. M.; GUGLIELMONE, A. A. 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.

FAMADAS, K. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; FACCINI, J. L. H. A note on slide-mounting technique of unfed immature stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 139-140, 1996.

FAMADAS, K. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LANFREDI, R. M. Redescription of the larva of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Acarologia* v. 38, n. 2, p. 101-109, 1997.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; KEIRANS, J. E. Redescription of the male and female of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 and description of nymph and larva, and description of all stages of *Amblyomma pseudoparvum* n.sp. (Acari: Ixodida: Ixodidae). *Acarologia*, v. 32, n. 2, p. 143-159, 1990.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A., KEIRANS, J. E.; ROBINS, R. G. *Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region*. Atlanta: International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, 2003. 173 p.

HESS, E.; VLIMANT, M. The tarsal sensory system of *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae: Metastrata). III. Mapping of sensory hairs and evolution of relative importance of sensory modalities during post-embryonic development. *Revue Suisse de Zoologie*, v. 90, n. 4, p. 887-897, 1983.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 43, n. 2, p. 147-160, 2007.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Carrapatos (Acari: Ixodidae) capturados na reserve natural do Vale do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 177-179, 2007.

SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; GARCIA, M. V.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, v. 44, n. 1, p. 43-48, 2008.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V.A.; MAGALHÃES, G.M. CASTRO, M.B.; VOGLIOTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. *Experimental and Applied Acarology*, v. 39, n. 3, p. 339-346, 2006.

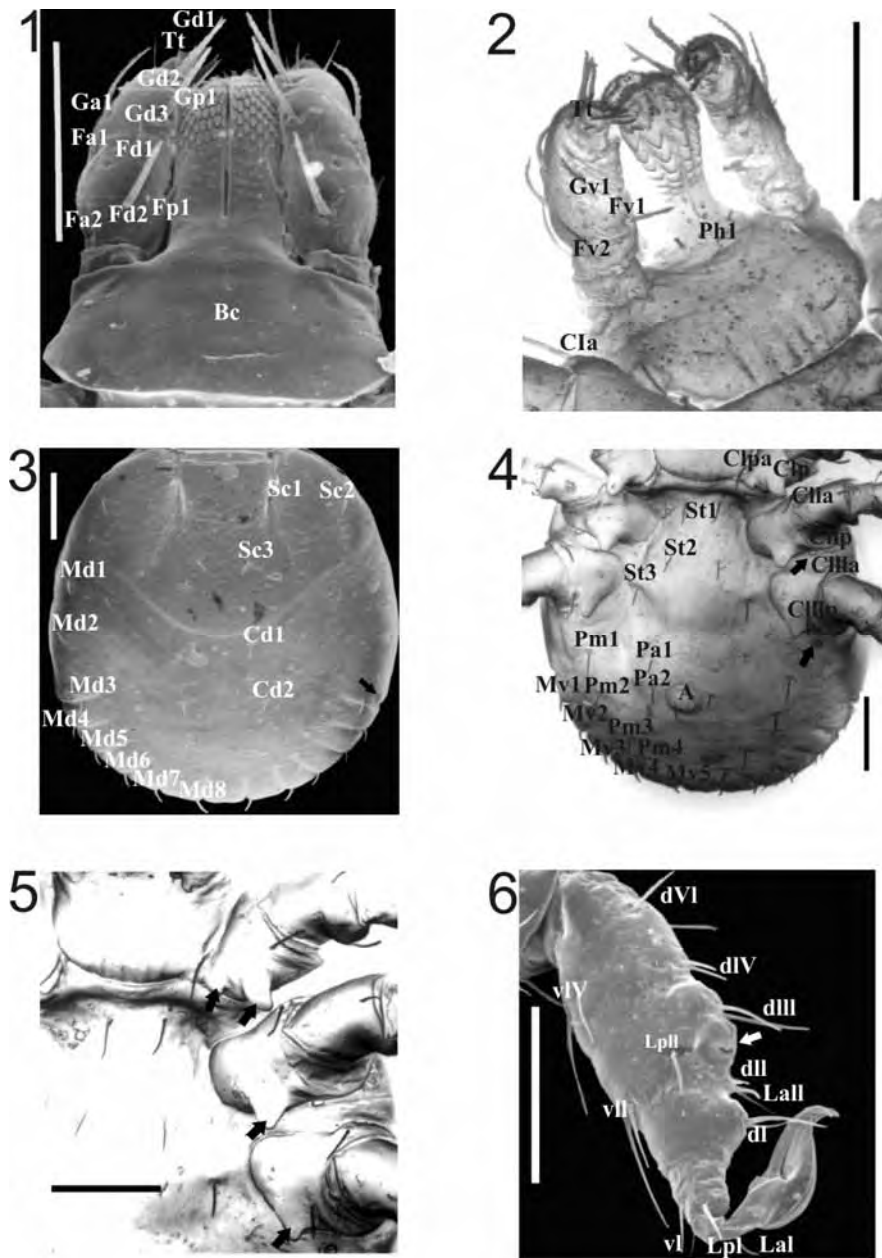
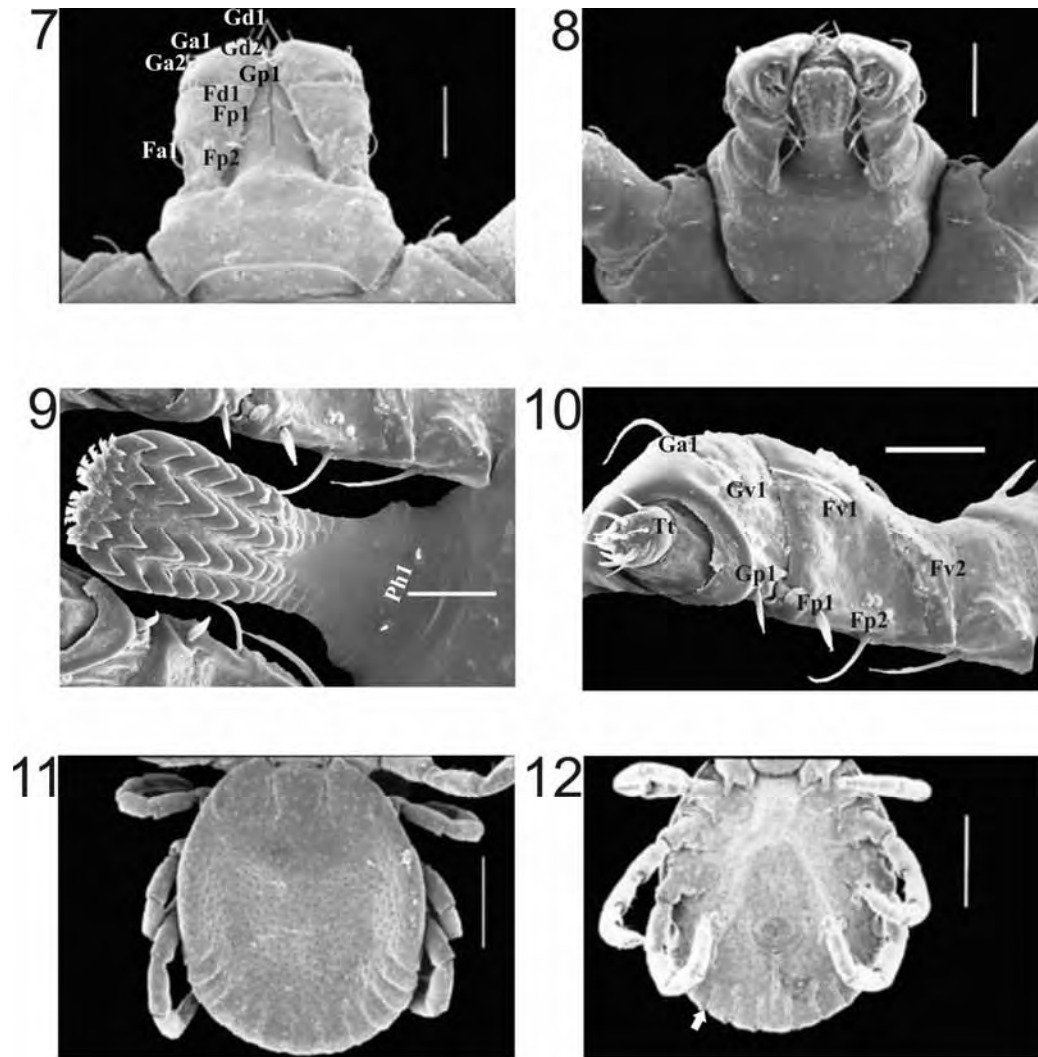
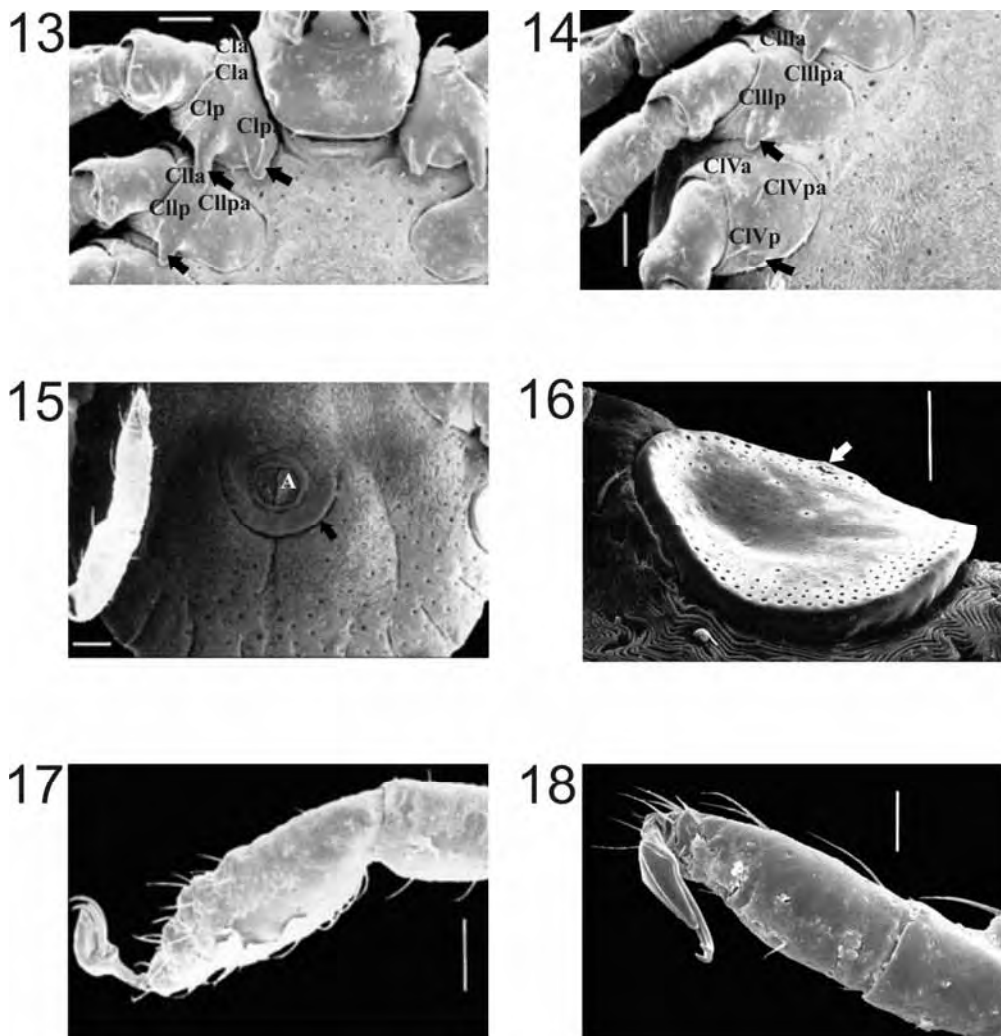


Figure 1-6. *Amblyomma brasiliense* larva. 1. Gnathosoma (dorsal view); 2. Gnathosoma (ventral view); 3. Idiosoma (dorsal view), showing large wax gland (arrowed); 4. Idiosoma (ventral view), showing large wax gland (arrowed); 5. Idiosoma (ventral view), showing coxae I-III spurs (arrowed); 6. Tarsus I, showing Haller's organ capsule (arrowed). Abbreviations: Bc, basis capituli; F, femoral; G, genual; a, antiaxial; p, paraxial; d, dorsal; v, ventral; L, lateral; m, marginal; Tt, tibiotarsus; Ph, post hypostomal; Sc, scutal; C, central; M, marginal; St, sternal; Pa, preanal; Pm, premarginal; A, anal; C1a, C1b, C1c, anterior setae; C1p, C1p, C1p, posterior setae; C1pa, C1pa, C1pa, paraxial setae. Scale bars: 0.1 mm.



Figures 7-12. *Amblyomma brasiliense* nymph. 7. Gnathosoma (dorsal view); showing sharp pointed cornua (arrowed); 8. Gnathosoma (ventral view); 9. Hypostome (ventral view), showing a dental formula 2/2 (arrowed); 10. Palpi (ventral view); 11. Idiosoma (dorsal view); 12. Idiosoma (ventral view), showing small chitinous tubercle on internal surface of festoons (arrowed). Abbreviations: F, femoral; G, genual; a, antiaxial; p, paraxial; d, dorsal; v, ventral; Tt, tibiotarsus; Ph, post hypostomal. Scale bars: Fig. 7-8: 0.1 mm; Fig. 9-10: 0.05mm; Fig. 11-12: 0.5 mm.



Figures 13-18. *Amblyomma brasiliense* nymph. 13. Coxae I-II (ventral view), showing spurs (arrowed); 14. Coxae III-IV (ventral view), showing spurs (arrowed); 15. Anal aperture, showing anal groove (arrowed); 16. Spiracular plate, showing eccentric macula (arrowed); 17. Tarsus I; 18. Tarsus IV. Abbreviations: Cla, CIIa, CIIIa, CIVa, antiaxial setae; Clp, CIIp, CIIIp, CIVp, paraxial setae; Clpa, CIIpa, CIIIpa, CIVpa, paraxial setae; A, anal. Scale bars: Fig. 13-15 and 17: 0.1 mm; Fig. 16 and 18: 0.05 mm.

Capítulo 2:

Título do artigo: Ovary and oocytes vitellogenesis description of the tick *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae).

Autores: Gustavo Seron Sanches, Gervásio Henrique Bechara e Maria Izabel Camargo Mathias.

Periódico: Micron.

Situação: Submetido.

Resumo: Este estudo apresenta a morfologia do ovário, bem como o processo da dinâmica da vitelogênese de carrapatos *Amblyomma brasiliense*. O ovário é do tipo panoítico, não apresentando células nutridoras e foliculares. Este órgão consiste de estrutura tubular única, contínua e composta de um lúmen delimitado por uma parede formada por pequenas células epiteliais com núcleo arredondado. Nesta espécie de carrapato, os ovócitos foram classificados em cinco estágios, variando de I a V e descritos de acordo com a aparência do citoplasma, presença de vesícula germinal, aspecto dos grânulos de vitelo e deposição do córion. Ovócitos de vários tamanhos e em diferentes estágios de desenvolvimento permanecem ligados ao ovário por meio das células do pedicelo, até completarem o estágio V. Posteriormente, tais ovócitos são liberados no lúmen do ovário e deste para o exterior. Pela primeira vez foi relatado em ovócitos de carrapatos o córion esculpado.

Abstract: This study presents the morphology of the ovary, as well as the dynamics of the vitellogenesis process in oocytes of *Amblyomma brasiliense* ticks. The ovary is of the panoistic type; therefore, it lacks nurse and follicular cells. This organ consists of a single tubular structure, continuous, and composed of a lumen delimited by a wall of small epithelial cells with rounded nuclei. In this tick species, the oocytes were classified into five stages ranging from I to V and described according to cytoplasm appearance, presence of the germ vesicle, yolk granules aspects, and chorion deposition. Oocytes of various sizes and at different developmental stages remain attached to the ovary through a cellular pedicel until completing stage V. Afterwards, they are released into the ovary lumen and from there to the exterior. For the first time was related in ticks oocytes chorium sculptured.

Key words: *Amblyomma brasiliense*; tick; ovary; histology; vitellogenesis;

1. Introduction

Ticks are ectoparasites of great medical and veterinary importance, acting as vector of pathogens responsible for diseases that affect animal and human health worldwide and cause significant economic losses (Jon Jongejan and Uilenberg, 2004).

The tick species *Amblyomma brasiliense* Aragão 1908 is endemic to South America, with reports in Brazil, Argentina, Paraguay (Guglielmone et al., 2003) and under natural conditions, peccaries (*Tayassu* spp) are considered the primary hosts for *A. brasiliense* ticks (Aragão, 1936; Guimarães et al., 2001). Previous studies reported that larvae and nymphs of *A. brasiliense* were among the most aggressive ticks to humans in Brazil (Aragão, 1936).

However, there have been few works focusing morphological aspects of this tick specie, specially internal one and reproductive system.

Thus, the present study was designed to provide data on the morphology and histology of the female reproductive system, as well as to attempt to establish the dynamic of vitellogenesis in *A. brasiliense*.

2. Material and Methods

2.1 Ticks

About five engorged females of *A. brasiliense* were obtained from the tick colony maintained under controlled conditions (20°C, 90% RH and 12 H photoperiod) at the Department of Animal Pathology, Veterinary College, UNESP – Jaboticabal, SP, Brazil. These specimens were maintained in the refrigerator (4°C) for thermal shock anesthesia and dissected in PBS solution (NaCl 7.5g/L, Na₂HPO₄ 2.38g/L and KH₂ PO₄ 2.72 g/L) for ovaries removal.

2.2 Morphology

The removed ovaries were sectioned by means of histological routine and the oocytes schematically drawn using camera lucida coupled to a Zeiss stereomicroscope.

2.3 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The ovaries removed were fixed in Karnovsky for 24 h and dehydrated in a graded 70 -100% ethanol and acetone series. The material was processed by crytpal point drying, sputtered with gold, and examined and photographed under a SEM JEOL JSM 5410.

2.4 Histology

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

3. Results

3.1 Ultramorphology

The scanning electron microscopy revealed that the ovary of ticks *A. brasiliense* consists of a single tubular organ, horseshoe shaped, with a large number of oocytes attached by pedicel cells of various sizes and developmental stages, since immature ones until oocytes in reabsorption process (Fig. 1). This morphological variation of the oocytes is related to the fact that their development are processed simultaneously but asynchronously throught the ovary. The external surface of mature oocytes (Fig. 1C) showed presence of micropores that probably provide the oxygenation of internal structures recovered all surface.

3.2 Histology

Histologically, the ovary of *A. brasiliense* ticks was classified as panoistic, consisting of only epithelial and germinative cells, without either specialized nurse or follicular cells. The epithelial cells forming the wall of the ovary and delimiting a narrow lumen are small and pavimentous or cubic, with rounded nuclei (Fig. 5A).

In some regions of the epithelial wall of the ovary the presence of a multicellular structure formed by cubic or cilindric cells denominated pedicel (Figs. 3F, 5D, E, F) can be observed fixing the oocytes found at different stages of development to the wall of the ovary. Once mature, the oocytes are liberated inside the lumen and from there to the exterior through oviduct, wich has a thick and cuticular external revetment (Figs. 5B, C).

3.3 Classification of the oocytes

Because of the variation in morphological and histological appearance of the oocytes, they were classified in five stages (Fig. 2), following the criteria previously established for the oocytes of *A. cajennense* by Denardi et al. (2004). The classification suggested for the oocytes found in the ovary of *A. brasiliense* is as follows.

3.3.1 Oocytes I or primary oocytes

Oocytes with small size and often varying their shape between rounded and elliptical shape characterized by a thin plasmic membrane delimitates a homogeneous cytoplasmic content a germ vesicle with an evident nucleolus (Fig. 2, 3A, C, 4A).

3.3.2 Oocytes II

Oocytes were twice larger when compared with the previous stage (oocytes I), frequently had elliptical shape, with fine granulation dispersed throughout the cytoplasm, showing the beginning of production (endogenous) or incorporation (exogenous) of yolk. The germ vesicle still present an evident nucleolus (Figs. 2, 3A-D, 4A).

3.3.3 Oocytes III

The volume in this stage is increased in relation to previous stage (oocytes II) and the germ vesicle is not easily remarked. A fine yolk granulation is observed dispersed throughout the cytoplasm. Large and intense granules are observed occupying the central region of the oocyte. The plasmic

membrane appears thick, showing characteristics of a chorion deposition (Figs. 2, 3C, E, F, 4B).

3.3.4 Oocytes IV

The volume in this stage is larger when compared to the previous stages and the germ vesicle was no longer observed due to the yolk granulation. Large yolk granules appear at the central region of the cytoplasm, arising from smaller granules at the peripheral region. The thick corium appears completely deposited and sculptured (Figs. 2, 3E, 4D).

3.3.5 Oocytes V or mature oocytes

Oocyte at the maximum developmental stage, showing large and dense yolk granules that fill the whole cytoplasm. The periphery (region just below plasmic membrane) shows a fine yolk granulation, which probably resulted from the final stage of exogenous incorporation of yolk. The chorion showing irregular contour is very thick, except at contact region to pedicel, that appears tenuous and these oocytes lack a pedicel because it was pushed into the ovarian lumen. The germ vesicle is rarely observed (Figs. 2, 3B, F, 4E, F).

4. Discussion

The ultramorphological analysis revealed that the ovary of *Amblyomma brasiliense* consists of a single tubular organ, continuous and horseshoe shaped located at the posterior third of the engorged female body. This data corroborate the results obtained by Sonenshine (1991) in species *Dermacentor andersoni* and *D. variabilis*, by Denardi et al. (2004) in *A. cajennense*, by Saito et al. (2005) in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, by Oliveira et al. (2005) in *Rhipicephalus sanguineus* and by Oliveira et al. (2006) in *A. triste*.

The scanning electron microscopy showed oocytes in undergoing reabsorption process, corroborating Oliveira et al. (2005) in *R. sanguineus* and Saito et al. (2005) in *R. (B.) microplus* which observed by mean of histological

techniques and characterized these oocytes by the abnormal aspect and cellular disorganization, as well as the presence of autophagic vacuoles in the cytoplasm.

The histological techniques allowed classify the ovary of *A. brasiliense* as of panoistic type, in wich all the cells present, except the ones that compose the ovarian wall, are oogonies, i. e., future oocytes. In this type of ovary, nurse and follicular cells are absent. This classification was adopted by Denardi et al. (2004) for *A. cajennense* and later by the other related authors wich studied other ticks species.

Morphologically, as in the other described tick species, the ovary of *A. brasiliense* was not segmented in distinct regions of development as in the ovaries of most arthropods. According Denardi et al. (2004), most oocytes did not reach maturity, since they had been retarded by earlier development of the adjacent and more proximal ones, thus showing oocytes in different stages of development, characterizing a simultaneous but asynchronyc development of these cells, as reported in *A. brasiliense*.

The morphological variation that exists between the oocytes and the amount of yolk allowed the classification of *A. brasiliense* oocytes into stages that varied from I to V, based in that proposal by Denard et al. (2004) in wich the authors have described five different developmental stages later related by Oliveira et al. (2005). On the other hand, Saito et al. (2005) found six stages of development in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and Oliveira et al. (2006) four stages in *A. triste*.

There have been detected the large disposition of yolk granules in the stages IV and V in *A. brasiliense*, as in *A. cajennense* and in *R. sanguineus*. Morphologic evidences confirmed the transport of elements coming from exterior to the interior of these oocytes since stage II, contradicting Balashov (1983) that related the origin endogenous and exogenous of the yolk, with endogenous production occurred before the exogenous.

For the first time was observed in ticks oocytes the corium thick and sculptured, presented like minute setae with the role not know yet.

The histological techniques have shown that oocytes I to stage V were attached to the ovarian epithelium by a cellular structure denominated pedicel, as observed in previous studies with ticks ovaries. According to Said (1992) and Denardi et al. (2004) the pedicel would release the most developed oocytes to the interior of the ovary's lumen, due to a continuous growing pressure against the ovary wall.

Oliveira et al. (2007) validated the role for the pedicel cells in the synthesis and supply of yolk precursors for developing oocytes, like protein, lipids and carbohydrates in species of ticks (*A. triste*, for example).

5. Acknowledgements

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP (G.S. Sanches' scholarship 2007/52046-3, Grant 2007/59020-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Grant 308733/2006-1; G.H. Bechara and M.I. Camargo Mathias researcher fellowships), and to Monika lamonte, Ronaldo del Vecchio, Antonio Teruyoshi Yabuki and Gerson de Mello Souza for technical support.

6. References

Aragão, H.B., 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. Mem. Inst. Osw. Cruz 31, 759-841.

Balashov, Y.S., 1983. An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Entomological Society of America, USA.

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

Jongejan F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. Parasitol. 129, 3-14.

Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, J.E. Robins, R.G., 2003. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region. International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, Atlanta.

Guimarães, J.H, Tucci, C.E., Barros-Battesti, D.M., 2001. Ectoparasitos de importância veterinária. Editoras Plêiade, São Paulo.

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

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

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

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

Said, E.A., 1992. A contribution to the anatomy and histology of the female reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Acarina: Ixodidae). *J Egypt Soc Parasitol.* 22, 385-393.

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

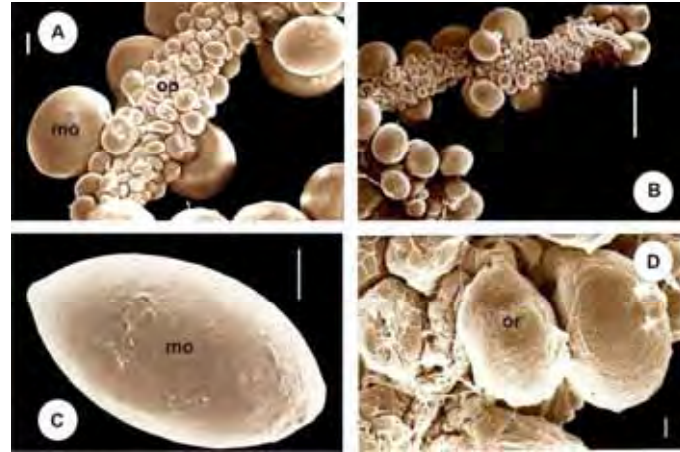


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Amblyomma brasiliense* ovary. (A, B) Oocytes in several developmental stages. (C) Mature oocytes. (D) Oocytes in reabsorption process. mo= mature oocyte; oo= young oocyte; or= oocyte in reabsorption process. Bars: A = 0.5mm; B = 0.1mm; C = 0.01mm; D = 0.1mm.

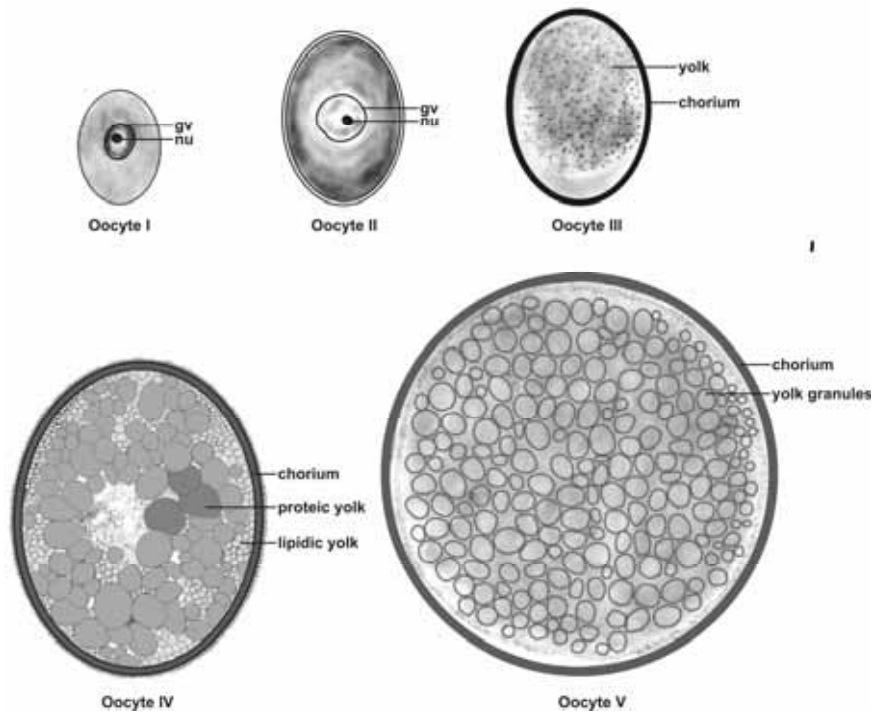


Fig. 2. Diagrammatic summary oocytes development in *A. brasiliense* ovary. (A) Oocyte I. (B) Oocyte II. (C) Oocyte III. (D) Oocyte IV. (E) Oocyte V. gv= germ vesicle; ch= chorium; nu= nucleolus; yg= yolk granules. Bar: 0.01mm.

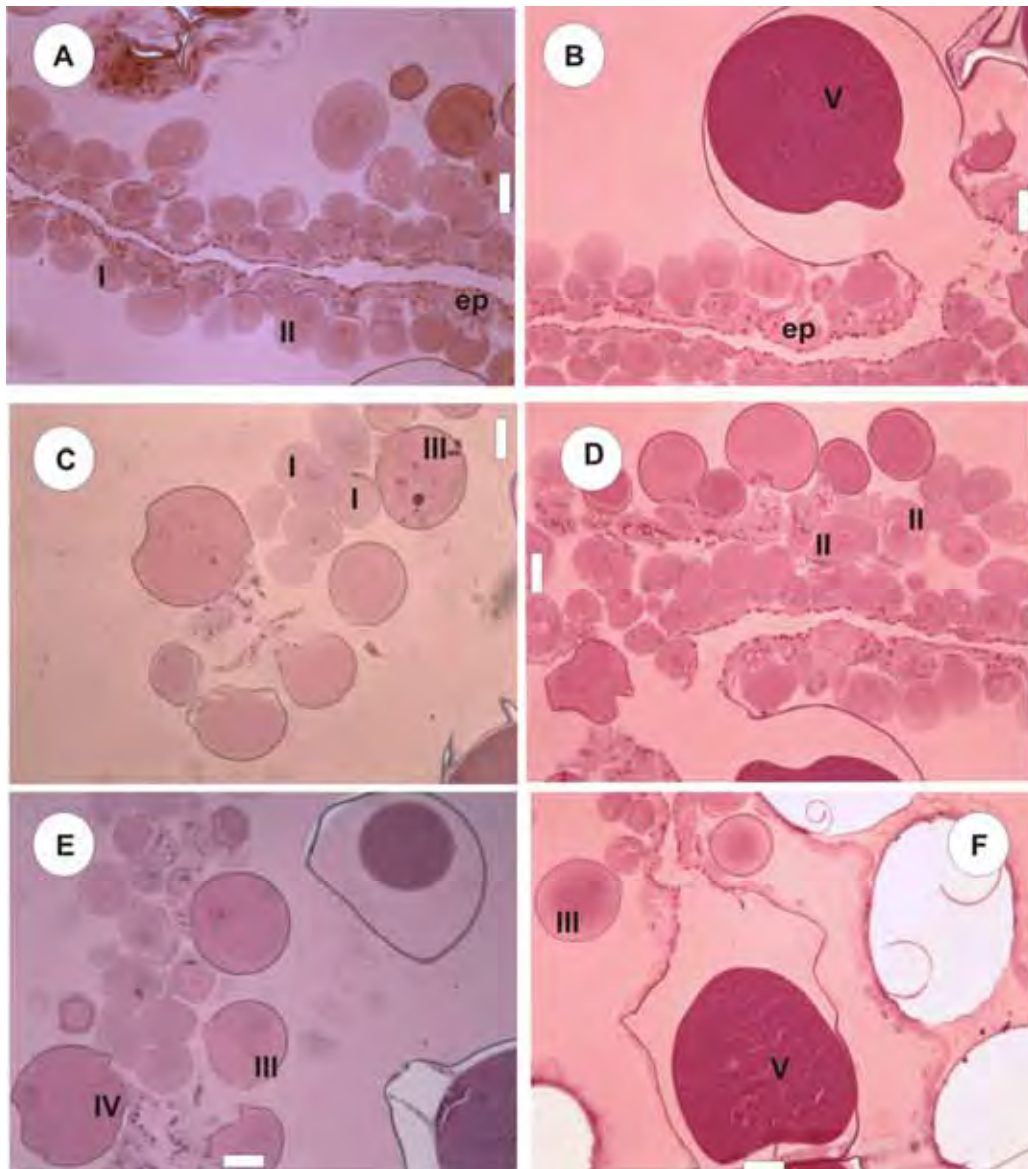


Fig. 3. Histological sections of *Amblyomma brasiliense* ovary showing general view. (A) Oocytes I and II. (B) Oocyte V. (C) Oocytes I and III. (D) Oocytes II. (E) Oocytes III and IV. (F) Oocytes III and V. I= oocyte I; II= oocyte II; III= oocyte III; IV= oocyte IV; V= oocyte IV; ep= ovary epithelium. Bars: 0.1mm.

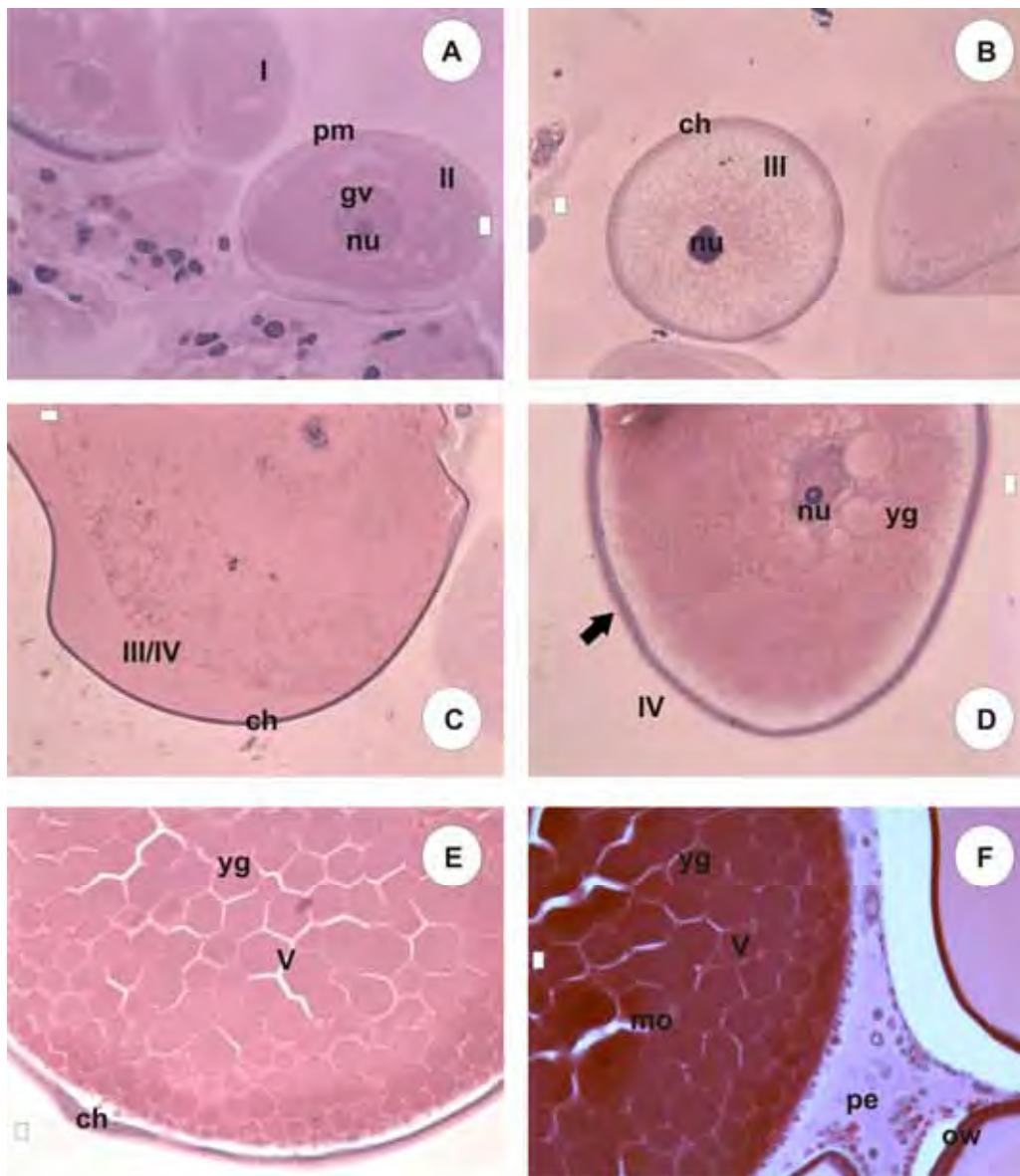


Fig. 4. Histological sections showing details of *Amblyomma brasiliense* oocytes. (A) Oocytes I and II. (B) Oocyte III. (C) Oocyte III/IV. (D) Oocyte IV, showing sculptured chorium arrowed. I= oocyte I; II= oocyte II; III= oocyte III; III/IV= oocyte between stages III and IV; IV= oocyte IV; V= oocyte V; pm= plasmic membrane; gv= germ vesicle; nu= nucleolus; yg= yolk granules; mo= mature oocyte; pe= pedicel; ow= ovary wall. Bars: 0.01mm.

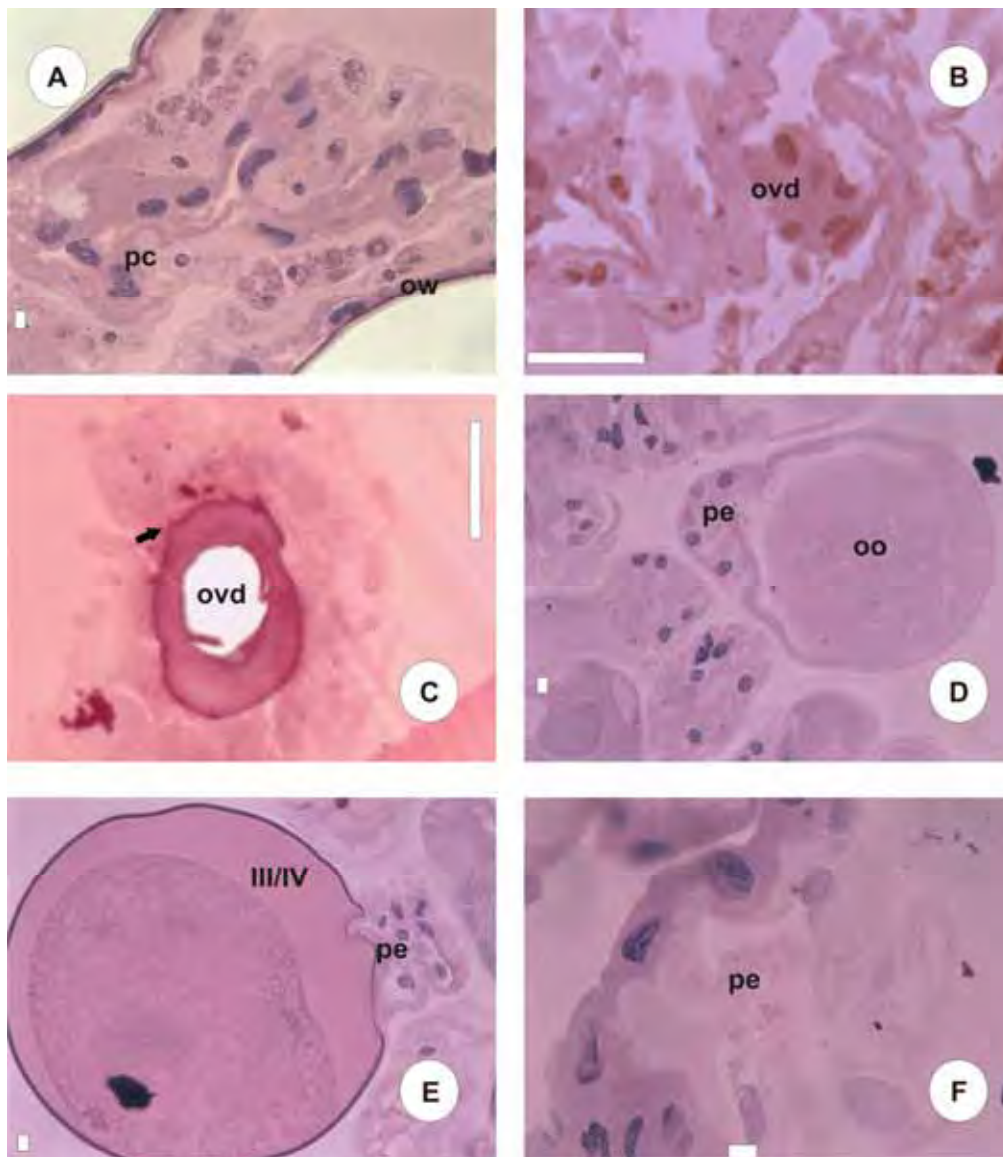


Fig. 5. Histological sections of *Amblyomma brasiliense* ovary structures. (A) Ovary wall. (B) Oviduct. (C) Sclerotized final oviduct arrowed. (D) Pedicel of young oocyte. (E) Pedicel of oocyte in stage III/IV. (F) Detail of pedicel cells. pc= pedicel cells; ow= ovary wall; ovd= oviduct; pe= pedicel; oo= young oocyte; III/IV= oocyte between stages III and IV. Bars: A = 0.01mm; B = 0.1mm; C = 0.1mm; D = 0.01mm; E = 0.01mm.

5. DISCUSSÃO GERAL

As descrições morfológicas de estágios imaturos de carrapatos do gênero *Amblyomma* estão disponíveis para a maioria das espécies africanas e australianas, porém, são muito fragmentadas para as espécies neotropicais. Das espécies descritas do Novo Mundo, a maioria é para o estágio adulto, sendo ainda incompleta para estágios imaturos (CAMICAS et al., 1998).

Clifford e Anastos (1960) atribuem a falta de conhecimento sistemático de larvas de carrapatos a alguns fatores como caracteres pouco consistentes para a inclusão em chaves taxonômicas, descrições e desenhos inadequados, poucas espécies originadas em laboratório à partir de fêmeas identificadas e a impossibilidade de associar larvas coletadas no campo com os adultos correspondentes.

Dessa forma, estágios imaturos coletados no campo e em animais naturalmente infestados são alimentados em hospedeiros de laboratório até atingirem o estágio adulto para que possam ser identificados por meio de chaves taxonômicas até o nível de espécie, procedimento utilizado por Szabó et al. (2006) e Labruna et al. (2007).

Considerando que em algumas espécies de carrapatos como o *Amblyomma brasiliense* as larvas e ninfas apresentam longo período e baixa taxa de ecdise em laboratório (SANCHES et al. 2008), é importante conhecer as características morfológicas dos estágios imaturos, uma vez que podem auxiliar na sua prévia identificação.

A espécie de carrapato *A. brasiliense* teve os estágios de ninfa e adultos descritos pela primeira vez por Aragão (1908) fazendo uso de microscópio de luz, enquanto o estágio de larva permanecia até o presente momento não descrito na literatura.

Alguns estudos realizados no Brasil (SZABÓ et al. 2006; OGRZEWALSKA et al. 2007) mostraram que o *A. brasiliense* tem sido simpátrico com outras espécies como *A. incisum* e *A. naponense*, com estágios imaturos também não descritos (BARROS-BATTESTI ET AL. 2006), e *A. ovale*, com larvas descritas por Barbieri et al. (2008a).

Assim, as características morfológicas e as medidas do idiosoma, gnatosoma e tarso I das larvas de *A. brasiliense* são comparadas com outras espécies do Neotrópico previamente descritas tais como *A. parvum* e *A. pseudoparvum* (GUGLIELMONE et al. 1990), *A. nodosum* (AMORIM E SERRA-FREIRE 1994), *A. cajennense* (FAMADAS et al. 1997), *A. triste* (ESTRADA-PEÑA et al. 2002), *A. longirostre* (BARROS-BATTESTI et al. 2005), *A. parvitarsum* (ESTRADA-PEÑA et al. 2005), *A. ovale* (BARBIERI et al. 2008a) and *A. pacaе* (BARBIERI et al. 2008b).

A base do capítulo das larvas de *A. brasiliense* é retangular assim como em *A. parvitarsum*, com dimensões similares a esta espécie, porém difere desta por apresentar o palpo mais curto. Por outro lado, *A. parvum* e *A. pseudoparvum* apresentam a base do capítulo subtriangular ou triangular, assim como *A. pacaе* e *A. ovale*. Todas as espécies utilizadas para comparação apresentam hipostômio espatulado com formula dental 2/2, assim como o *A. brasiliense*, cujas dimensões desta estrutura são próximas de *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. pacaе* e *A. ovale*, porém tem comprimento menor que em *A. triste*, *A. longirostre* e *A. parvitarsum*.

O idiossoma das larvas de *A. brasiliense* é arredondado, com dimensões similares às encontradas em *A. parvum* por Barbieri et al. (2007), e a quetotaxia mostrou-se altamente similar e conservada entre as larvas de *Amblyomma* spp. para o idiossoma, com exceção ao tibiotarso e à cerda dII (7 em *A. brasiliense*) no tarso I.

Clifford e Anastos (1960) descreveram a presença de quatro pares de grandes glândulas de cera (large wax glands) no idiossoma de larvas de *Amblyomma*, um par localizado dorsalmente na margem posterior lateral do corpo, e os outros localizados atrás de cada coxa.

Famadas et al. (1997) registrou pela primeira vez um par de large wax glands no quinto festão de larvas de *A. cajennense* e, posteriormente, Barbieri et al. (2007, 2008b) relatou esses pares em larvas de *A. parvum*, *A. rotundatum* e *A. pacaе* assim como em larvas de *A. brasiliense*, enquanto *A. longirostre* apresentou esses pares e ainda, um par adicional no quarto festão, assim como as larvas de *A. ovale* (BARBIERI et al. 2008a).

As larvas de *A. brasiliense* possuem dois espinhos na coxa I, sendo o externo mais longo que o interno, e coxas II e III com um espinho curto em cada uma como *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. pseudoparvum* e *A. nodosum*, porém, neste último, o espinho externo é duas vezes mais longo que o interno.

De acordo com a fórmula proposta por Clifford e Anastos (1960) para o gênero *Amblyomma*, as cerdas dorsais do tarso I de larvas de *A. brasiliense* também apresentam o arranjo 2:2:2:2:2.

A presente redescritção das ninfas de *A. brasiliense* complementam aquela realizada por Aragão (1908) utilizando apenas microscopia de luz.

As características morfológicas e as medidas do idiossoma, gnatossoma e tarso I desta espécie são comparadas com outras espécies de ninfas previamente descritas, tais como *A. parvum* e *A. pseudoparvum* (GUGLIELMONE et al. 1990), *A. dubitatum* e *A. triste* (ESTRADA-PEÑA et al. 2002) e com características de *A. neumanni*, *A. tigrinum* e *A. maculatum* listadas em chave taxonômica (ESTRADA-PEÑA et al. 2005).

As ninfas de *A. brasiliense* apresentam a base do capítulo retangular com córnua pontiaguda e aurícula curta e arredondada, semelhante a *A.*

pseudoparvum. *Amblyomma neumanii* também apresenta base do capítulo retangular, porém, diferentemente de *A. brasiliense*, a córnua tem formato arredondado e o palpo é mais largo e curto. Assim como nas larvas de *Amblyomma*, as ninfas usadas para comparação também possuem hipostômio espatulado com fórmula dental 2/2, característica que corrobora à Aragão (1908).

O idiossoma das ninfas da espécie em discussão apresenta superfície dorsal oval, com medidas próximas às encontradas em *A. parvum*, diferindo desta pelo comprimento do escudo (mais curto em *A. brasiliense*).

Aragão (1908) relata medidas aproximadamente maiores para o idiossoma, porém é importante considerar que neste estudo os espécimes foram coletados em região geográfica diferente deste e que não é mencionado o local exato de início e final para a realização de cada medida.

Ninfas de *A. brasiliense* apresentam pernas longas, coxa I com dois espinhos evidentes, sendo o externo mais longo que o interno, coxas II e III com um espinho em cada e coxa IV com um espinho bastante curto, corroborando Aragão (1908). Tais características são similares a *A. parvum* e diferem de *A. dubitatum* no tamanho do espinho na coxa IV (mais curta em *A. brasiliense*). A mesma distribuição de espinhos é observada em *A. neumanii*, porém os espinhos de *A. brasiliense* são maiores. *A. triste* com espinhos externos da coxa I triangulares e *A. tigrinum* com espinho externo estreito e pequeno espinho interno na coxa I e *A. maculatum* com espinho externo na coxa I também estreito apresentam distribuição numérica e morfológica de espinhos diferentes de *A. brasiliense*.

Parafraçando Barros-Battesti et al. (2005), é necessário utilizar as características morfológicas com cuidado, visto que a maioria das larvas e também ninfas do gênero *Amblyomma* da região Neotropical permanecem ainda desconhecidas.

Complementando informações sobre a espécie de carrapato *A. brasiliense*, é aqui apresentado pela primeira vez o estudo ultramorfológico do sistema reprodutor de fêmeas desta espécie, revelando que o ovário consiste em um órgão tubular único e contínuo em forma de ferradura, localizado no

terço posterior do corpo, confirmando os dados de Sonenshine (1991) em *Dermacentor andersoni* e *D. variabilis*, Denardi et al. (2004) em *A. cajennense*, Saito et al. (2005) em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Oliveira et al. (2005) em *Rhipicephalus sanguineus* e Oliveira et al. (2006) em *A. triste*.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou também a presença de ovócitos em processo de reabsorção. Oliveira et al. (2005) e Saito et al. (2005) observaram ovócitos neste estágio em *Rhipicephalus sanguineus* e em *R. (Boophilus) microplus*, respectivamente, e, através de técnicas histológicas os caracterizaram pelo aspecto anormal e pela desorganização celular, incluindo a presença de vacúolos autofágicos no citoplasma.

As técnicas histológicas permitiram classificar o ovário de *A. brasiliense* como panoístico, uma vez que todas as células presentes, exceto as que compõem a parede do ovário são ovogônias, ou seja, futuros ovócitos. Segundo Denardi et al. (2004), neste tipo de ovário as células nutridoras e em carrapatos também as foliculares estão ausentes.

Morfologicamente, como nas outras espécies de carrapatos já descritas, o ovário de *A. brasiliense* não é segmentado em regiões distintas de desenvolvimento como no ovário da maioria dos artrópodes. De acordo com Denardi et al. (2004), a maioria dos ovócitos não atinge sincronicamente a maturidade, uma vez que eles tem seu desenvolvimento inicial retardado pelos ovócitos adjacentes e próximos destes, então, ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento são encontrados, caracterizando um desenvolvimento simultâneo, porém assíncrono, como observado também em *A. brasiliense*.

As variações morfológicas existentes entre os ovócitos do *A. brasiliense* e a diferente deposição do vitelo no citoplasma permitiram classifica-los em cinco estádios, conforme proposto por Denardi et al. (2004), em que os autores descreveram também estes desenvolvimentos, assim como relatado por Oliveira et al. (2005). Por outro lado, Saito et al. (2005) encontraram seis estágios de desenvolvimento em *R. (B.) microplus*, enquanto Oliveira et al. (2006) quatro em *A. triste*.

Em *A. brasiliense* foi detectada grande deposição de grânulos de vitelo nos estágios IV e V assim como em *A. cajennense* e em *R. sanguineus* em que

as evidências morfológicas confirmam a ocorrência principalmente de elementos vindo do exterior para o interior dos ovócitos (incorporação exógena) desde o estágio II, contradizendo Balashov (1983) que sugere origem endógena e exógena para o vitelo, porém relata primeiramente a origem endógena e posterior a esta, a deposição exógena.

Pela primeira vez foi observado em carrapatos ovócitos com a presença de córium espesso e esculpado, apresentando diminutas cerdas, cuja função ainda não foi estabelecida.

As técnicas histológicas mostraram que os ovócitos I a V estão presos a parede epitelial do ovário por uma estrutura celular denominada pedicelo, também já observada em outros estudos com ovários de carrapatos. Said (1992) e Denardi et al. (2004) relatam que o pedicelo exerce uma pressão crescente em ovócitos desenvolvidos contra a parede do ovário, que os empurra para dentro do lúmen.

Oliveira et al. (2007) estudando o *A. triste* validou a função de síntese e suprimento de precursores de vitelo como lipídeos, proteínas e carboidratos para as células do pedicelo.

6. CONCLUSÕES

1. As principais características morfológicas observadas nas larvas de *A. brasiliense* são: base do capítulo retangular, palpos curtos, idiossoma arredondado, presença de “large wax gland” no quinto festão, coxa I com dois espinhos, sendo o externo maior que o interno, e coxas II e III com um espinho em cada uma.
2. A quetotaxia das larvas de *A. brasiliense* mostrou-se similar e conservada entre as diversas espécies de do gênero *Amblyomma*, com exceção ao tibiotarso e às cerda dII no tarso I.
3. As principais características morfológicas observadas nas ninfas de *A. brasiliense* são: base do capítulo retangular com córnua pontiaguda, aurícula curta e arredondada, idiossoma oval, coxa I com dois espinhos evidentes, sendo o externo mais longo que o interno, coxas II e III com um espinho curto e coxa IV com um espinho muito curto.
4. Ninfas de *A. brasiliense* apresentam tubérculos quitinosos na superfície interna da borda posterior do idiossoma.

5. Estudos adicionais são necessários para que seja possível a identificação de estágios imaturos do gênero *Amblyomma* da região Neotropical, por meio de chaves taxonômicas.
6. O ovário de carrapatos *Amblyomma brasiliense* é do tipo panoístico.
7. À parede do ovário de *A. brasiliense* estão presos ovócitos em cinco estágios de desenvolvimento (I-V) por meio do pedicelo celular.
8. Os ovócitos de *A. brasiliense* apresentam desenvolvimento assincrônico.
9. Pela primeira vez é relatado em ovócitos de carrapatos presença de córium espesso e esculpado, apresentando diminutas cerdas com função ainda não estabelecida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899 descrição morfológica do estágio de larva. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, 131-142, 1994.

AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Entomology and Vectors**, v. 6, p. 75-90, 1999.

ARAGÃO, H. B. Algumas novas espécies de carrapatos brasileiros. **Brazil-Medico**, Rio de Janeiro, n. 12, p. 111-115, 1908.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 759-843, 1936.

BALASHOV, Y.S. The female reproductive system. In: **An atlas of ixodid tick ultrastructure**. Russian: Entomological Society of America, 1983. 189p.

BARBIERI, F. S.; CHACÓN, S. C.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; FACCINI, J. L. H.; FAMADAS, K. M. Topographical and numerical study of the idiosomal integumentary structures of the larva of four Neotropical species

of *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari:Ixodidae). **Systematic Parasitology**, n. 68, p. 57-70, 2007.

BARBIERI, F. S.; BRITO, L. G.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma ovale* Koch, 1884 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. **Systematic and Applied Acarology**, v. 13, n. 2, p. 109-119, 2008a.

BARBIERI, F. S.; BRITO, L. G.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M.; CAMARGO, L. M. A.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma pacaе* Aragão, 1911 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. **Systematic and Applied Acarology**, v. 13, n. 3, p. 195-203, 2008b.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; REBELLO, V. M. M.; BARBIERI, F. DA S.; FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari:Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 51-57, 2005.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTDD-3/Butantan, 2006. 223p.

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

CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **Lês tiques du monde**. Paris: Éditions de L'Orstom, Institut Français de Recherche Scientifique por lê Développement em Cooperação, 1998. 233p.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 12, p. 19-23, 1998.

CLIFFORD, C. M.; ANASTOS, G. The use of chaetotaxy in the identification of larval ticks (Acarina:Ixodidae). **The journal of Parasitology**, v. 46, p. 567-578, 1960.

CONTI DÍAZ, I. A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, Montevideo, v. 17, p. 119-124, 2001.

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

DIEHL, P. A.; AESCHLIMANN, A.; OBENSCHAIN, F. D. **Physiology of Ticks**. New York: Pergamon Press, 1982. 509p.

DOUGLAS, J. R. The internal anatomy of *Dermacentor andersoni* stiles. **University of California Publications in Entomology**, v. 7, p. 202-272, 1943.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma dubitatum* Neumann: description of nymph and redescription of adults, together with the description of immature stages of *A. triste* Koch. **Acarologia**, v. 42, n. 4, p. 323-333, 2002.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; CAFRONE, M. M.; GUGLIELMONE, A. A. 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.

FAMADAS, K. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; FACCINI, J. L. H. A note on slide-mounting technique of unfed immature stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 139-140, 1996.

FAMADAS, K. M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LANFREDI, R. M. Redescription of the larva of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Acarologia**, v. 38, n. 2, p. 101-109, 1997.

FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J., Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 613-619, 1999.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, p. 8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; KEIRANS, J. E. Redescription of the male and female of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 and description of nymph and larva, and description of all stages of *Amblyomma pseudoparvum* n.sp. (Acari: Ixodida: Ixodidae). **Acarologia**, v. 32, n. 2, p. 143-159, 1990.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A., KEIRANS, J. E.; ROBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region**. Atlanta: International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, 2003. 173p.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 40, p. 83-100, 2006.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, C. E.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Editoras Plêiade/FAPESP, 2001. 218p.

HESS, E.; VLIMANT, M. The tarsal sensory system of *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae: Metastrata). III. Mapping of sensory hairs and evolution of relative importance of sensory modalities during post-embryonic development. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 90, n. 4, p. 887-897, 1983.

HOOGSTRAAL, H. **African Ixodoidea. Vol I: Ticks of the Sudan**. Washington, D.C: Bureau of Medicine and Surgery, 1956. 1101p.

HOOGSTRAAL, H. Changing patterns of tick-borne diseases in modern society. **Annual Review Entomology**, Stanford, v. 26, p. 75-99, 1981.

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS, J. E.; KOHLS, G. M. **The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere**. Provo, Utah: 4th ed., Brigham Young University Science Bulletin, 1972. 38p.

JONGEJAN F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-14, 2004.

KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Illustrated key to nymphs of the tick genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) found in the United State. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 489-495, 1998.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENARI, S. M.; WALKER, D. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A. SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, n. 43, p. 147-160, 2007.

NUÑES, J. L.; COBIÑAS, M. E. M.; MOLDETO, H. L. **Boophilus microplus: La garrapata comum del ganado vacuna**. Tucuman: Editora hemisfério Sur S.A., 1982. 198p.

NUNES, E. T.; BECHARA, G. H.; SAITO, K. C.; DENARDI, S. E.; OLIVEIRA, P. R.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, v. 36, p. 433-447, 2005.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Carrapatos (Acari: Ixodidae) capturados na reserve natural do Vale do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 177-179, 2007.

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

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

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

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; MARIN MORALES, M. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1255-1264, 2009.

OLIVER, J. H.; POUND, J. M.; ANDREWS, R. H. Introduction of egg maturation and oviposition in the ticks *Ornithodoros parkeri* (Acari:Argasidae). **Journal of Parasitology**, v. 70, n. 3, p. 337-342, 1984.

RECHAV, Y. Naturally acquired resistance to ticks – a global view. **Insect Science and its Applications**, Nairobi, v. 13, n. 4, p. 495-504, 1992.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002. 379p.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. **Zoologia dos invertebrados : uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: 7. ed., Roca, 2005. 1168p.

SAID, E. A. A contribution to the anatomy and histology of the female reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Acarina : Ixodidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 22, p. 385-393, 1992.

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

SANCHES, G. S.; BECHARA, G. H.; GARCIA, M. V.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 43-48, 2008.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. New York: 1st.ed. Editora Oxford University Press, 1991. 465p.

STORER, T.; STEBBINS, R. C. **Zoologia Geral**. São Paulo: 6^a ed., IBEP Nacional, 2000. 816p.

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

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA CAMPOS, M.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast of Brazil: infestations prior and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, Md, US, v. 40, n. 3, p. 268-274, 2003.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; CASTRO, M. B.; VONGLIOTTI, A. Ticks (Acari:Ixodidae) parasitizing humans in a Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology**, n. 39, p. 339-346, 2006.

TELLAM, R. L.; SMITH, D.; KEMP, D. H.; WILLADSEN, P. Animal parasite control utilizing biotechnology. Boca Raton: Editora W.K. Yong, 1992. 461p.

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

WALKER, J. B.; KEIRANS, J. E.; HORAK, I. G. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge: **Cambridge University Press**, 2000. p. 643.

WIKEL S. K. Host immunity to ticks. **Annual Review of Entomology**, n. 41, v. 1, p. 1-22, 1996.

VERÍSSIMO, A. J. Prejuízos causados pelo carrapato *Boophilus microplus*. **Zootecnia**, Nova Odessa, SP, v. 31, n. 3/4, p. 97-106, 1993.

ANEXO A



Campus Universitário "Duse Rügger Ometto"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E MÉRITO CIENTÍFICO - UNIARARAS

Fone: 1935431400

Parecer Nº 012/2009

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Título: Caracterização da morfologia externa e interna do carrapato *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae)

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias

Parecer: O Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico - Uniararas, após acatar os pareceres dos membros / relatores previamente designados para o presente caso e atendendo os dispositivos das resoluções 196/96, resolve aprovar, sem pendências o protocolo supracitado.

Decisão Homologada na reunião do dia 10/02/2009.


Professor Doutor Frederico Tadeu Deloroso
COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E
MÉRITO CIENTÍFICO - UNIARARAS

Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 Jd. Universitário CEP: 13.607.339 Araras SP
Fone: 19.3543.1400 Fax: 19.3543.1412 www.uniararas.br

ANEXO B



COLÉGIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA
Departamento de Patologia Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Campus Jaboticabal), UNESP.

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n

Zona Rural 14884-900 - Jaboticabal / SP

Fone: (16) 3209-2662 – Fax: (19) 4062 -9501

Home Page: <http://www.cbpv.com.br> / E-mail: zacariascbpv@fcav.unesp.br

Ilmo. Sr.
Gervásio Henrique Bechara
UNESP – Universidade Estadual Paulista
Jaboticabal - SP

Trabalho nº: 0025/2009
Data de Submissão: 03/02/09

Prezado Pesquisador,

Estamos enviando-lhe os pareceres sobre o artigo MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF *Amblyomma brasiliense* (ARAGÃO, 1908) (ACARI:IXODIDAE) LARVA AND NYMPH BASED ON SCANNING ELECTRON MICROSCOPY*, para ser publicado como Artigo Completo.

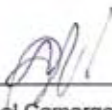
Solicitamos o especial favor de realizar as correções sugeridas pelos relatores dentro do prazo estipulado de 30 dias. As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil acesso aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as citações de teses devem estar disponíveis no site da Capes (<http://servicos.capes.gov.br/capesdw/>) – Banco de Teses. Envie-nos também, uma cópia do trabalho corrigido em CD. Após o período de 30 dias, o trabalho terá que ser submetido novamente e não terá prioridade de publicação pela data inicial de envio. Solicitamos ainda, o pagamento da taxa de tramitação para publicação no valor de R\$ 20,00 (a ser paga sempre que o trabalho for submetido). Os dados bancários para o depósito são: Banco do Brasil - Agência 0269-0, Conta Corrente 28.848-9. Enviar o comprovante por e-mail.

Lembramos ainda, que os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa após correções, serão revisados antes da editoração final e o custo da revisão repassado para os autores do trabalho.

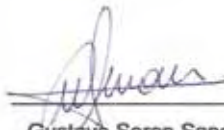
Sem mais para o momento, enviamos nossos protestos de estima e consideração,

Atenciosamente,


Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado
Editora-chefe da RBPV



Maria Izabel Camargo Mathias
Orientadora



Gustavo Seron Sanches
Orientado