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

**ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO
DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE
FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (CANESTRINI, 1887)
(ACARI: IXODIDAE) EM DOIS ESTÁGIOS
DE ALIMENTAÇÃO**

ERIKA TAKAGI NUNES

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
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2006

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

ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DAS GLÂNDULAS SALIVARES DE FÊMEAS DE CARRAPATOS *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE) EM DOIS ESTÁGIOS DE ALIMENTAÇÃO

ERIKA TAKAGI NUNES

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias

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
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2006

595.42 Nunes, Erika Takagi
N972e Estudo morfológico comparativo das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari : Ixodidae) em dois estágios de alimentação / Erika Takagi Nunes. – Rio Claro : [s.n.], 2006
143 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

1. Ácaro. 2. Histologia. 3. Histoquímica. 4. Morte celular.
5. Ultra-estrutura. 6. Carrapato-do-boi I. Título.

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

À Deus, por ter me oferecido a vida, me guiado nos momentos de decisões e permitido que pudesse concluir mais uma etapa de minha carreira profissional...

À meus queridos pais, meus pilares, pelo amor, dedicação e suporte em todos os momentos... Amo vocês!

À minha irmã Karina, pelo apoio, amor e orgulho... Também te amo muito, maninha!

Ao "Tico meu", Rodolfo A. Ruiz, por ter compartilhado comigo os momentos difíceis e também de alegrias... Te amo muito, muito, muito....

Dedico esta dissertação...

Agradeço de modo muito especial, à Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias, pelo exemplo de garra, coragem e trabalho realizado e por ter sido, além de uma grande orientadora, uma amiga, nestes anos em que caminhamos juntas!

Bel, aí vai o meu “muito obrigado” pelo incentivo, pelo apoio às crises e pelos momentos em que me fez sorrir com seu alto-astral. Carregarei sempre comigo os seus bons ensinamentos...

*“Às vezes sou grande;
Às vezes sou pequena;
Tão pequena sou que...
Às vezes ele é pequeno;
Às vezes ele é grande,
Tão grande o mundo que
aos poucos percebo que
crescer me torna pequena”.*

(Lígia Calconi Tayar)

*Cada dia em nossas vidas nos ensina lições que muitas vezes nem percebemos.
 Desde o nosso primeiro piscar de olhos, desde cada momento em que a fome bate,
 desde cada palavra que falamos.*

*Passamos por inúmeras situações, na maioria delas somos protegidos,
 até que um dia a gente cresce e começa a enfrentar o mundo sozinho.
 Escolher a profissão, ingressar numa faculdade, conseguir um emprego...
 Essas são tarefas que nem todos suportam com um sorriso no rosto ou
 nem todos fazem por vontade própria.*

*Cada um tem suas condições de vida e cada qual será recompensado pelo esforço, que não é em vão.
 Às vezes acontecem coisas que a gente nem acredita. Às vezes, dá tudo, tudo errado!
 Você pensa que escolheu a profissão errada, que você não consegue sair do lugar, às vezes você
 sente que o mundo todo virou as costas ...*

*Parece que você caiu e não consegue levantar... Está a ponto de perder o ar...
 Talvez você descubra que quem dizia ser seu amigo, nunca foi seu amigo de verdade e talvez você
 passe a vida inteira tentando descobrir quem são seus inimigos e nunca chegue a uma conclusão.*

*Mas nem tudo pode dar errado ao mesmo tempo, desde que você não queira.
 E aí... Você pode mudar a sua vida!*

*Se tiver vontade de jogar tudo pro alto, pense bem nas conseqüências,
 mas pense no bem que isso poderá proporcionar.*

Não procure a pessoa certa, porque no momento certo aparecerá.

*Você não pode procurar um amigo de verdade ou um amor como procura roupas de marca no
 shopping e nem mesmo encontrar as qualidades que deseja como encontra nas cores e tecidos ou
 nas capas dos livros.*

*Olhe menos para as vitrines, mas tente conhecer de perto o que está sendo exibido.
 Eu poderia estar falando de moda, de surf, de tecnologia ou cultura,
 mas hoje, escolhi falar sobre a vida!*

*Encontre um sentido para a sua vida, desde que você saiba guiá-la com sabedoria.
 Não deixe tudo nas mãos do destino, você nem sabe se o destino realmente existe...
 Faça acontecer e não espere que alguém resolva os seus problemas, nem fuja deles.*

*Encare-os de frente. Aceite ajuda apenas de quem quer o seu bem, pois embora não possam resolver
 os seus problemas, quem quer o seu bem te dará toda a força necessária pra que você possa
 suportar e...*

Confie! Entenda que a vida é bela, mas nem tanto ...

Mas você deve estar bem consigo mesmo pra que possa estar bem com a vida.

*Costumam dizer por aí que quem espera sempre alcança,
 mas percebi que quem alcança é quem corre atrás...*

Não importa a tua idade, nem o tamanho de seu sonho...

A sua vida está em suas próprias mãos e só você sabe o que fazer com ela...

(Lilian Roque de Oliveira)

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à  (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho (Processo nº 04 / 03252-1).

Ao Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, a quem tenho um carinho muito especial, pela sua disposição ao envio dos carrapatos, sugestões e pelo apoio. Sou muito grata a tudo que fez por mim!

Aos docentes do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, por estarem sempre dispostos ao esclarecimento de dúvidas, Profa. Carminda de Cruz-Landim, Márcia B. Braga, Ana C. Leonardo, e em especial, aos professores José Chaud Netto, Maria Ap. Marim-Morales e Doralice Maria Cella, pelo carinho que sempre me transmitiram.

Aos técnicos de laboratório Anderson, Rogilene Ap. Prado, Reinaldo Del Vecchio (Jaboticabal), pela cooperação e suporte no envio e/ou processamento do material, assim como ao Gerson de Mello Souza, Mônica Iamonte e Antônio T. Yabuki, que além da gratidão pelo auxílio, tenho um grande carinho pela forma com que sempre me trataram.

À secretária do departamento de Biologia, Lucila de Lourdes S. Franco e em especial, à Cristiane Milleo pelo “socorro” na montagem das pranchas.

Aos porteiros, pelas vezes que abrigaram nossos “ticks” em cada chegada de Jaboticabal.

Aos meus amigos de pós-graduação: Marielle, Fábio Britto, Zé Augusto, Thays, Zinho, Silvana, Giselly, Dani, Márcia, Reinaldo, Bruno, Rodrigo e Márcio (um quase pós-graduando), pelos bons momentos compartilhando brincadeiras e também por aqueles de cansaço e desânimo.

Àqueles amigos, também orientados da Bel, por tudo que passamos juntos, pelos momentos divertidos, comentários de babados e também, por aqueles de choro, nervoso e desespero... Pablito, Gaby's, Jú Rollo, Amandita, Paty, Luciano: um grande beijo! Em especial, à Karim, pela inestimável ajuda com sugestões para a realização deste trabalho; à Gis, pelo “help” na formatação final (com uma ajudinha

do “CB”, é claro!) e à Lorena, Sandra “Cabrita” e Déby, pelo ombro amigo, com quem pude sempre contar... Vocês todas ficarão para sempre em meu coração!

Às todas as meninas que um dia moraram comigo: Eli, Luzinha, Sil, Telly, Isa, Camila, Amá, Dani, Íris (apesar de pouco tempo!), Ani e Marina (esta deu trabalho!), por todos os bons momentos que passamos juntas!

Aos meus amigos de graduação, alguns que assim como eu, permaneceram em Rio Claro e que encontro de vez em quando, Peão, Gleí, Gui Gomes, Nena, Sunao, Ivan, Gra, Bruna, além daqueles que estão longe, mas que sempre demonstram carinho: Douglas, Telly, Cris, Mú, Rob’s, Oz e Sarinha.

Aos meus sogros Irineu e Neuza, pelo exemplo de luta e por sempre terem torcido pela minha felicidade e sucesso.

Aos meus primos Sérgio, Kátia e Willian, pela preocupação, incentivo e amor.

Àqueles que são muito mais que amigos antigos: Vivi, Magú, Geovane, Alê, Glauce, Silvério, Alline, Aline, pela torcida e amizade. Que Deus os abençoe e que possamos estar sempre juntos! E àquelas amigas que apesar de um bom tempo sem nos reencontrarmos, também tenho um carinho especial: Marcita, Débora e Vã.

Agradeço a todas as pessoas que um dia fizeram parte de minha história de vida!

ÍNDICE

RESUMO E ABSTRACT.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	4
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
III.1. MATERIAL.....	22
III.2. MÉTODOS.....	23
III.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ.....	23
III.2.1.1. Análise morfológica.....	23
III.2.1.1.1. Técnica da Hematoxilina de Harris- Eosina Aquosa.....	23
III.2.1.2. Análise Histoquímica.....	23
III.2.1.2.1. Azul de Nilo para detecção de lipídios.....	23
III.2.1.2.2. PAS / Azul de Alcian para detecção de polissacarídeos.....	24
III.2.1.2.3. Azul de Bromofenol para detecção de proteínas.....	24
III.2.1.2.4. Xylidine Ponceau para detecção de proteínas.....	24
III.2.1.2.5. Técnica de Exclusão de Corante utilizando o Azul do Nilo.....	25
III.2.1.2.6. Localização da Atividade da Fosfatase Ácida.....	25
III.2.1.2.7. Localização da Atividade da ATPase.....	26
III.2.1.3. Análise Citoquímica.....	27
III.2.1.3.1. Reação de Feulgen.....	27
III.2.1.3.2. Técnica do Azul do Toluidina.....	27
III.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	28
III.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	28
III.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	28
III.2.2.2.1. Análise Morfológica (Rotina).....	28
III.2.2.2.2. Análise Citoquímica para localização da Fosfatase Ácida.....	29
IV. RESULTADOS.....	30

CAPÍTULO 1: Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)	32
CAPÍTULO 2: Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) tick during feeding.....	36
CAPÍTULO 3: Ultrastructural comparison of female <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during feeding: cell death features at semi-engorged stage.....	61
CAPÍTULO 4: Acid phosphatase and ATPase activities in female cattle-tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during the feeding period.....	87
V. DISCUSSÃO FINAL.....	113
VI. CONCLUSÕES.....	120
VII. REFERÊNCIAS.....	123

Resumo e Abstract

RESUMO

As glândulas salivares dos carrapatos são órgãos importantes na transmissão de patógenos a seus hospedeiros, entretanto, o conhecimento das mudanças morfo-fisiológicas que nelas ocorrem durante o período de alimentação são limitados. Neste trabalho estudou-se as glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por meio de técnicas de morfologia, histoquímica e citoquímica de luz e ultra-estrutural em fêmeas em dois diferentes estágios de alimentação (inicial: 24 a 48 horas de infestação, peso inferior a 0,03g e semi-ingurgitado: 4 a 5 dias de infestação, peso entre 0,13g e 0,25g), de modo a verificar as mudanças que ocorreriam no tecido glandular neste período e identificar quando teria início o processo de degeneração, além de estabelecer que tipo de morte celular estaria envolvida. As glândulas salivares das fêmeas em início de alimentação mostraram suas células fortemente positivas para ATPase e eficientes na exclusão de corante vital, estando portanto, ativas ou apenas em início de degeneração. Os núcleos, de maneira geral, apresentaram-se preservados, sendo assim, descartada a ocorrência de morte celular neste estágio. A localização da fosfatase ácida demonstrou a participação desta enzima na atividade metabólica destes órgãos, regulando o processo secretor e degradando proteínas. Fêmeas no estágio semi-ingurgitado apresentaram glândulas com características de degeneração, como perda das especializações de membrana, presença de figuras mielínicas, vacúolos autofágicos, lisossomos, além de alterações nucleares como condensação e marginalização cromatínica, formação de *blebs* e chegando à fragmentação nuclear. À medida que o processo de alimentação avançou, houve aumento da enzima fosfatase ácida, entretanto, os ácinos mantiveram-se fortemente ATPase positivos. Os resultados aqui obtidos demonstraram que as glândulas salivares das fêmeas de *R. (B.) microplus*, já no estágio semi-ingurgitado começam a degenerar e sofrem morte celular por apoptose, contrariando o que é descrito para as demais espécies de ixodídeos, quando a degeneração ocorre após o ingurgitamento e os ductos excretores morrem por necrose.

ABSTRACT

The ticks' salivary glands are important organs to the pathogens transmission to their hosts, however, the knowledge regarding the morpho-physiological changes which occur in these structures during the feeding period are limited. In this work, the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* female ticks were studied, using morphological, histochemical and ultrastructural citochemistry techniques in individuals at two different feeding stages (initial: 24-48 hours of attachment; weigh lower than 0.03g, and semi-engorged: 4-5 days of attachment; weigh around 0.13 and 0.25g), in attempt to verifying the changes that would occur in the glandular tissue at this feeding period and identifying when the degeneration process would start, besides establishing which cell death type would be involved. The salivary glands from females at beginning of feeding showed their cells strongly positive to ATPase and efficient for the vital stain exclusion, being thus, active or at initial stages of degeneration. The nuclei, in a general way, present themselves preserved, being thus discarded the signs of the apoptosis occurrence in this stage. The acid phosphatase localization demonstrated this enzyme participation in the metabolic activity of these organs, regulating the secretory process and degrading proteins. Females at semi-engorged stage showed glands with degenerative characteristics, as loss of membrane especialization, presence of mielinic figures, autophagic vacuoles, lysosomes, besides nuclear alterations as chromatin condensation and marginalization, blebs formation and nuclear fragmentation. As the feeding process progressed, there was a acid phosphatase enzyme increase, however, the acini maintained strongly ATPase-positive. The results here obtained showed that the *R. (B.) microplus* salivary glands in females at the semi-engorged stage start to degenerate and suffer cell death by apoptosis, unlike the descriptions to the others ixodids species, when the degeneration occurs after the engorgement and the excretory ducts die by necrosis.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas de vertebrados representantes da ordem Acarina e, portanto, não apresentam divisões corporais, sendo a cabeça, tórax e abdomen fundidos e não segmentados (STORER; USINGER, 1977).

O grupo é constituído de animais pequenos ou médios cujo corpo é achatado e ovalado, com algumas espécies atingindo cerca de 3 cm de comprimento. Apesar de apresentarem um forte tegumento podem ter suas dimensões aumentadas durante o repasto sangüíneo no hospedeiro. Na região anterior do corpo, não se distingue a cabeça e sim, um conjunto de peças bucais quitinizadas denominado gnatossoma (REY, 1973).

Muitas espécies podem viver por longos períodos sem alimento (até mais de um ano) entre as vegetações (RUPERT; BARNES, 1996) e são resistentes à dessecação por possuírem o integumento recoberto por cera (WALKER, 1994). Além disto, porções do corpo não são totalmente esclerotizadas, sendo capaz de uma grande expansão quando ingurgitado com sangue.

Os carrapatos são classificados em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nutalliellidae. O corpo das espécies Ixodidae é recoberto por uma grande placa dorsal quitinosa, o escudo, que pode ter a superfície ornamentada por manchas, depressões e desenhos (REY, 1973) e é onde encontram-se as partes bucais na região frontal do corpo. Já os Argasidae não apresentam essa placa dura e as partes bucais

encontram-se localizadas ventralmente (WALKER, 1994; WALL; SHEARER, 1997). A família Nutalliellidae é menor do que as outras duas e consiste apenas de uma espécie (SAUER et al., 2000).

Dentre os artrópodes, os carrapatos constituem, provavelmente, um dos mais importantes grupos do ponto de vista médico e veterinário, uma vez que provocam lesões no hospedeiro, seja no processo de repasto sanguíneo ou pela transmissão de agentes patogênicos. São animais hematófagos e vetores de arboviroses, rickettsioses, espiroquetoses e protozoários tanto para o homem quanto para animais domésticos (KAUFMAN, 1989). Esse parasitismo compromete todo o desenvolvimento do hospedeiro pela espoliação direta causada pelo hematofagismo, o que permite a entrada de organismos responsáveis pelas infecções secundárias como miíases cutâneas, ou paralisia provocada pela ação tóxica da saliva do parasita (WALL; SHEARER, 1997), tudo isso influenciando negativamente em sua produtividade cujos reflexos atingem até mesmo a comercialização de produtos como a carne, couro e o leite. Estima-se, no Brasil, que os prejuízos causados pelos carrapatos chegam a alcançar quase um bilhão de dólares (HORN, 1983 apud ANDREOTTI, 2002).

Segundo Harwood e James (1979), este extraordinário sucesso dos carrapatos como vetores de microrganismos se deve às características biológicas que apresentam, dentre as quais destacam-se: hematofagismo em todas as fases do desenvolvimento; fixação profunda nos hospedeiros, o que dificulta sua remoção; ingurgitamento lento, havendo tempo para inocular patógenos; adaptação a diferentes espécies de hospedeiros; resistência a adversidade climática devido a grande esclerotização; longevidade nos ambientes, propiciando tempo para multiplicação dos patógenos.

O carrapato da espécie *Boophilus microplus* é um ectoparasita de bovinos distribuído geograficamente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WILLADSEN; JONGEJAN, 1999). Pertence à família dos carrapatos duros (Ixodidae) e é a única, das cinco espécies conhecidas, presente no Brasil (PEREIRA, 1982), destacando-se por ser vetor principalmente da rickettsia *Anaplasma sp* e do protozoário *Babesia spp*, responsáveis pela “Tristeza Parasitária Bovina”, causadora de grandes prejuízos ao sistema de produção. Por exemplo, só com a exportação de

couro e produtos manufaturados, o Brasil deixou de exportar em 1997, cerca de US\$ 500 milhões, decorrentes da má qualidade do produto, devido aos danos produzidos principalmente por ectoparasitas, incluindo o carrapato. Recentemente, Nunes et al. (2005) encontraram, em nível ultra-estrutural, a presença de microrganismos nas glândulas salivares de alguns espécimens desta espécie, o que evidencia a potencialidade destes carrapatos na transmissão de patógenos.

Muitos estudos morfológicos e moleculares com carrapatos *Rhipicephalus* (Koch, 1844) e *Boophilus* (Curtice, 1891) mostraram similaridades entre estes gêneros e revelaram que o primeiro não é uma linhagem monofilética, tendo algumas espécies mais próximas àquelas do gênero *Boophilus* que às outras de mesmo gênero (NEUMANN, 1904, CAMICAS; MOREL, 1977; MURREL et al., 2001; KLOMPEN et al., 1996). Assim, Murrel e Barker (2003), revisando a filogenia, redefiniram a nomenclatura, o que tornou *Boophilus* um subgênero de *Rhipicephalus*, sendo todas as cinco espécies deste gênero membros de *Rhipicephalus* (*Boophilus*).

O ciclo de vida dos carrapatos ixodídeos consiste em: ovo, larva, ninfa e adulto, sendo que dispendem parte do período no seu hospedeiro e parte no ambiente. O carrapato-do-boi é um parasito monoxeno, isto é, depende de apenas um hospedeiro em seu ciclo de vida, preferencialmente o bovino. No entanto, Arthur (1960) cita outras espécies que podem comportar-se como hospedeiros tais como búfalos, ovinos, caprinos, coelhos, animais domésticos e silvestres, além de ser freqüente o ataque ao homem (REY, 1973).

No caso deste carrapato, o ciclo de vida apresenta duas fases: a de vida livre que se inicia com o desprendimento do hospedeiro e caída no solo, período com duração de 32 dias (GONZALES, 1995) durante os quais o carrapato não se alimenta, sobrevivendo apenas de suas reservas (FARIAS, 1995); e a fase parasitária que se inicia quando a larva fixa suas peças bucais no tecido do hospedeiro, iniciando o processo de alimentação. Segundo Oliver Jr. (1974), no início da fase parasitária, a alimentação é descontínua ou à taxas muito baixas até que ocorra o acasalamento, processo esse sucedido com a rápida fase alimentar que culmina com o ingurgitamento.

No processo de fixação do carrapato no hospedeiro, o hipostômio penetra lentamente na pele, como consequência da ação combinada entre as quelíceras e a

saliva. A digestão dos tecidos ao redor do canal de penetração causa ruptura dos capilares e vasos linfáticos, permitindo a sucção do sangue alternada com a eliminação da saliva produzida nas glândulas salivares.

As larvas da espécie *Boophilus microplus* alimentam-se preferencialmente do plasma sangüíneo, sendo o sangue o principal constituinte alimentar nos momentos que precedem o rápido ingurgitamento das ninfas e fêmeas (BENNETT, 1974). A fêmea de *Boophilus microplus*, durante os seis primeiros dias de fixação, ingere apenas 3,8 μ L de sangue, porém, nos momentos que precedem sua queda (12-24 horas), a ingestão atinge valores em torno de 300 a 500 μ L (TATCHELL et al., 1972), podendo aumentar seu peso em até 200 vezes (KEMP et al., 1982). Após desprender-se do bovino, a fêmea ingurgitada procura um local protegido da luz solar direta para realizar a postura, que pode durar de uma semana a vários meses, dependendo das condições ambientais como temperatura e umidade. A fêmea morre após haver completado a postura (FREITAS, 1982).

O aparelho bucal dos carrapatos inclui um par de glândulas salivares localizadas dentro do idiossoma (WALKER et al., 1985). Morfologicamente, estas são estruturas alongadas, com subunidades em forma de ácinos secretores e ductos excretores localizados nas porções antero-laterais do corpo do animal (TILL, 1961; BALASHOV, 1983; WALKER et al., 1985; SAUER ; HAIR, 1986). Schumaker e Serra-Freire (1991) observaram em *Argas miniatus* que esses órgãos apresentam cor branco-leitosa e possuem tamanhos aproximadamente iguais dos dois lados do corpo. Segundo Megaw e Beadle (1979), cada glândula salivar é formada por aproximadamente 400 ácinos, classificados de acordo com a presença ou ausência de granulação no citoplasma das células.

As glândulas salivares dos carrapatos podem ser consideradas um dos mais importantes órgãos desses indivíduos, uma vez que desempenham funções essenciais para a sobrevivência e por serem a principal via de transmissão de patógenos a seus hospedeiros. Estas estruturas são responsáveis pela elaboração de uma substância que, ao tomar contato com o aparato bucal, permite a captação da umidade do meio pelo parasita, facilitando desse modo o processo da alimentação (RUDOLPH; KUNLLE, 1974). Segundo Moorhouse e Tatchell (1966) a saliva secretada é o componente responsável pela fixação dos carrapatos que possuem aparelho bucal

curto como as espécies do gênero *Rhipicephalus*. Dados de análises bioquímicas mostraram que a saliva de fêmeas de *Boophilus microplus* em alimentação contém proteínas, carboidratos e lipídios, além de íons cloro e sódio concentrados (BALASHOV, 1983). Em carrapatos ixodídeos, as glândulas salivares também servem como órgãos osmoregulatórios, uma vez que regulam os íons, principalmente cloro e sódio presentes na hemolinfa do hospedeiro (MEGAW, 1976). Gregson (1967) observou que um volume significativo de água é excretado para o interior do hospedeiro via glândula salivar, destacando assim, a função excretora dessas estruturas. Como demonstrado por Ribeiro et al. (1985), os ácinos também produzem substâncias que causam a debilitação do sistema de defesa do hospedeiro, além de excretarem toxinas paralisantes (CRAUSE et al., 1993). Neste sentido, as glândulas desempenham papel fundamental no mecanismo de alimentação, como também em outras funções específicas como é o caso da produção de secreções cementantes (COWDRY ; DANKS, 1933), anticoagulantes (NUTTAL; STRICKLAND, 1908), enzimas hidrolíticas (TATCHELL, 1969) e proteolíticas (HOWELL et al., 1975).

Há algumas descrições histológicas de glândulas salivares em diferentes espécies de carrapatos ixodídeos. Até o presente, foi descrita a presença de três tipos de ácinos nas fêmeas e quatro nos machos (WALKER et al., 1985; FAWCET et al., 1986; COONS; ALBERTI, 1999). Os ácinos do tipo I, situados ao longo do ducto excretor principal de ambos os sexos, são agranulares, possuem função osmoregulatória e sugere-se que através destes, o carrapato secrete sal proveniente da hemolinfa na região oral para captação de água do ar insaturado. Os demais ácinos (II, III e IV) são formados por células granulares distribuídas ao longo de um sistema ramificado de ductos e são responsáveis pela secreção de produtos relacionados com a fixação do carrapato no hospedeiro, digestão de tecidos (LAVOPIERRE; RIEK, 1955; WALKER et al., 1985), inibição da coagulação sanguínea e reação primária do hospedeiro através de reação inflamatória (NUTTALL; STRICKLAND, 1908; KÜNSBERG, 1911; WALKER et al., 1985; RIBEIRO; MATHER, 1998; PAESEN et al., 1999), além da secreção de quinases que catalisam a bradicinina, o que explica, em parte, a ausência de dor no hospedeiro (RIBEIRO, 1987). Acredita-se que o fluido excretado pelo carrapato é exportado, na sua maior parte, pelo ácino tipo III durante o processo de alimentação (COONS; L'AMOREAUX, 1986). Os ácinos IV,

restritos aos machos, provavelmente estejam relacionados com o papel reprodutivo (SAUER et al., 1995).

Binnington (1978), em estudo histológico e histoquímico com glândulas salivares de *Boophilus microplus* durante o período de alimentação, descreveu no ácino tipo I a existência de uma célula central maior rodeada por células periféricas agranulares, bem como uma grande diversidade de tipos celulares nos ácinos granulares tipo II (**a**, **b**, **c₁-c₄**) e III (**d**, **e** e **f**). Este autor encontrou as células **a**, **d** e **e** repletas de grânulos de secreção antes da infestação, ou seja, no período em que o carrapato encontrar-se-ia fora do seu hospedeiro e sugeriu que estas seriam responsáveis pela secreção de precursores de cemento, sendo encontradas aparentemente funcionais até aproximadamente 72 horas de alimentação. As células **c₂** e **f** tornar-se-iam ativas na alimentação e secretariam seus grânulos glicoproteicos entre 24-72 horas depois da infestação, enquanto as **b** e **c₃**, também com glicoproteínas e ricas em enzimas, seriam ativas durante toda a fase parasitária. Já a célula **c₁**, como todas as demais, apresentaria atividade esterase, enquanto as do tipo **f**, ocupando todo o fundo do ácino, tornar-se-iam ativas aproximadamente 12-24 horas após a infestação, tendo perdido a maioria de seus grânulos após 72 horas. Ainda, foram observadas por Binnington (1978), células epiteliais em *B. microplus* equivalentes às “water-cells” observadas por Meredith e Kaufman (1973) em *Dermacentor andersoni* apresentando uma grande área de superfície devido à presença de microvilos e sendo responsáveis pela excreção de água durante o processo de ingurgitamento.

Ao se alimentar, os carrapatos em geral ativam a expressão de novos genes (OAKS et al., 1991) e há evidências de que o crescimento e desenvolvimento das glândulas salivares pode ser controlado por fatores liberados para a hemolinfa durante a alimentação do animal (COONS; KAUFMAN, 1988). Kaufman e Phillips (1973b) encontraram que a adrenalina, noradrenalina e dopamina são estimuladores da secreção de fluido em glândulas salivares isoladas de fêmeas de *D. andersoni* e Needham e Sauer (1975) observaram o mesmo em fêmeas de *Amblyomma americanum* em processo de ingurgitamento. Em *B. microplus*, foi identificada a presença de catecolamina nas glândulas e nervos salivares (BINNINGTON; STONE, 1977).

Registros da literatura mostram que as glândulas salivares dos carrapatos sofrem transformações estruturais e funcionais que são determinadas pelo estágio fisiológico do parasito: possuem, durante a pré-fixação, ácinos volumosos com células secretoras apresentando grânulos de secreção citoplasmáticos e núcleos grandes (SCHUMAKER; SERRA FREIRE, 1991); que sofrem gradativa regressão, demonstrando mudanças morfológicas, inclusive autólise induzida por enzimas lisossômicas (FAWCETT et al., 1986). Needham et al. (1983) e Barker et al. (1984), em estudos realizados com glândulas salivares de *Amblyomma americanum*, também observaram mudanças significativas no diâmetro dos ácinos tipo I durante o processo de alimentação.

Observações feitas, por Robinson e Davidson (1913b) e True (1932) em argasídeos, demonstraram que somente ocorreria redução das glândulas salivares após o ingurgitamento, sem que tivesse sido mostrada extrema degeneração. Ao contrário, Vitzhum (1943) trabalhando com ixodídeos, verificou que na fêmea adulta ocorreria atrofia da glândula seguida de degeneração depois de completo o processo de ingurgitamento. Posteriormente, Till (1961), confirmou que durante a alimentação dos carrapatos, as glândulas salivares passariam por modificações morfológicas e fisiológicas, ocorrendo, primeiramente, um aumento no tamanho das mesmas que seria seguido de redução (em argasídeos) ou degeneração (em ixodídeos), assim que fosse completada a fase de ingurgitamento, porém, pouco é conhecido sobre as mudanças que estes órgãos sofrem durante e ao longo de seu ciclo de vida. Segundo Sauer et al. (2000) não existem informações sobre o controle da degeneração das glândulas salivares de carrapatos durante as mudas larva-ninfa ou ninfa-adulto.

Sonenshine (1991), estudando a biologia dos carrapatos em geral, observou que, caso haja uma interrupção na alimentação dos animais, as glândulas das fêmeas podem perder parcialmente sua competência, a qual pode ser rapidamente restabelecida após a realimentação do indivíduo. Entretanto, após o período de ingurgitamento, as fêmeas fertilizadas perdem quase que totalmente sua capacidade de produzir e secretar saliva.

Weiss e Kaufman (2001) afirmam que o comportamento de fêmeas removidas prematuramente do hospedeiro é influenciado pela quantidade de sangue ingerido e pelo acasalamento. Caso a fêmea virgem ou a fecundada seja removida

antes de ter atingido aproximadamente 10 vezes o peso da em jejum (peso crítico), ela é capaz de reiniciar o processo de alimentação em outro hospedeiro. No entanto, fêmeas virgens acima deste peso ou acasaladas que estejam na fase rápida de ingurgitamento, não voltam a se alimentar em outro hospedeiro e suas glândulas salivares degeneram dentro de aproximadamente oito dias, no caso das virgens, ou quatro dias no das acasaladas. Lomas et al. (1998) afirmaram que fêmeas de *A. hebraeum* parcialmente alimentadas que tenham atingido este “peso crítico”, aproximadamente, 300mg para esta espécie (HARRIS; KAUFMAN, 1984), a degeneração da glândula ocorre entre 24 - 48 horas depois de sua remoção do hospedeiro. Apesar disto, a degeneração do tecido começa dentro de 24 horas depois do ingurgitamento e conseqüente desprendimento do carrapato (KAUFMAN; LOMAS, 1996).

Segundo Harris e Kaufman (1985) a degeneração das glândulas salivares está sob controle hormonal, uma vez que tanto a ecdisona como 20-hidroxiecdisona levam ao processo degenerativo quando injetadas na hemocele do carrapato ou quando estes órgãos estão expostos a certas quantidades fisiológicas destes ecdisteróides *in vitro*. Assim, pode-se sugerir que os mecanismos que envolvem a degeneração em ixodídeos são programados em resposta à estimulação hormonal de um receptor de ecdisteróide. A secreção do ecdisteróide *in vivo* é acelerada por uma proteína presente no espermatóforo o qual é transferido durante a cópula, desencadeando assim, o processo degenerativo da glândula salivar (LOMAS; KAUFMAN, 1992a, b). Tal fato explica a diferença de tempo de degeneração observada entre fêmeas virgens e fecundadas, uma vez que nas primeiras a secreção do ecdisteróide é mais demorada (LOMAS; KAUFMAN, 1992a).

Recentemente, Denardi (2002) e Oliveira (2003) estudando fêmeas semi-ingurgitadas de *A. cajennense* e *R. sanguineus*, respectivamente, encontraram as glândulas salivares em atividade, ao contrário do encontrado por Nunes et al. (2005) para a espécie *R. (B.) microplus*, que já verificaram características morfológicas e ultra-estruturais indicativas de processo degenerativo em fêmeas no mesmo estágio de alimentação.

L'Amoreaux et al. (2003) encontraram evidências morfológicas de degeneração envolvendo, pelo menos em parte, morte celular programada tipo 1 em

carrapatos *D. variabilis*. Estes autores demonstraram que no 5º dia após o desprendimento do carrapato, já são observadas células apoptóticas nos ácinos tipo II e III, sendo este último, o mais atingido. Do 8º ao 11º dia é observada maior quantidade de ácinos do tipo II em processo de morte celular, sendo os do tipo I ainda preservados, o que demonstra uma organização temporal entre os três tipos de ácinos. Ainda segundo estes autores, por volta do 33º dia após o desprendimento, a glândula encontra-se totalmente degenerada, sendo observados apenas núcleos de células do ducto.

Este assincronismo na degradação glandular também ocorre nos insetos, como observado em *Apis* (SILVA; SILVA DE MORAES, 1999), *Bombyx mori* (SEHNAL; AKAI, 1990) e *Manduca sexta* (LOCKSHIN; ZAKERI, 1994), onde o processo degenerativo tem início na porção secretora distal e avança para a região proximal.

A morte celular pode ser acidental ou programada. O primeiro tipo, conhecido como necrose, é resultado de um trauma ou patologia, onde células morrem devido à exposição a condições ambientais não fisiológicas (BOWEN; BOWEN, 1990) e, em essência, é uma morte sem controle (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002). O desenvolvimento da necrose é precedido pelo surgimento de anormalidades morfológicas que indicam o distúrbio da homeostase celular, como por exemplo, inchamento da célula, “blebbing” de superfície, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, encolhimento seguido de inchamento do compartimento interno das mitocôndrias, dispersão e desaparecimento de ribossomos e pequeno acúmulo de cromatina condensada (TRUMP et al., 1981) sem, contudo, haver observação de fragmentos de núcleos envoltos por membrana. Nos estágios finais da necrose, depois da desintegração das membranas celulares, ocorre a degradação do DNA via nucleases e proteases lisossomais (BERGES; ISAACS, 1993), havendo o desaparecimento da cromatina. A ruptura da membrana plasmática resulta na diminuição da definição dos limites celulares, no entanto, células necróticas tendem a reter sua forma até serem removidas por fagócitos (SCHWARTZ; OSBORNE, 1995).

Ao contrário, a morte celular programada ocorre sob controle genético e fisiológico, sendo ativada durante períodos específicos do ciclo de vida dos

organismos multicelulares, em resposta a estímulos hormonais ou ambientais ou de acordo com sua utilidade morfogenética (BOWEN; BOWEN, 1990). Este tipo de morte celular é dividido em duas categorias, baseadas nas mudanças bioquímicas e morfológicas (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002). O tipo 1, conhecido como apoptose é caracterizado pela condensação do citoplasma e perda do contato entre células ou com a matriz extracelular, condensação da cromatina na superfície interna da membrana nuclear e fragmentação do DNA devido à clivagem por endonucleases, fagocitose e degradação de fragmentos celulares por lisossomos secundários de células vizinhas. As mitocôndrias mantêm-se intactas ou um pouco encolhidas, despolarizadas e permitindo o escape do citocromo *c*. Na morte celular tipo 2 ou lisossômica a destruição do DNA é tardia e sua característica principal é o aparecimento de grandes vacúolos autofágicos derivados de lisossomos que degradam o citoplasma enquanto a célula mantém-se funcional. Somente quando aproximadamente 80% do citoplasma encontra-se destruído, a condensação e marginalização cromatínica torna-se aparente, a eletroforese revela os *ladders* de DNA e restos da célula são fagocitados como na apoptose clássica (ZAKERI et al., 1993). Este tipo de morte celular programada é mais característico de células com citoplasma volumoso como as encontradas nos tecidos glandulares (glândulas de insetos em metamorfose), músculo e neurônios diferenciados. Halaby et al. (1994) encontraram este tipo de morte nas células das glândulas labiais em degeneração de *Manduca*.

Enquanto a necrose é um fenômeno freqüentemente descrito como multicelular, a apoptose, ao contrário, envolve cada célula do tecido (KERR et al., 1995).

Apesar desta classificação, segundo Zakeri et al. (1995), algumas células podem ter características comuns aos três tipos de morte celular.

Análises morfológicas de núcleos têm sido amplamente utilizadas nos casos de morte celular programada, uma vez que estes apresentam as primeiras evidências de células em apoptose: a cromatina condensa-se e torna-se agregada em massas uniformes na superfície interna do envelope nuclear, sendo as primeiras mudanças frequentemente acompanhadas por invaginação da membrana nuclear e formação de borbulhas (“*blebs*”) e, em casos mais extremos, fragmentos de diversos tamanhos são

produzidos (KERR et al., 1995). Esta picnose nuclear com posterior marginalização da cromatina condensada, no entanto, pode ou não estar presente nos processos de degeneração nos insetos. No caso das glândulas hipofaríngeas de operárias campeiras de abelhas, por exemplo, embora o entumescimento nuclear seja o fenômeno mais difundido durante a degeneração, condensação e marginalização cromatínica também são observadas em algumas células (SILVA DE MORAES; BOWEN, 2000).

O estudo de morte celular programada em invertebrados tem gerado muitas controvérsias, uma vez que as características típicas de apoptose estabelecidas em vertebrados não estão incondicionalmente presentes nas células destes animais.

Um dos eventos bem definidos relacionado à apoptose envolve a fragmentação do DNA devido a ativação de endonucleases que são responsáveis pela sua clivagem em regiões internucleossômicas, gerando fragmentos com 180-200 pares de bases (WYLLIE, 1980). Esta fragmentação é normalmente utilizada na identificação de células apoptóticas por ser considerada característica típica de apoptose (WYLLIE, 1981, WALKER et al., 1988; McCONKEY et al., 1990). Assim, nem todos os tipos de morte celular programada são acompanhados pela ativação de endonucleases (LOCKSHIN; ZAKERI, 1992; BOWEN et al., 1993; ZAKERI et al., 1993).

Em alguns insetos ocorre síntese ao invés de fragmentação do DNA durante a morte celular programada (BOWEN et al., 1993), sendo a participação das endonucleases no processo confirmada somente por alguns autores (GREGORC; BOWEN, 1997; JOCHOVÁ et al., 1997b; SILVA DE MORAES; BOWEN, 2000).

O nemátodo *Caenorhabditis elegans* tem sido um modelo muito utilizado no estabelecimento dos fundamentos da organização genética para o controle da morte celular, pois das 1090 células somáticas formadas durante o desenvolvimento destes vermes, 131 sofrem morte celular programada (ELLIS et al., 1991). Nos eventos apoptóticos é reconhecida a participação dos genes *egl-1*, *ced-4*, *ced-3* e *ced-9*, sendo este último, o responsável pela prevenção da apoptose (HENGARTNER, 1999).

As caspases, proteases de cisteínas, funcionam como efetoras da morte celular (KIDD, 1998). No caso dos vertebrados, as caspases podem ter como alvo as lamínas nucleares (COHEN et al., 2001), as proteínas integrais da membrana nuclear

e algumas proteínas do poro nuclear (BUENDIA et al., 1999). Todas as lamínas e as proteínas a elas associadas são clivadas em resíduos específicos por caspases específicas (TZUR et al., 2002) e esta proteólise é importante para a progressão da apoptose, uma vez que facilita a ativação das nucleases responsáveis pela fragmentação do DNA (RAO et al., 1996). Apesar disto, Tzur et al. (2002) sugeriram que a clivagem de lamínas não seja essencial para que a apoptose ocorra em *C. elegans*.

Para a detecção de morte celular os corantes para microscopia de luz, hematoxilina-eosina, têm sido amplamente utilizados, evidenciando citoplasma e núcleos condensados mais fortemente corados quando as células encontram-se em processo de morte. No entanto, a sensibilidade deste método é baixa (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002). Segundo estes mesmos autores, o uso de corantes vitais também serve para identificar apoptose, sendo sua vantagem a rapidez de aplicação da técnica e a observação da morte celular em três dimensões. Alguns métodos citoquímicos aplicados à microscopia de luz, como a reação de Feulgen (FEULGEN; ROSSENBECK, 1924) e a coloração com azul de toluidina (MELLO; VIDAL, 1980), também têm sido amplamente utilizados para o estudo de morte celular, uma vez que possibilitam a quantificação do DNA e exibem a morfologia das compactações cromatínicas.

Há muito tempo foi verificada que a degeneração de tecidos coincide com uma diminuição na atividade de enzimas que estão relacionadas com o metabolismo energético das células (WEBER, 1969), como por exemplo, a ATPase. Assim sendo, Hammar e Mottet, em 1971, propuseram o emprego de estudos histoquímicos para observar tecidos em processo de morte celular, uma vez que a apoptose é um processo ATP-dependente (SILVA DE MORAES, 1998).

A fosfatase ácida, termo genérico para uma série de fosfatases não-específicas que em pH ácido hidrolisam mono-ésteres ortofosfato (SILVA-ZACARIN, 2003), também tem sido utilizada como marcador de atividade lítica nas células. Estas hidrolases podem ser encontradas no interior de lisossomos, bem como livres no citoplasma das células, entre as cisternas do retículo endoplasmático, no complexo de Golgi, associadas à grânulos e em vacúolos. No entanto, Cruz-Landim et al. (2002) também verificaram a atividade da fosfatase ácida no interior de núcleos

em células de ovário e de intestino de larvas e pupas de *A. mellifera*, sugerindo que esta enzima participa do controle da expressão gênica ou hidrolisa proteínas da matriz nuclear em células em início de morte celular.

A atividade da fosfatase ácida livre e lisossomal tem sido determinada histoquimicamente em hemócitos e glândulas salivares de insetos (ARMBRUSTER et al., 1986) e, especificamente, no corpo gorduroso (De PRIESTER et al., 1979) e glândulas salivares (BOWEN, 1984) de *Calliphora erythrocephala*. Em larva de *Drosophila auraria* e no ventrículo de *A. mellifera* também foram observados resultados semelhantes por Dimitriadis e Kastritsis (1985) e Jimenez e Gilliam (1990), respectivamente. Algumas análises citoquímicas da fosfatase ácida demonstrando a morte celular fisiológica também foram realizadas no intestino médio de larvas de *Calliphora vomitoria* (SKELTON; BOWEN, 1987) e *A. mellifera* (GREGORC; BOWEN, 1997) e nas glândulas salivares de *D. melanogaster* (JONES; BOWEN, 1993).

A fosfatase ácida tem sido utilizada nos estudos de morte celular programada em insetos através do emprego do substrato de um amplo espectro de atividade, o p-paranitrofenilfosfato (JONES, 1990; JONES; BOWEN, 1993; CAVALCANTE, 1998; CRUZ-LANDIM et al., 2002; SILVA-ZACARIN, 2003; TOMAINO, 2003), naftol AS-TR fosfato (WORRIL, 1991; JONES; BOWEN, 1993; GREGORC; BOWEN, 1997; SILVA DE MORAES, 1998) e o β -glicerofosfato (LANE, 1968; LAICINE et al., 1991; SILVA DE MORAES et al., 1996b). No entanto, o p-paranitrofenilfosfato parece ser um indicador mais sensível para autólise celular particularmente nos estágios iniciais deste processo (RYDER; BOWEN, 1975).

Alguns autores sugerem ainda que a atividade da fosfatase ácida está relacionada e pode ser induzida pelos níveis de hormônio juvenil e de ecdisona na hemolinfa (van PELT VERKUIL, 1980; SILVA DE MORAES, 1998).

Embora a morte celular programada seja um assunto polêmico e bastante investigado em vertebrados e alguns invertebrados, em carrapatos, os estudos dos aspectos morfo-fisiológicos deste fenômeno são escassos, ainda que sejam extremamente importantes para a compreensão da fisiologia destes animais. Assim, investigações sobre a morfologia dos Ixodidae se fazem necessárias para auxiliarem

no desenvolvimento de medidas de controle destes parasitas e das patologias por eles causadas.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Tendo em vista que as glândulas salivares dos carrapatos são órgãos de particular importância na transmissão de patógenos a seus hospedeiros e que o conhecimento a respeito das mudanças morfo-fisiológicas que nelas ocorrem durante o período de alimentação do carrapato são limitados, estudos tornam-se necessários para a compreensão da biologia e ecologia destes parasitas com o intuito de se desenvolver estratégias integradas no manejo de suas infestações.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizando técnicas morfológicas, histoquímicas e citoquímicas ultra-estruturais em indivíduos que se encontram em dois diferentes estágios de alimentação (em início – 24 a 48 horas de infestação e semi-ingurgitado – 4 a 5 dias de infestação), de modo a verificar:

- avaliar as mudanças que ocorrem no tecido glandular do carrapato nos dois estágios de alimentação;
- quando se iniciam os processos de degeneração nas células glandulares;
- quais os tipos de morte celular que podem estar envolvidos.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. MATERIAL

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizadas fêmeas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes da criação de gado (*Bos taurus*) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Jaboticabal – SP/ Brasil, que foram coletadas em estágio inicial de alimentação e semi-ingurgitadas. Foram consideradas fêmeas em início de alimentação, aquelas com peso inferior a 0,03g (24-48 horas de infestação) e semi-alimentadas as que possuíam peso médio entre 0,13g e 0,25g (4-5 dias de infestação).

Para a análise foram utilizados equipamentos disponíveis nos laboratórios de Histologia e Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP Campus Rio Claro.

As fêmeas, depois de anestesiadas a frio (4°C), tiveram suas glândulas salivares retiradas em placa de Petri contendo solução fisiológica para insetos (NaCl 7,5 g/L, Na₂HPO₄ 2,38 g/L e KH₂PO₄ 2,72 g/L; pH 7.2), com o auxílio de pinças de ponta fina e micro-tesouras cirúrgicas para serem submetidas as diferentes técnicas.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. MICROSCOPIA DE LUZ

III.2.1.1. Análise Morfológica:

III.2.1.1.1. Técnica da Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As glândulas salivares foram fixadas em formalina neutra tamponada (pH 7-7.4) e acetona, na proporção 9:1, durante uma hora e trinta minutos, a 4°C, ou em paraformaldeído 4% durante 24 horas. Posteriormente, o material foi desidratado em banhos de 15 minutos cada nos álcoois 70-95% e transferido para a resina de embebição onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37°C), foram seccionados em micrótomo Leica RM 2145.

As secções de 4-5µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37°C e coradas com Hematoxilina de Harris durante 10 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, para retirada do excesso e reação do corante e, a seguir, coradas com Eosina durante 5 minutos. Após nova lavagem em água corrente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2. Análise Histoquímica:

III.2.1.2.1. Azul de Nilo para detecção de lipídios (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas permaneceram no corante à 37° por 5 minutos, foram lavadas em água corrente e, posteriormente, colocadas em ácido acético 1% por 1 minuto. Depois de secas, foram montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.2. PAS / Azul de Alcian para detecção de polissacarídeos ácidos e básicos (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas foram coradas com Alcian Blue pH 2,5, durante 30 minutos e, posteriormente, lavadas com água destilada. A seguir, foram colocadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos e novamente lavadas em água destilada. A seguir, as lâminas permaneceram no reagente de Schiff por 30 minutos, no escuro, e foram submetidas a uma lavagem em água corrente por 5 a 10 minutos. Logo após, foram coradas por hematoxilina por 2 minutos e lavadas em seguida. Foram secas e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.3. Azul de Bromofenol para detecção de proteínas totais (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas foram coradas pelo azul de bromofenol durante 2 horas, à temperatura ambiente. Logo após, lavadas com ácido acético 0,5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos e, a seguir, foram passadas rapidamente por uma solução de álcool butílico. Foram, então, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá para a observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.4. Xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas permaneceram no corante por 5 minutos e, posteriormente, foram lavadas em água corrente. Após 1 minuto em ácido acético 1%, foram secas

e montadas em Bálsamo do Canadá para posterior observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.5. Técnica de Exclusão de Corante utilizando Azul do Nilo (Segundo SAUNDERS et al., 1962).

As glândulas salivares, após retiradas foram transferidas para o corante Azul do Nilo (0,001g de Azul do Nilo em 10mL de solução salina) onde permaneceram por 30 minutos, à temperatura ambiente. Foram então lavadas em água destilada por duas vezes e, então, fixadas em formalina neutra tamponada e acetona, na proporção 9:1, durante uma hora e trinta minutos, a 4°C. As glândulas foram colocadas sobre lâmina e montadas em gelatina glicerizada para posterior observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.6. Localização da Atividade da Fosfatase Ácida (Segundo HUSSEIN et al., 1990)

• Secções em resina

Após a fixação em formalina neutra tamponada 10% e acetona, na proporção 9:1, durante uma hora e trinta minutos, a 4°C, o material foi lavado em tampão acetato (0,05M, pH 4.8) e incubado à 37°C, por 45 minutos, em meio de incubação contendo: naftol AS-TR fosfato, DMSO (dimetil sulfóxido), tampão acetato (0,05M, pH 4.8), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10% e sal vermelho violeta.

Para o preparo do meio de incubação, foram dissolvidos 3mg do substrato naftol AS-TR fosfato em duas gotas de DMSO e, em seguida, adicionados 10mL do tampão acetato. Na sequência, foi acrescentado 0,2mL do cloreto de manganês e, por último, 6mg do sal, sendo a solução vigorosamente misturada. O controle foi feito excluindo-se o substrato do meio de incubação.

Depois de incubadas, as glândulas salivares foram lavadas em água destilada e desidratadas em banhos de 15 minutos cada nos álcoois 70-95%. O material permaneceu por 24 horas em resina de embebição (mistura de 50mL de resina + 0,5g de ativador) e, posteriormente, foi incluído em resina Leica.

Após a inclusão, o material foi seccionado em micrótomo e os cortes de 6 µm foram recolhidos em lâminas de vidro e contra-corados em Hematoxilina. As lâminas foram montadas em Permount para observação e documentação fotográfica.

• Montagem total

Após a fixação das glândulas salivares em formalina neutra tamponada 10% e acetona, na proporção 9:1, durante uma hora e trinta minutos, a 4°C, estas foram rapidamente lavadas em tampão acetato de sódio (0,05M, pH 4.8), incubadas e desidratadas como descrito nesta técnica para secções em resina.

O material foi colocado sobre lâminas de vidro que, a seguir, foram montadas em Bálsamo do Canadá para observação e documentação fotográfica.

III.2.1.2.7. Localização da Atividade da ATPase (Segundo HUSSEIN et al., 1990)

As glândulas salivares foram fixadas em glutaraldeído 0,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7.2, durante uma hora, a 4°C.

O material foi incubado durante 48 minutos, a 37° C, no seguinte meio: Tris maleato (200mM, pH 7.2), ATP (5mM), MgSO₄ (5mM), KCl (15mM), CaCl₂ (10mM), acetato de chumbo (4mM), sacarose (160mM). O acetato de chumbo foi dissolvido no tampão, usando agitador magnético e deixado durante à noite, a 37°C, para completa dissolução. O ATP foi adicionado por último e no momento da incubação, exceto no grupo controle, onde este não foi utilizado.

Após a incubação, as glândulas salivares foram lavadas em tampão Tris-maleato (pH 7.2) durante 5 minutos, a 4°C, e fixadas em solução de formalina neutra tamponada e acetona (9:1) por 20 minutos. Posteriormente, foram desidratadas em

álcool 70-95%, com banhos de 15 minutos e transferidas para resina de embebição, onde permaneceram por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e o material foi seccionado em 6 µm de espessura.

As lâminas secas contendo as secções foram colocadas em solução de sulfeto de amônia 1% por 5 minutos para diferenciação da ATPase, coradas com Hematoxilina por 10 minutos, secas e montadas com Bálsamo do Canadá.

III.2.1.3. Análise Citoquímica

Para a realização das duas técnicas a seguir, as glândulas salivares foram fixadas em mistura de álcool e ácido acético na proporção 3:1 por 12 minutos, desidratadas em banhos de 15 minutos cada nos álcoois 70-95% e incluídas em resina Leica. As secções com 5µm de espessura foram colocadas sobre lâminas de vidro.

III.2.1.3.1. Reação de Feulgen (Segundo FEULGEN; ROSSENBECK, 1924)

As lâminas contendo as secções permaneceram por 11 minutos em solução de HCl 1N (60°C), foram lavadas em água destilada e submetidas ao reativo de Schiff por uma hora. Os cortes foram contra-corados com eosina durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas e montadas em Bálsamo do Canadá, para posterior observação e documentação fotográfica.

III.2.1.3.2. Técnica de Azul do Toluidina (Segundo MELLO; VIDAL, 1980)

As lâminas permaneceram em solução de Azul de Toluidina 0,025% em tampão McIlvane (pH 4.0) durante 20 minutos à temperatura ambiente, foram lavadas

rapidamente em água destilada e montadas em Permount para análise e documentação fotográfica.

III.2.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

III.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

As glândulas salivares foram fixadas em solução de Karnovsky por 24h e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (70-100%) por 5 minutos cada. O material foi levado ao ponto crítico, colado em suporte de alumínio, onde recebeu banho de ouro, e posteriormente, foi examinado ao Microscópio Eletrônico de Varredura PHILLIPS 505 SEM.

III.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

III.2.2.2.1. Análise Morfológica (Rotina)

As glândulas salivares das fêmeas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 24 horas, à 4°C. A seguir, passaram por duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio 1% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 2 horas, à temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, o material passou por mais duas lavagens de 15 minutos cada em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M e foi contrastado em solução de acetato de uranila 2% com acetona 10%, por 2 a 4 horas no escuro.

A desidratação foi realizada em série crescente de acetona 50% a 95% e 100% duas vezes, com duração de 5 minutos cada. Logo após, o material permaneceu em mistura de acetona e resina na proporção de 1:1 onde permaneceu por 12 horas. O material foi incluído em resina pura com catalisador e colocado em estufa à 60°C por um período de 48 horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo. Os cortes foram coletados em grades de cobre e

passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. As grades foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILLIPS 100 TEM para documentação.

III.2.2.2.2. Análise Citoquímica para localização da Fosfatase Ácida (Segundo modificação de RYDER; BOWEN, 1975)

As glândulas salivares, depois de retiradas, foram fixadas durante 1 hora, à 4°C, em solução de glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2). A seguir, o material foi rapidamente lavado em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 4.8) e incubado por 2 horas, à temperatura ambiente, em meio contendo: A) paranitrofenilfosfato (5mg) e B) tampão acetato de sódio (10mL, 0,05 M, pH 4.8) e acetato de chumbo (5mg). Para a preparação deste meio, primeiramente dissolveu-se o acetato de chumbo no tampão acetato de sódio (B), e na sequência acrescentou-se B a A. O controle foi feito excluindo-se o substrato (p-nitrofenilfosfato) do meio de incubação.

Após a incubação, o material foi lavado por 30 minutos, a 4°C, em tampão cacodilato de sódio (pH 7.2) e, a seguir, permaneceu por 1 hora, a 4°C, em tetróxido de ósmio de Millonig. O material foi desidratado em série crescente de acetona (50% - 100%) de 5 minutos cada, embebido em mistura de resina e acetona durante à noite e, posteriormente, em resina pura (Epon+DDSA_Araldite). A inclusão foi realizada em resina pura e catalisador.

Após a inclusão, seccionou-se o material em ultra-micrótomo, coletou-se em grades de cobre e observou-se ao Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILLIPS 100 TEM para documentação fotográfica.

Resultados

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados na forma de artigos, os quais foram submetidos e publicados em revistas especializadas, onde:

Capítulo 1: “Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae)”. Artigo publicado em 2005 na *Micron*, 36: 437-447.

Capítulo 2: “Structural and cytochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding”. Artigo submetido à *Veterinary Parasitology*.

Capítulo 3: “Ultrastructural comparison of female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during feeding: cell death features at semi-engorged stage”. Artigo submetido à *The Veterinary Journal*.

Capítulo 4: “Acid phosphatase and ATPase activities in female cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during the feeding period”. Artigo aceito na *Experimental Parasitology*.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

TITLE: Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae).

AUTHORS: Erika Takagi Nunes¹, Gervásio Henrique Bechara², Kelly Cristina Saito¹, Sandra Eloisi Denardi¹, Patrícia Rosa de Oliveira¹ and Maria Izabel Camargo Mathias¹.

¹. Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24^A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19)3526-4136.

². Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP – Jaboticabal, S.P.- Brazil.

Periódico: *Micron*, v. 36, p. 437-447, 2005.

RESUMO

O presente estudo descreve a morfologia e a ultra-estrutura das glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os ácinos que compõem estas glândulas, neste estágio específico de alimentação, demonstram células que caracterizam o processo degenerativo das glândulas salivares, como: citoplasma vacuolizado, cromatina condensada, núcleos fragmentados e presença de corpos apoptóticos. Além disto, foi detectada, no interior destes órgãos, a presença de microrganismos com morfologia típica de protozoário.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; carrapato-do-boi; glândulas salivares; histologia; histoquímica; ultra-estrutura; apoptose.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

TITLE: Structural and cytochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari:Ixodidae) tick female during feeding

AUTHORS: Erika Takagi Nunes¹, Maria Izabel Camargo Mathias¹ and Gervásio Henrique Bechara²

¹. Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24^A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19)3526-4136.

². Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP – Jaboticabal, S.P.- Brazil.

Send the proofs to the first author (E-mail: erikatnunes@yahoo.com.br)

RESUMO

Este estudo descreve a morfologia das glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em início de alimentação (24-48 horas de infestação) e semi-ingurgitadas (4 a 5 dias de infestação) a fim de verificar as características degenerativas deste órgão e a fase do ciclo secretor em que o processo se inicia. No primeiro caso, as glândulas salivares apresentaram-se preservadas com os três tipos de ácinos (I, II e III) sendo individualizados. Grânulos de secreção foram observados apenas no citoplasma das células **b**, **c₁**, **c₂**, **c₄** (ácino tipo II) e **d** (ácino tipo III), bem como núcleos grandes com morfologia regular e preservada. Nas fêmeas semi-ingurgitadas os ácinos apresentaram raras células íntegras, poucas semi-preservadas e as restantes em diversos estágios de degeneração, ou seja, com retração e vacuolização citoplasmática e núcleos com cromatina em diferentes graus de condensação, picnóticos e/ou em fragmentação. Nos ácinos tipo I e nos ductos excretores das glândulas estudadas não foram observadas características degenerativas. Nas fêmeas de *R. (B.) microplus*, as glândulas salivares degeneram assincrônica e precocemente quando comparadas a outras espécies de carrapatos.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – carrapato-do-boi– glândulas salivares – histologia – histoquímica – citoquímica– degeneração- morte celular- apoptose.

ABSTRACT

This study describes the morphology of salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* female ticks at beginning of feeding (24-48 hours of attachment) and semi-engorged (4-5 days of attachment) to verify the degenerative characteristics of these organs and the secretory phase in which the process begins. At beginning of feeding, secretion granules had been observed only in the cytoplasm

of cells **b**, **c₁**, **c₂**, **c₄** (type II acinus) and **d** (type III acinus), as well as large nuclei with regular and preserved morphology. In the semi-engorged females the acini presented rare normal cells, few partially preserved ones, and the remaining ones in several stages of degeneration, that is, with retraction and cytoplasmic vacuolization, and nuclei with chromatin in several stages of condensation, picnotic and/or in fragmentation. In type I acinus and in the excretory ducts of the studied glands, at both feeding stages, it was not observed any degenerative characteristic. In females of *R. (B.) microplus*, the salivary glands degenerate asynchronously and precociously when compared to those of other tick species.

KEY WORDS: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – cattle-tick – salivary glands – histology – histochemistry – cytochemistry– degeneration- cell death- apoptosis.

INTRODUCTION

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, synonymy of *Boophilus microplus* (Murrel & Barker, 2003) is the major bovine ectoparasite in Brazil and it is one of the principal causes of the great economical losses to cattle breeding. Blood diseases, bite stress, allergic reactions to the tick's saliva, hide damage, infection with *Babesia* and *Anaplasma*, anorexia and death are all consequences of the tick parasitism (Brossard & Wikel, 1997).

Salivary glands and their secretions play a vital role during tick-host interaction since they are organs responsible for the tick fluid homeostasis, and for the secretion of molecules with pharmacological properties that evade the host defense mechanisms (Ribeiro, 1995). Moreover, they are also the main transmission route for pathogenic organisms (Sauer et al., 1995; Nunes et al., 2005).

These organs present functional and structural changes, which are determined by the physiological stage of the tick. Thus, they show during the pre-fixation phase massive acini, secretory cells with granules of cytoplasmic secretion and large nuclei (Schumaker & Serra-Freire, 1991), following afterwards a gradual regression with morphological and structural changes including autolysis (Fawcett et al., 1986).

According to studies accomplished by Till (1961), as soon the engorgement phase is completed the salivary glands of ticks suffer a reduction of size (in argasids) or they degenerate (in ixodids), however, the knowledge concerning how these changes happen in their life-cycle is still scarce.

Despite of the knowledge regarding the function of the salivary glands, few studies were performed, especially those ones focusing specifically in the changes that happen during the secretory cycle of *R. (B.) microplus*. Recently, Nunes et al. (2005) affirmed that salivary glands of *R. (B.) microplus* female ticks already show degenerative process at semi-engorged stage. Hence, the object of present work is to verify the possible morphological alterations that point the degenerative process in

the salivary glands of females of this tick species during the early feeding stage and when they are semi-engorged to presume the feeding-point that this event starts.

MATERIAL AND METHODS

Forty adult females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks parasitizing *Bos taurus* cattle at the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences / UNESP – Jaboticabal, S.P., Brazil, being 20 at early stage of feeding and 20 semi-engorged ones have been used for this work. In this study, we considered females at the beginning of feeding stage (24-48 hours of attachment) those whose weigh was lower than 0.03g, and partially fed (4-5 days of attachment) whose weigh was around 0.13g ad 0.25g. Equipment in the Histology Laboratory of the Biology Department at the Bioscience Institute, UNESP – Rio Claro, SP, Brazil, was utilized throughout the study.

The salivary glands of individual ticks kept at refrigeration (4°C) for thermal shock anesthesia were removed in saline solution (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L and KH₂PO₄ 2.72 g/L; pH 7.2) and utilized in the following techniques:

-Scanning Electron Microscopy (SEM)

The salivary glands were fixed in Karnovsky solution for 24h and dehydrated in a graded 70-100% acetone series. The material was processed by critical point drying, sputtered with gold and examined in a PHILLIPS 505 SEM.

-Stain Exclusion Technique

The salivary glands were kept in stain (0.001g of Nile blue stain in 10mL of saline solution) for 30 minutes, at room temperature. Afterwards, they were washed in distilled water twice, fixed in 9:1 v/v mixture of 10% neutral buffered formalin and acetone for one hour and thirty minutes and then, they were set with glycerinated gel.

-General Morphology

The salivary glands were fixed in 9:1 v/v mixture of 10% neutral buffered formalin and acetone (pH 7-7.4) at 4°C for one hour and thirty minutes, and then dehydrated in a graded 70-95% ethanol series. The inclusion was performed in Leica resin and the polymerized blocks were sectioned with a dry glass knife. The sections of 5µm thickness were collected and placed afterwards on glass slides and stained with Hematoxylin and Eosin.

For the following two techniques, the glands were fixed in alcohol and acetic acid in the proportion of 3:1 for 12 minutes, then dehydrated and embedded in resin.

-Cytochemical Techniques

Feulgen Reaction: The slides were kept at HCl 1N (60°C) solution for 11 minutes, then washed in distilled water and submitted to Schiff reactive for one hour in darkness. The slides were counter-stained with Eosin for 5 minutes.

Toluidine Blue Technique: The slides were kept in 0.025% Toluidine Blue solution in McIlvane buffer (pH 4.0) for 20 minutes; afterwards, on they were washed in distilled water and set in Permount.

The material obtained for the light microscopy techniques was analyzed and photographed in a Zeiss photomicroscope.

RESULTS

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The employment of SEM technique has shown that the salivary glands of semi engorged females are significantly larger when compared to the glands of those at beginning of feeding stage (Figs. 1A, 1B).

It is possible to observe details of superficial alterations of granular acini (larger ones) of the glands in semi-engorged specimens (Fig. 1B), which present folds and/or re-entrance. These irregularities are not observed in acini of glands from females at beginning of feeding stage, once these keep their homogeneous aspect (Fig. 1A). The type I acini and the excretory ducts from individuals at both feeding stages present themselves preserved.

Stain Exclusion Technique

The application of such technique demonstrates that the acini of salivary glands of individuals at both feeding stages react differently to the stain (Figs. 1C, D, E and F).

In females at the beginning of feeding the majority of acini is efficient for the stain exclusion, suggesting that the most part of their cells are active and/or in early stage of degeneration showing a more transparent aspect when compared to semi-engorged females (Figs. 1C, D).

In the semi-engorged stage, some acini of the salivary glands exclude the stain (Fig. 1E) while others retain it displaying it as blue granules as shown the detail in the Figure 1F, demonstrating the asynchrony of cell activity among the different acini along the process. In addition, inside the same acini, there are cells with a larger accumulation of stain (Fig. 1F), showing that different cells vary in the ability of its exclusion, that is, among the active ones there are others whose membrane ion bomb probably are not functioning any longer.

Histology of the Salivary Glands

By using the Hematoxylin-Eosin technique it was possible to identify the three types of acini in salivary glands of early feeding stage individuals (Figs. 2A, B, C and D).

The type I acini (agranular) do not show characteristics of cell degeneration in the two feeding stages here studied. The cell's cytoplasm presents a fine

granulation and the nuclei, inherent and some located at the periphery present a round morphology with non-condensed chromatin (Figs. 2A, E).

At the beginning of feeding stage, the presence of secretion granules in the cytoplasm of cells **b**, **c₁**, **c₂** and **c₄** (type II acini) and **d** (type III acini), made possible the identification of these different types of cells (Figs. 2B, C, and D). The nuclei of these cells, despite their integrality and disperses chromatin, which are indicative of activity, suffer size increase. In **c₂** cells, the granules present their central part more strongly stained by eosin being probably at early stage of maturation (Fig. 2C).

In semi-engorged females, there are partially preserved acini with some cells with evident granulation, coexisting with others cells in degeneration that are characterized by the presence of nuclei showing a range of alterations that goes from little morphological ones to completely picnotic nuclei and/or fragmented ones (Figs. 2F-K).

Among the semi-preserved type II acini, it is still possible to identify the cells: **a**, **b**, **c₂** and **c₃**. The **a** cells present secretion, but not in granules, and picnotic nuclei (Fig. 2F). There is a huge quantity of dispersing granules in the cytoplasm of the **b** cells and the nuclei of them are irregular with extremely condensed chromatin and in beginning of the fragmentation process (Fig. 2G). The apical portion of **c₂** cells has a concentration of smaller and matured birefringent granules; the nuclei are irregular and with disperse chromatin (Fig. 2H). The **c₃** cells, still full with secretion granules of several sizes, however smaller than those ones in **c₂** cells, present very dilated and irregular nuclei with non-condensed chromatin (Fig. 2F). Together with the anterior cell types above described, cells without secretion granules are observed in the same acini, whose nuclei can be dilated, irregular and/or picnotic and which now cannot be identified.

In the salivary glands of semi-engorged females, some partially preserved type III acini are presented. Their **d** cells are small, located close to the excretory duct and containing only remains of secretion; there is nuclear picnosis. The **f** cells, larger than the **d** ones, have in the cytoplasm a finely granular material also observed in the lumen of the acinus; their nuclei appear to be preserved. Among the secretory cells of the type III acinus, interstitial epithelial cells whose apical portion is projected

towards the lumen of the acinus are observed. Together, epithelial and secretory cells delimitate a wide lumen (Fig. 2I).

In the semi-engorged stage, there are acini that cannot be identified due to the degeneration and consequent absence of granulation. They present cells with irregular nuclei and in fragmentation process (Fig. 2J). Others, at more advanced stages of degeneration, exhibit extensive cytoplasmic retraction areas and intensive vacuolization. Preserved nuclei are no longer observed (Fig. 2K).

Cytochemistry of Salivary Glands

The Feulgen and Toluidine Blue cytochemical techniques show details of the structural organization regarding the nuclei of cells that comprise the acini types I, II, and III (Figure 3).

The Toluidine Blue staining shows that the nuclei of all the cells of the three acini types of *R. (B.) microplus* salivary glands are orthochromatic ones, that is, they present blue staining independently of the feeding stage.

In the salivary glands from females at the beginning of feeding stage, the nuclei of secretory cells are large and, most of the times, they showed a preserved morphology, mainly the types I and II acini (Figs. 3A, B, C and D). Cells with smaller nuclei and little dilated besides the evidenced nucleoli are also observed in the acinus II (Fig. 3C). In the type III acinus the nuclei assume a flattened shape and presenting a lower blue-staining. Few cells in region of the insertion of the acinar ductule have irregular, smaller and condensed nuclei, however they are orthochromatic ones (Figs. 3E and F).

In semi-engorged female glands, all the type I acini and some of type II and III find themselves partially preserved containing secretory cells with very dilated and orthochromatic nuclei (Figs. 3G, H, I and J). In the type I acini, the nuclei are spherical (Figs. 3G, H) while some cells of the types II and III acini present irregular nuclei and an evidenced nucleoli (Figs. 3I, J). However, several types II and III acini present cells with degeneration characteristics where the chromatin are more condensed and in a marginalization process, surrounding the nuclear envelope, or in

fragmentation (Figs. 3K, L). In some acini, the total degeneration is observed remaining only few nuclear fragments among the retracted and vacuolated cytoplasmic mass (Figs. 3M, N).

FIGURES

FIGURE 1:

SEM and total set of female's salivary glands belonging to the species *R. (B.) microplus*. **A.** General aspect in individuals at the beginning of feeding-stage. **B.** General aspect in semi-engorged individuals showing the alterations at the surface of the granular acini (**ga**). **C-F.** Total set and the staining by Stain Exclusion Technique using Nile blue. **C. D.** Females at the beginning feeding-stage **E. F.** Semi-engorged females.

a=acinus, **I**= type I acinus, **ad**= acinar ductule, **id**= intermediate duct, **ecd**= excretory common duct.

Bars: **A-B**= 1mm , **C-E**= 10µm, **D-F**=20µm

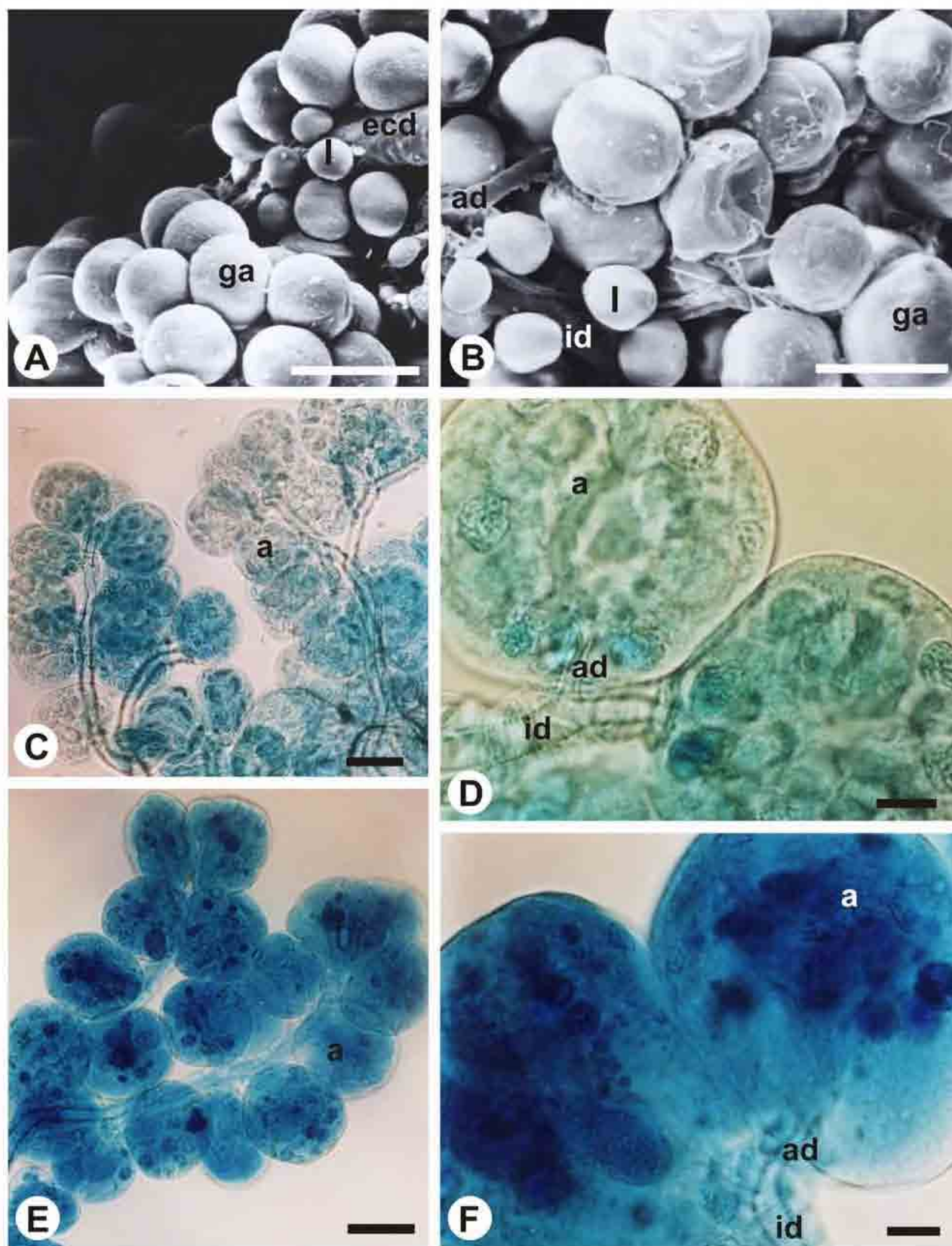


FIGURE 2:

Histological sections of the acini **I, II, III** of salivary glands of *R. (B.) microplus* females **A-D**. Females at beginning of feeding-stage. Note the presence of granules of secretion in the cells (**b**, **c₁**, **c₂** and **d**) and dilated nuclei (**dn**), however with regular morphology still. **E-K**. Semi-engorged females evidencing in: **E, H** and **I**, nuclei with regular morphology (**n**); **F, G, H** and **I**, picnotic nuclei (**pn**); **J**, nuclei in fragmentation process (**fn**) and in **K**, cytoplasmic vacuolization (**v**). **F-I**. Semi-preserved cells with granules of secretion (**b**, **c₂**, **c₃** e **f**), **a** cells and **d** cells with secretion remains and **f** cell with finely granular material.

ed= excretory duct, **ec**= interstitial epithelial cells, **lu**= lumen. H-E Stain.

Bars:A-K=20µm

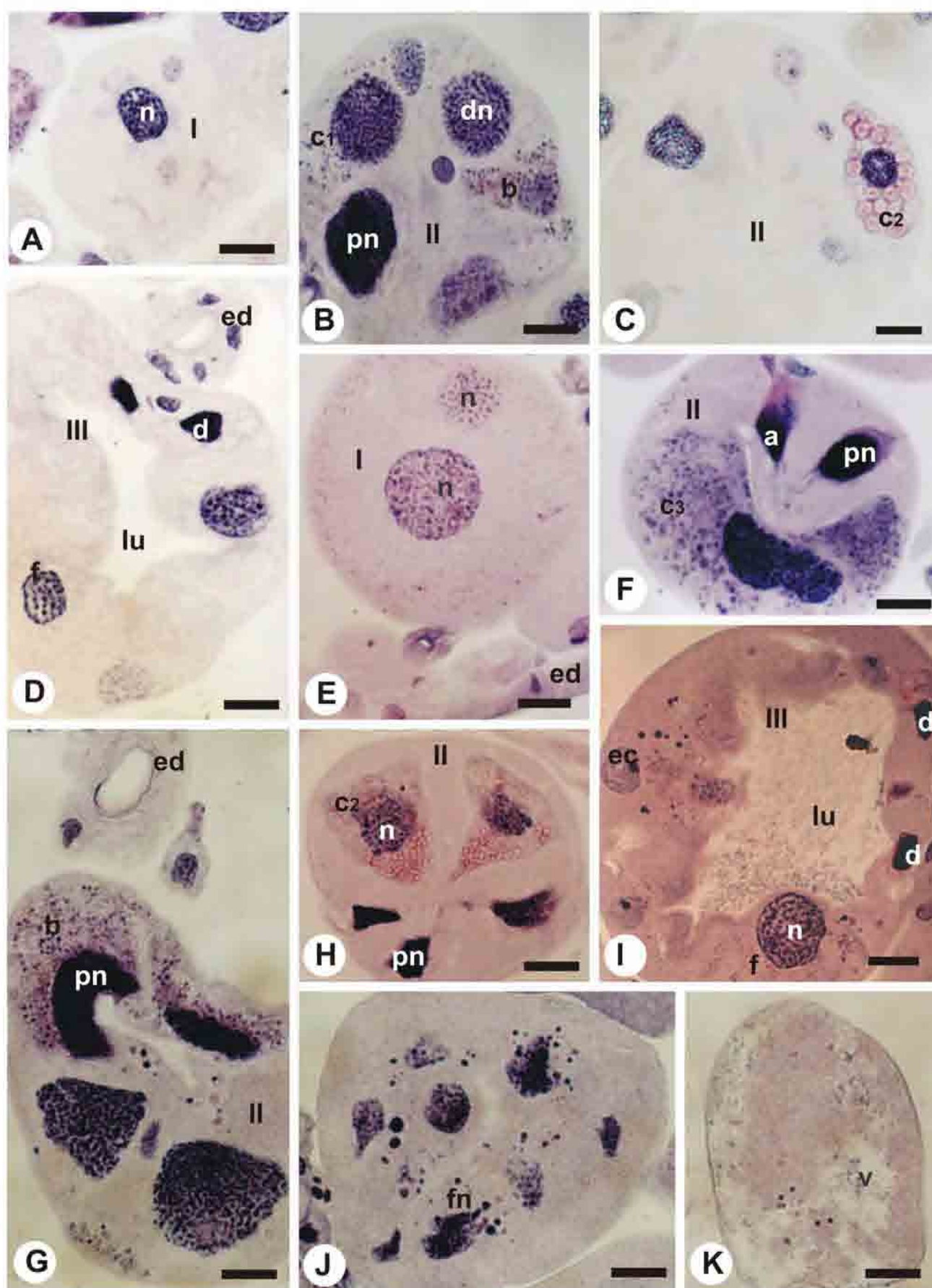
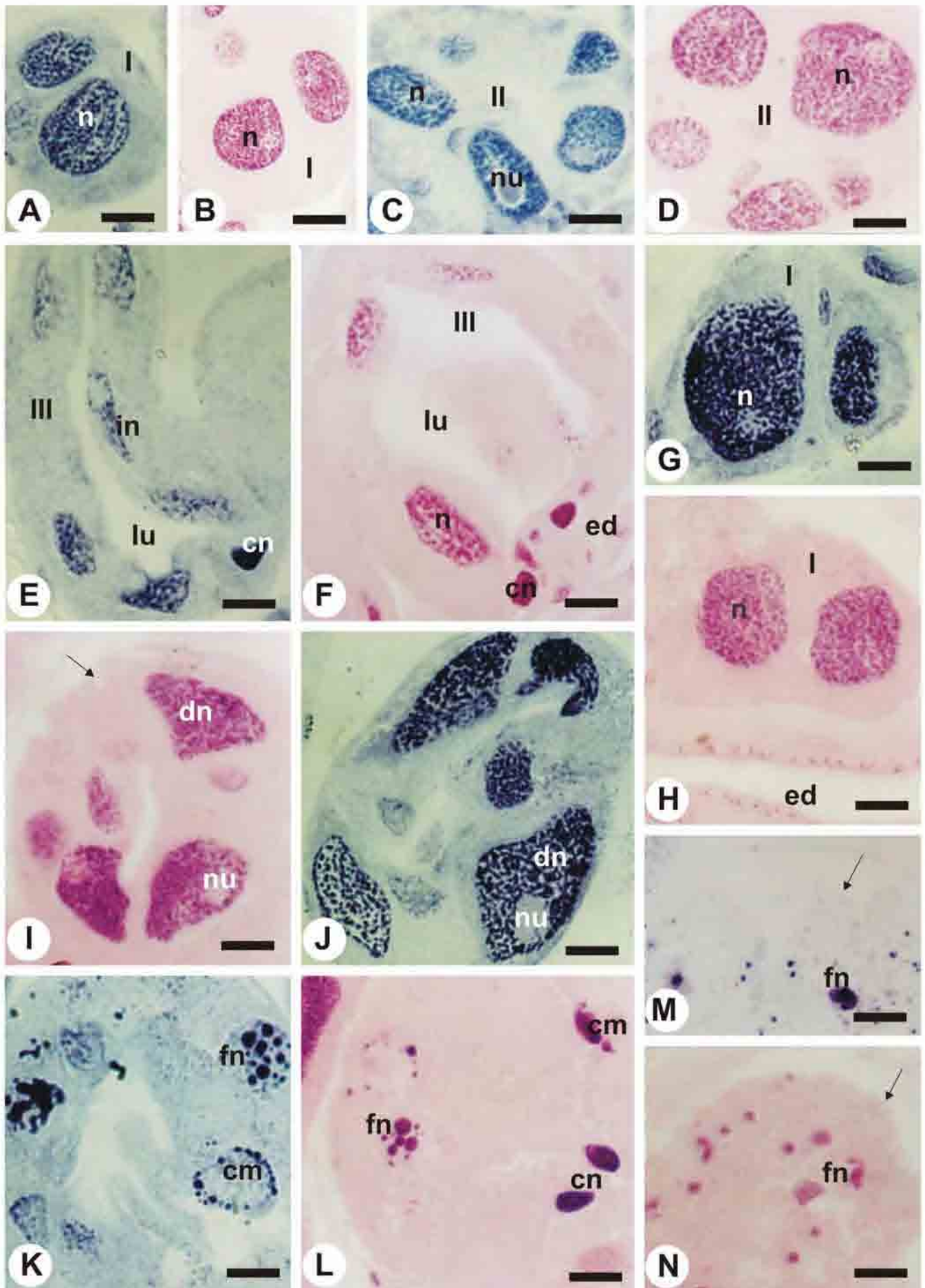


FIGURE 3:

Histological sections of salivary glands of *R. (B.) microplus* females stained by Toluidine Blue and submitted to the Feulgen reaction. **A -F.** Females at beginning of feeding-stage. Note the presence of dilated nuclei, however with regular morphology still (**n**) in **A** and **B** (type **I** acinus) and in **C** and **D** (type **II** acinus). In **E** and **F**, type **III** acinus demonstrating cells with irregular nuclei (**in**) delimiting a larger lumen (**lu**). **G-N.** Semi-engorged females. **G-H.** Type I acini with cells without morphological alterations. **I-J.** Partially preserved acini II, with cells of irregular nuclei, dilated (**dn**) and evident nucleolus (**nu**). **K-L.** Cells under degeneration presenting chromatinic marginalization (**cm**), fragmented (**fn**) and condensed nuclei (**cn**). **M-N.** Acini with cells at advanced stages of degeneration, where can be observed the cytoplasmic retraction (**arrow**) and fragments of nuclei (**fn**), **ed**=excretory duct.

Bars: A-N=20µm.



DISCUSSION

The morphological, cytochemical and histochemical analyzes here performed demonstrated that the salivary glands of females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* are organs that pass through great modifications during the feeding period in the host.

The SEM technique has shown that the type I acini of *R. (B.) microplus* possess a smaller size when compared to type II and III acini, as mentioned in the literature (Binnington, 1978). The histological results corroborate with the ones anteriorly found by Binnington (1978) for the same species, which observed in type I acini the presence of central cell with a large nucleus and other peripheral cells with fibrillar cytoplasm without granules of secretion and smaller nuclei. Furthermore, according to this author, there was detected no morphological change during the entire period of feeding. In an opposite way, Barker et al. (1984) and Needham et al. (1983), in studies performed with salivary glands of *Amblyomma americanum* observed significative changes in the diameter of type I acini during the feeding of ticks.

In granular acini (types II and III) of glands from females of *R. (B.) microplus* at beginning of feeding stage, it was possible to identify some cells (**b**, **c₁**, **c₂**, **c₄**, and **d**) according to Binnington (1978) classification who worked with the same tick species and described the different sizes and histochemical properties of the granules of each cell type. This author affirmed that after approximately 72 hours of feeding, the type II and III acini suffer remarkable changes such as reduction (**a** cell) and/or size improvement of the cell, loss of cytoplasmic granulation and nuclear morphology alteration. Likewise the **a** cell (type II acinus) the cells **d** and **e** (type III acinus), anteriorly with pyramidal form and full of granules, become flattened forming a fine lay of cells around the wide lumen. In females at beginning of feeding stage here studied similar morphological results were found, although in a lower time of attachment, as well as in some partially preserved acini from those semi-engorged females.

Beyond these characteristics, in the present study, the **a** and **d** cells have presented nuclei with condensed chromatin pointing a possible and precocious loss of function related according to Chinery (1973) to the cement production during the first hours of fixation.

In our laboratory, we verified that the **d**, **e** and **f** cells of type III acinus present replete of secretion granules in the salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* females at two days of feeding (Furquim, personal communication), unlike the results found to *R. (B.) microplus* who had already lost all of these cells granulation at both stages here studied.

The presence of interstitial epithelial cells associated to the granular acini in *R. (B.) microplus* had been already observed by Binnington (1978) and also for the species *Dermacentor andersoni* (Meredith & Kaufman, 1973) and *A. cajennense* (Serra-Freire & Olivieri, 1992); these ones would be involved in the control of water and ions concentration in the individual during the engorgement process. Thus, they were developed and could be observed in the semi-engorged females in the species here studied.

The several studies regarding salivary glands of ticks accomplished by different authors have been mainly focusing on the question concerning the degeneration process, in attempt to a better understanding of the physiology of such organs.

Walker et al., in 1985, studied the structural changes that happen in salivary glands of *R. appendiculatus* during the feeding process and they verified that the autolysis of all acini began in the detachment moment of the tick from its host.

L'Amoreaux et al. (2003) studying the salivary glands of *D. variabilis* in the searching for programmed cell death characteristics have observed that on the third day after the detachment of the individuals from their host, there were not signs of nuclear fragmentation in the cells of the different acini, however, on the fifth day, the apoptotic cells were already detected and the type III acinus was the most affected one. This work with females of *R. (B.) microplus* has demonstrated also a higher quantity of type III acini on degeneration process corroborating the results with the ones found to *D. variabilis*.

In front of the available data on the literature regarding ixodids, the present study brings unpublished results that show when begins the process of degeneration of the salivary glands in *R. (B.) microplus*. The females with 4-5 days of attachment show already signals of cell death in these structures before even the ticks' detachment from their host. However, the literature regarding the ixodids in general affirms that the process of degeneration only starts after the tick engorgement and consequent detachment. Some authors that investigated the physiology of ixodids salivary glands suggest that there was no significative difference in the time of degeneration of these structures in the genus *Amblyomma* and *Dermacentor* (Kaufman, 1976). This present study allows us to verify the existence of temporal variations regarding the beginning as well as the length of this event and the fact that they are specific-species.

According to L'Amoreaux et al. (2003) on 33rd day after the detachment of the tick, that is at the end of the oviposition period, the salivary gland was totally degenerated being possible to observe the nuclei of excretory ducts cells and some apoptotic nuclei probably from the cells of type I acini.

Studies performed by Harris & Kaufman (1984) has shown that salivary glands of semi-engorged females of *A. hebraeum* are able to degenerate in a period of between 24 - 48 hours if they are removed from the host after they had reached a "critical weight" (approximately 300 mg for this species). However, according to Kaufman & Lomas (1996), this process probably begins after the detachment of the tick. Other authors, although, registered that the salivary glands would degenerate only when the females reached the replete weight (and not the critical one) and this event would be completed in a period of four days after the detachment of the tick from its host (Sauer et al., 2000).

Based on the terminology "critical weight" adopted by Harris & Kaufman (1984) the present study with semi-engorged females of *R. (B.) microplus*, demonstrates that in this tick species the weight varies around 130 to 250 mg. Besides, according to Lomas & Kaufman (1992) a protein in the spermatophore transferred to the female during the copulation hastening the secretion of hormonal ecdysteroid which is responsible for salivary gland degeneration. Thus, at this feeding stage,

probably the females had already mated and this event would have stimulated the start of the degeneration process of the salivary glands.

The application of Feulgen reaction in glands removed from females of *R. (B.) microplus* at both feeding stages has evidenced some cells with nuclei presenting compacted chromatin, especially those already in degeneration process. These same cells when submitted to Toluidine Blue stain, substance that binds to the phosphate groups of DNA, would present metachromatic nuclei, that is, a greenish stain, once the phosphate groups are binded to the histones, therefore, inaccessible to the molecules of the stain. Our results reveal, in an opposite way, the presence of orthochromatic nuclei. Similar results were found in larvae silk glands of *Apis mellifera* by Silva-Zacarin (2003). According to her, a possible DNA cleavage would cause the exposition of the histones which during the fixation process of the material (ethanol: acetic acid) would be extracted, making the phosphate groups available for binding to the stain.

The types of cell death described until the present days involve processes widely studied in insects. It has been demonstrated that in silk glands of bees the process of vacuolization and loss of cytoplasmic volume is started after the releasing of the product of secretion, allowing additionally the observation of the picnotic nuclei (Cruz-Landim & Silva de Moraes, 2000). This process starts at the posterior region and progresses to the anterior region of the gland until it reaches the secretory tubules (Cruz-Landim & Melo, 1981; Silva & Silva de Moraes, 1999). These same characteristics were observed in the tick species here studied, where the degeneration does not happen simultaneously along the entire salivary gland. Furthermore, it makes clear that the granular acini (more distal ones) are the first ones to degenerate and the excretory ducts are the last structures to be reached by the process, corroborating to L'Amoreaux et al. (2003).

Still regarding the insects, an important aspect concerning the mechanism of cell death is the way the cell glands are affected by the process; the cell glands are not affected in the same way nor concomitantly by such process meaning that in the same gland can be present active and inactive cells (Cruz-Landim, 1997; Silva de Moraes, 1998; Cruz-Landim et al., 1999). According to the results here obtained, it is evidenced that in semi-engorged females not all cells of the granular acini incorporate

the Nile blue stain, pointing therefore the functional asynchronism. However, Silva de Moraes (1998) points out that not only living cells exclude the stain, being apoptotic ones at least in initial stages also able to exclude it while membrane ion-bomb are still functioning. According to Bursh et al. (1990) the functional asynchronism happens in cell death via apoptosis where cells respond differently to the degeneration stimulus, coexisting in the same tissue cells at different stage of apoptosis. Such event was observed here in the salivary glands of *R. (B.) microplus* tick females in semi-engorged stage.

Thus, the present work has shown that the degenerative process of salivary glands in females of *R. (B.) microplus* starts precociously if compared to other ixodids described in the literature until now (Vitzhum, 1943; Till, 1961; Walker et al., 1985; Sonenshine, 1991; Kaufman & Lomas, 1996; L'Amoreaux et al., 2003), once such organs begin to loose some of their functions while the ticks are being fed in their host, differently than other species whose degeneration is started posteriorly to the engorgement and detachment from their host.

Based on the degenerative characteristics presented in this work and accepting that the cell death process is part of the ontogenetic development of the individuals, where cells are programmed to be deactivated in determined moments, it is concluded that the degeneration of the salivary glands in tick females would represent a saving of energy for the next activity, that is, the oviposition. This would avoid consequently the investment in maintenance of organs that would have lost practically all their functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been supported by FAPESP (grants 02/10149-7 and 04/03252-1). The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Ronaldo Del Vecchio, Cristiane Marcia Mileo and Monika Iamonte for the technical support, and Karim C. Furquim for providing valuable comments. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne

Diseases (ICTTD-3) supported by the European Union under contract number 510561-INCO.

REFERENCES

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

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

BROSSARD, M., WIKEL, S. K. 1997. Immunology of interactions between ticks and host. *Med. Vet. Entomol.*, 11: 270-276.

BURSCH, W., KLEINE, L., TENNISWOOD, M. 1990. Biochemistry of cell death by apoptosis. *Bioch. Cell Biol.*, 68: 1071-1074.

CHINERY, W. A. 1973. The nature and origin of the 'cement' substance at the site of attachment and feeding of adult *Haemaphysalis spinigera* (Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 10: 355-362.

CRUZ-LANDIM, C. 1997. Cell reorganization and cell death during the secretory cycle of the hypopharyngeal gland in Meliponinae bee workers (Hymenoptera: Apidae). *Acta Microscopica*, 6. Supl. B. Proc. XVI Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy, p.75-78.

CRUZ-LANDIM, C., COSTA, R. A. C., SILVA DE MORAES, R. L. M. 1999. Hypopharyngeal gland function, glandular cell senescence and gland reactivation. Proc. 4th. Intern. Hymenopterists Conference .

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

CRUZ- LANDIM, C., MELO, R. A. 1981. Desenvolvimento e envelhecimento de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Aspectos histológicos e histoquímicos. Aciesp, v.31, São Paulo, 118p.

FAWCETT, D. W., BINNINGTON, K. C., VOIGHT, W. R. 1986. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: Sauer, J. R., Hair, J. A. (Eds.) *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Ellis Horwood, Chichester, pp.22-45.

HARRIS, R. A., KAUFMAN, W. R. 1981. Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.*, 27: 241-248.

HARRIS, R. A., KAUFMAN, W. R. 1984. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Exp. Biol.*, 109: 281-290.

KAUFMAN, W. R., LOMAS, L. O. 1996. Male factors in ticks: Their role in feeding and egg development. *Invert. Reprod. Dev.*, 30: 191-198.

KAUFMAN, W. R. 1976. The influence of various factors on fluid secretion by *in vitro* salivary glands of ixodid ticks. *Journal of Experimental Biology*, 64: 727-742.

L'AMOREAUX, W. J.; JUNAID, L., TREVIDI, S. 2003. Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. *Tissue and Cell*, 35: 95-99.

- LOMAS, L. O., KAUFMAN, W. R. 1992. An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 21: 169-178.
- MEREDITH, J., KAUFMAN, W. R. 1973. A proposed site of fluid secretion in the salivary gland of the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. *Parasitology*, 67: 205-217.
- MURREL, A., BARKER, S. C. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172.
- NEEDHAM, G. R., GREENWALD, L., FRED, T. J., COONS, L. B. 1983. The ultrastructure of the tick (*Amblyomma americanum*) salivary gland acini responsible for secretion of the hygroscopic fluid and localization of $\text{Na}^+ / \text{K}^+ = \text{ATPase}$. *Am. Zool.*, 23, p.1013.
- NUNES, E. T., BECHARA, G. H., SAITO, K. C., DENARDI, S. E., CAMARGO-MATHIAS, M. I. C. 2005. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). *Micron*, 36:437-447.
- RIBEIRO, J. M.C. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infectious Agents and Disease*, 4: 143-152.
- SAUER, J. R., McSWAIN, J. L., BOWMAN, A. S., ESSENBERG, R. C. 1995. Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*, 40: 245-267.
- SAUER, J. R., ESSENBERG, R. C., BOWMAN, A. S. 2000. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1069-1078.

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

SERRA-FREIRE, N. M., OLIVIERI, J. A. 1992. Estádio adulto do ciclo de *Amblyomma cajennense*. *Arq. Fac.*, 20: 224-234.

SILVA, E. C. M., SILVA DE MORAES, R. L. M. 1999. Silk gland degeneration of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Acta Microscopica* 8 (Suppl B): 93.

SILVA DE MORAES, R. L. M. 1998. Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 97p.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. 2003. Estudo morfológico e da expressão gênica no processo degenerativo das glândulas de seda de larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 150pp.

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

TILL, W. M. 1961. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Mem. Entomol. Soc. South. African.* 6: 1-124.

VITZHUM, H. G. 1943. Acarina. In: Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreiches, 5: IV. Abt., 5. Buch. Leipzig, Becker u. Erler.

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

Capítulo 3

CAPÍTULO 3

TITLE: Ultrastructural comparison of female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during feeding: cell death features at semi-engorged stage.

AUTHORS: Erika Takagi Nunes¹, Maria Izabel Camargo Mathias¹ and Gervásio Henrique Bechara²

¹. Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24^A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19)3526-4136.

². Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP – Jaboticabal, S.P.- Brazil.

Send the proofs to the first author (E-mail: erikatnunes@yahoo.com.br)

RESUMO

As glândulas salivares dos carrapatos ixodídeos passam por mudanças marcantes durante o período em que estes se alimentam no hospedeiro. O presente trabalho apresenta as características ultra-estruturais das glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os eventos celulares que ocorrem nos diferentes ácinos durante a alimentação. Nesta espécie, os indivíduos em início de alimentação apresentam: ácinos tipo I com grande quantidade de mitocôndrias e imenso labirinto basal nas células periféricas; grânulos de secreção glicoproteicos somente nas células **b** e **c₃** dos ácinos tipo II, tendo as demais perdido a atividade secretora; células epiteliais intersticiais com labirinto basal desenvolvido entre as células **f**, ocupando grande parte do ácino III; e detalhes da estrutura dos ductos excretores. Nas fêmeas semi-ingurgitadas, a maioria das células encontra-se em processo de morte celular, sendo observados no citoplasma muitos vacúolos autofágicos, lisossomos e figuras mielínicas e núcleos irregulares com condensação cromatínica, formação de *blebs* e fragmentação, além de corpos apoptóticos de tamanhos diversos. Nas fêmeas desta espécie, a morte celular programada é observada tanto nos ácinos como nos ductos das glândulas salivares, antes mesmo do desprendimento do carrapato de seu hospedeiro, contrariando o que é descrito na literatura para as outras espécies.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – carrapato-do-boi – glândulas salivares – ultra-estrutura – morte celular – apoptose.

ABSTRACT

The salivary glands of the ixodids ticks pass by outstanding changes during the feeding period on the host. The present work shows the ultrastructural characteristics of the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females

and the cellular events that occur in the different acini during the tick feeding. In this tick species, the individuals at beginning of feeding present: type I acini with large amount of mitochondria and a wide basal labyrinth in the peripheral cells; glycoprotein secretion granules only in the **b** and **c**₃ cells of the type II acini having the others lost the secretory activity; epithelial interstitial cells with developed basal labyrinth between the **f** cells occupying large part of the type III acini; and structural details of the excretory ducts. In the semi-engorged females, the majority of the cells is in cell death process being observed many autophagic vacuoles, lysosomes and myelin figures in the cytoplasm and irregular nuclei with chromatin condensation, blebs formation and fragmentation besides apoptotic bodies of several sizes. In the females of this species the programmed cell death is observed in the acini as much as in the ducts of the salivary glands before the tick detachment from the host, contradicting what is described in the literature to the others tick species.

KEY WORDS: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – cattle-tick – salivary glands – ultrastructure – cell death – apoptosis.

INTRODUCTION

Among species belonging to the Ixodidae, the species *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, synonymy of *Boophilus microplus* (Murrel & Barker, 2003) is the major bovine ectoparasite and has a great veterinary importance due its capacity of transmitting diseases and causing economical losses.

The salivary glands of female ixodids ticks are important organs that perform several vital functions which facilitate tick feeding and osmoregulation (Sauer et al., 1995).

These organs are paired structures and comprised the types I, II and III acini in female. The first one maintains the tick hydration while off-host (Needham et al., 1990), the types II and III, contain secretion granules and interstitial cells with ultrastructural characteristics of fluid-transporting cells (Coons & L'Amoreaux, 1986). One of their major functions is to secrete excess fluid from the blood meal back to the host, resulting in a concentrated meal and regulated hemolymph volume (Mao & Kaufman, 1999).

According to Weiss & Kaufman (2004), most adult female ixodid ticks require 6-10 days to engorge fully. The feeding cycle consists of three phases: a preparatory phase (1-2 days), during which the female establishes a feeding lesion and secretes a cement-like cone to attach the host's skin; a slow phase (4-7 days) during which the female feeds to 10 times her unfed weight; and a 24-36 h rapid phase, during which female increases her weight a further 10-fold (Balashov, 1972).

Once the ixodid female is replete and detaches from the vertebrate host, the salivary glands are no longer needed (L'Amoreaux et al., 2003), because it will use the blood meal to convert to vitellogenin during ovary development (Coons et al., 1989). According to Harris & Kaufman (1981), reaching the repletion weight these organs begin to degenerate in *Amblyomma hebraeum* female tick and some autophagic vacuoles appear.

The ultrastructure of ixodids salivary glands have been reported by some authors as Coons & Roshdy (1973), Megaw & Beadle (1979), Walker et al. (1985) and Krolak et al. (1982), who studied the tick species *Dermacentor variabilis*,

Boophilus microplus, *R. appendiculatus* and *Amblyomma americanum*, respectively. In spite of these authors have clearly demonstrated the complexity of the glands, none of them described degenerative features in these species during the feeding period.

In recent study with salivary glands from *D. variabilis* replete females, L'Amoreaux et al. (2003) found apoptotic features beginning at day 5th post-detachment, being observed the peak of programmed cell death on day 8th which cells with nuclei containing fragmented DNA were present. These authors suggest that within the Ixodidae the degeneration process occurs at different rates and it is related with the 20-hydroxyecdysone levels in the hemolymph (Harris & Kaufman, 1985; Mao & Kaufman, 1999).

Considering this differential secretory activity among the ixodids ticks species and that rare studies describes the ultrastructural characteristics of *R. (B.) microplus* during its life cycle, this work had as the main objective to describe the cellular events that happen in the acini of the female salivary glands during two different stages of feeding, in the attempt of supposing the moment that these organs begin to degenerate.

MATERIAL AND METHODS

Ten 10 adult females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks parasitizing bovine *Bos taurus* at the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences / UNESP – Jaboticabal, S.P., Brazil, being five at early stages of feeding (24-48 hours of attachment) and five semi-engorged (4-5 days of attachment) ones were used for this work. In this study, we considered females at the beginning of feeding stage those whose weigh was lower than 0.03g, and partially fed whose weigh was around 0.13g and 0.25g. Equipment in the Electron Microscopy Laboratory of the Biology Department at the Bioscience Institute, UNESP – Rio Claro, SP, Brazil, was utilized throughout the study.

Individuals were maintained under refrigeration (4°C) for thermal shock anesthesia and the salivary glands were removed in buffered saline solution (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄ 2.72 g/L, pH 7.2).

The salivary glands were fixed in 2.5% glutaraldehyde fixative solution in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) for 24 hours, at 4°C. Two 15-min washes in cacodylate buffer followed this process. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 2 hours, in the darkness followed by another two 15-min washes in the same buffer. For contrast, the material was immersed in a solution of 2% uranyl acetate in acetone during 2 to 4 hours in the darkness. The dehydration was performed in a graded 50-100% acetone series. Then, the material was embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 hours, included in pure Epon resin and incubated at 60° C for 48 hours. Afterwards, polymerized ultrathin sections were obtained with ultramicrotome and stained with Azur II (1%) and Methylene Blue (1%).

Grids containing ultrathin sections of the material were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for 45 minutes and 10 minutes, respectively. Then, they were analysed and photographed in a PHILLIPS TEM 100 Transmission Electron Microscopy.

RESULTS

The ultrastructural characteristics of the acinar cells of females *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* salivary glands at beginning of feeding and semi-engorged ones were presented in the Tables 1 and 2, respectively, for a better understanding.

In individuals at beginning of feeding just few granule secreting cells of types II (**b** and **c₃** cells) and III acini (**e** and **f** cells) could be identified because most of them had already lost its characteristic granules which allows the cell types classification (**x** and **y** cells are non-identified cells here observed).

In the semi-engorged females, the salivary glands are degenerating which become impossible the identification of the different cellular types. Thus, to the analysis, the ultrastructural characteristics of the cytoplasm were separated according to the cell regions and, the nuclear ones were based in the integrity stages.

Table 1: Ultrastructural characteristics of the salivary glands acinar cells of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females at beginning of feeding.

Organelles		TYPE I ACINUS		TYPE II ACINUS				TYPE III ACINUS		Epithelial	DUCTS	
		rounded central cell	Cubic peripheral cells	b	c	x*	y*	e	f	interstitial cells (present in the types II and III acini)	Cubic epithelial cells	
C Y T O P L A S M	Vacuoles	++ (Fig. 1A)	++ (Fig. 1C)	++ (Figs. 1E, G)	+	+++ (Fig. 1L)	++ (Fig. 1M)	+++ (Fig. 1N)	++ (Fig. 1 O)	+	+	(Fig. R)
	Lysosomes	++ (Fig. 1A)	–	+	–	–	–	++ (Fig. 1N)	–	+	–	(Figs. 1O, P)
	Mitochondria	+	+++ several shapes (Figs. 1B, C)	+	++ several shapes (Figs. 1J, K)	++ (Fig. 1L)	++ several shapes (Fig. 1M)	+	+	++	++	rounded (Fig. R)
	Myelin figures	–	++ (Figs. 1B, C)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Ribosomes	++ (Fig. 1A)	++ (Fig. 1C)	++ (Figs. 1D, E)	+++ (Fig. 1J, K)	+++ (Fig. 1L)	+++ (Fig. 1M)	++ (Fig. 1N)	++ (Fig. 1 O)	++ (Fig. 1P)	++	++ (Fig. S)
	Endoplasmic reticulum	++ vesicular rough	+	+++ vesicular rough (Figs. 1D, E)	+++ rough vesicular/lamellar (Figs. 1I, J, K)	++ vesicular rough (Fig. 1L)	++ vesicular rough (Fig. 1M)	–	–	–	–	+
	Golgi complex	–	–	–	+++ (Figs. 1J, K)	–	+	–	–	–	–	–
	Secretion	–	–	++ glycoprotein granules (Fig. 1D)	+++granules: protein, polysaccahydae, glycoprotein (Figs. 1H - K)	+	++ accumulation of granular substance (Fig. 1M)	–	– or rare glycoprotein granules	–	–	–
	Membrane specialization	–	+++ extensive basal labyrinth (Figs. 1B, C)	–	–	–	–	–	–	–	+++ extensive labyrinth basal (Fig. 1 O)	++ basal ++ apical + lateral (Figs. 1R, S))
N U C L E U S	Shape	round/ oval (Fig. 1A)	round/ oval (Fig. 1B)		round (Fig. 1H)	round (Fig. 1L)	round		oval, irregular limit (Fig. 1 O)	oval (Fig. 1 O)		round/ oval (Fig. 1R)
	Preservation	+++ (Fig. 1A)	+++ (Fig. 1B)		+++ (Figs. 1H, J)	+++ (Fig. 1L)	+++		+++ (Fig. 1 O)	+++ (Fig. 1 O)		+++ (Fig. 1R)
	Chromatin	dispersed (Fig. 1A)	dispersed (Fig. 1B)	not observed	dispersed (Figs. 1H, J)	dispersed (Fig. 1L)	dispersed	not observed	dispersed (Fig. 1 O)	dispersed (Fig. 1 O)		dispersed (Fig. 1R)
	Pores	+++ (Fig. 1A)	+++ (Fig. 1B)		+++ (Fig. 1H)	+++ (Fig. 1L)	+++		+++ (Fig. 1 O)	+		++ (Fig. 1R)
	Nucleoli	not observed	not observed		not observed	not observed	not observed		++ with the granular and fibrillar regions	not observed		not observed
– (absent structure)				++ (present structure; semi-preserved);				x* and y* (observed cells, but of non-identified types)				
+ (rarely present structure; not preserved);				+++ (frequently present structure; preserved)								

Table 2: Ultrastructural characteristics of the acinar cells of semi-engorged female salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Region / Observed Structures		Apical-medial region	Basal-medial region	Epithelial cells of excretory ducts
CYTOSOLASM	Vacuoles	+++ (Figs. 2A-D)	+++ (Figs. 2J, K, M)	+++ (Figs. 2P, Q)
	Lysosomes	+++ (Figs. 2D-F)	++ (Fig. 2K)	—
	Mitochondria	++ (Fig. 2C)	++ (Fig. 2L)	+
	Myelin figures	++ (Fig. 2B)	+++ (Figs. 2M, N)	—
	Ribosomes	+ (Fig. 2A)	+ (Figs. 2L, M)	++ (Fig. 2Q)
	Endoplasmic reticulum	+ (Fig. 2D)	—	+
	Golgi complex	—	—	—
	Secretion	+ accumulation of probable polysacchaydae granules involved by membrane (Fig. 2G)	—	—
	Membrane specialization	++ microvilli and/or — microvilli and/or microvilli retraction + interdigitation in cells contact (Figs. 2H-J)	+ interdigitation in cells contact +++ disorganized basal labyrinth (Figs. 2K, M)	++ microvilli in the apical portion ++ invaginated basal plasmic membrane (Fig. 2P)
	Microfilaments	++ (Fig. 2J)	—	+
Retraction	—	++ (Fig. 2 O)	—	
NUCLEUS	SEMI-PRESERVED	Stage I (Figs. 3A, B)	- round - semi-preserved - a little irregular limits - dispersed chromatin and part adhered to the envelope - envelope pores - evident nucleoli	- irregular limits - condensed chromatin adhered to the inner membrane - blebbing of nuclei parts
		Stage II (Figs. 3C-E)	- irregular limit - chromatin condensation - chromatin adherence to nuclear envelope	- +++ nucleoli (Fig. 3 O)
		Stage III (Figs. 3F-H)	- large chromatin masses near to envelope - presence of nucleolar granules - beginning of blebs formation due to membrane dilatation	
	DEGENERATED	Stage IV (Figs. 3I-L)	- release of chromatin masses involved by membrane	
		Stage V (Figs. 3M, N)	- nuclear fragments involved by cytoplasm (apoptotic bodies)	
— (absent structures) + (rarely present structures) ++ (present structures) +++ (frequently present structures)				

FIGURES

FIGURE 1:

Ultrastructural characteristics of the salivary glands cells of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females at beginning of feeding. **A-C.** Type I acinus. Observe in **A**, the central cell cytoplasm and nucleus (**n**) and in **B e C**, a detail of peripheral cells with many mitochondria (**m**) among the basal labyrinth (**bl**) membranes. **D-M.** Type II acinus. **D-G.** Details of **b** cell cytoplasm with glycoprotein secretion granules (**sg**), vesicular rough endoplasmic reticulum (**vrer**) and some vacuoles (**va**). **H-K.** **c** cell containing great quantity of rough endoplasmic reticulum and Golgi complex (**gc**) beyond secretion (**se**). **L-M.** Non-identified cells (**x e y**, respectively), where several vacuoles (**va**) and little secretion are observed. **N-Q.** Type III acinus, with cell containing many vacuoles (**va**) and lysosomes (**ly**) and few organelles. In **N** and **P**, detail of **e** and epithelial interstitial cells (**ic**) cytoplasm, respectively. Observe in **Q**, microfilaments (empty arrow) and microvilli (**mv**) in the cells that surround the acinus lumen. **R-S.** Excretory duct cells (**dec**) with membrane specialization (**bl**= basal labyrinth, **i**= cells interdigitation and apical microvilli). **T.** Detail of intra-acinar valve (**v**) present in the granular acini.

mf= myelin figures, **r**=ribosome, **full arrow**= nuclear pore, **lrer**= lamellar rough endoplasmic reticulum, **fc**= f cell, **pc**= procuticle, **ep**=epicuticle, *****=oval structures in the procuticle limit.

Bars: **A, J, Q, T**=1µm; **B, H, O, R**= 2µm; **C, D, E, I, K, L, M, N, P, S**= 0.5µm; **F**= 0.1µm; **G**=0.2µm.

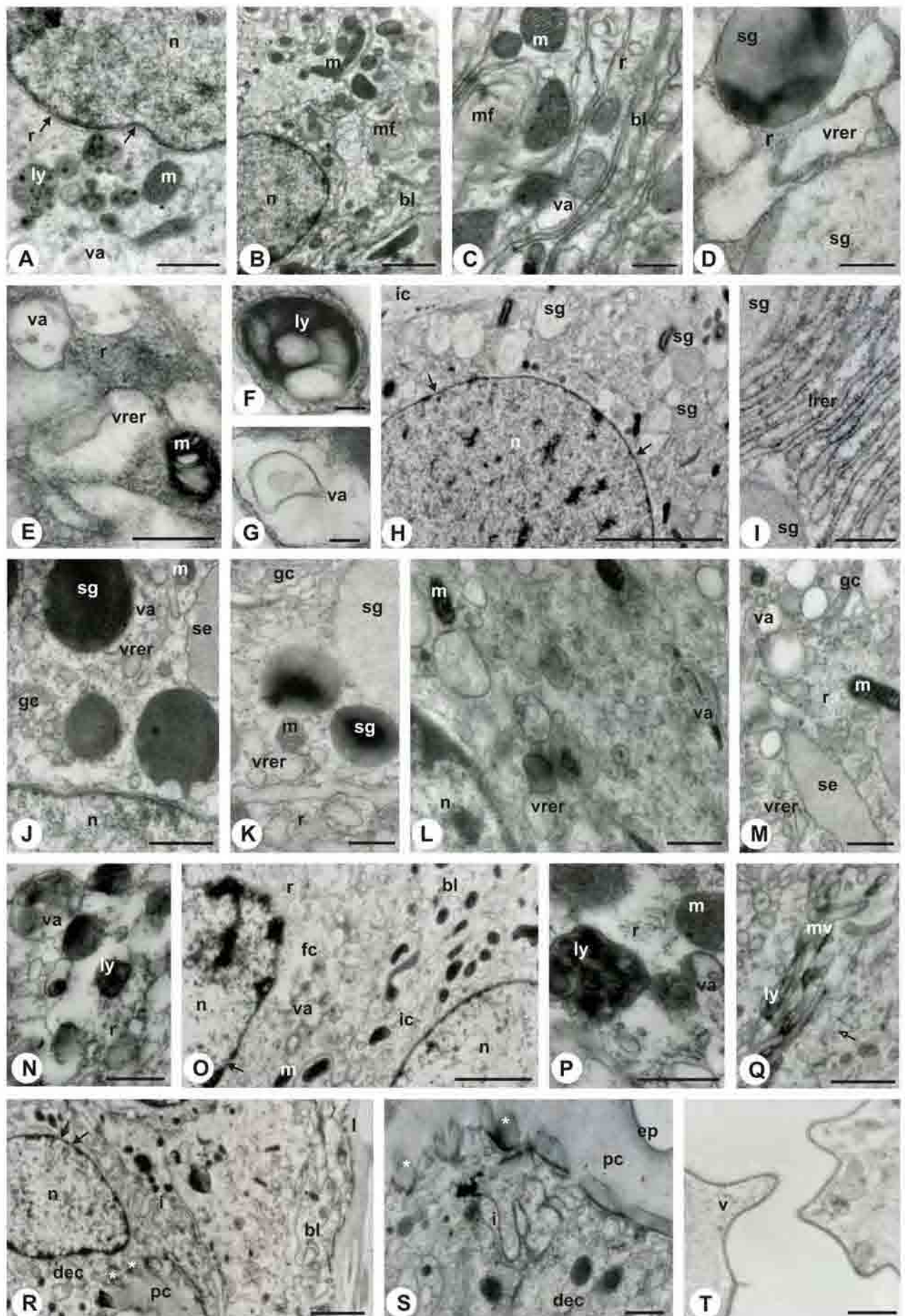


FIGURE 2:

Ultrastructural characteristics of the acinar cells cytoplasm of the salivary glands of semi-engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. **A-J.** Apical-medial region of the cells. Observe the vacuoles (**va**) and lysosomes (**ly**) presence. Some cells possess microvilli (**mv**) while in other these structures retracted (**mr**) or have been lost (**full arrow**). **K-O.** Basal-medial region of the cells, where myelin figures (**mf**), disorganized basal labyrinth (**bl**) of the epithelial interstitial cells and cytoplasmic retraction (**cr**) are observed. In **P-Q**, the excretory duct cells with vacuoles and alterations in the membrane specializations.

er= endoplasmic reticulum, **m**=mitochondria, **r**=ribosomes, **sg**= secretion granules, **i**=interdigitation, **empty arrow**= microfilaments, **lrer**= lamellar rough endoplasmic reticulum, **n**= nucleus.

Bars: **A, C-G, I-N, Q**= 0.5µm; **B, H**= 1µm; **O, P**= 2µm.

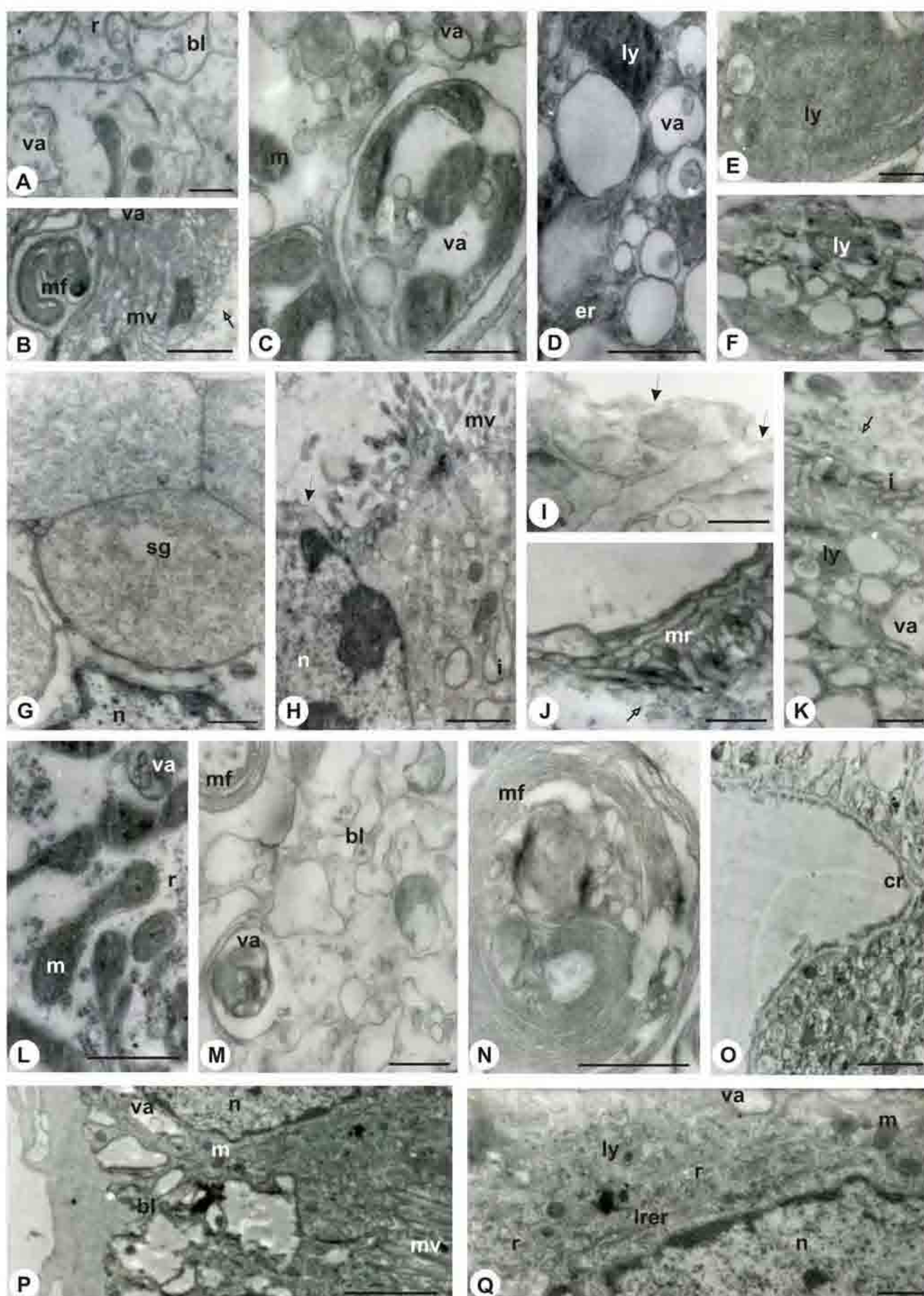
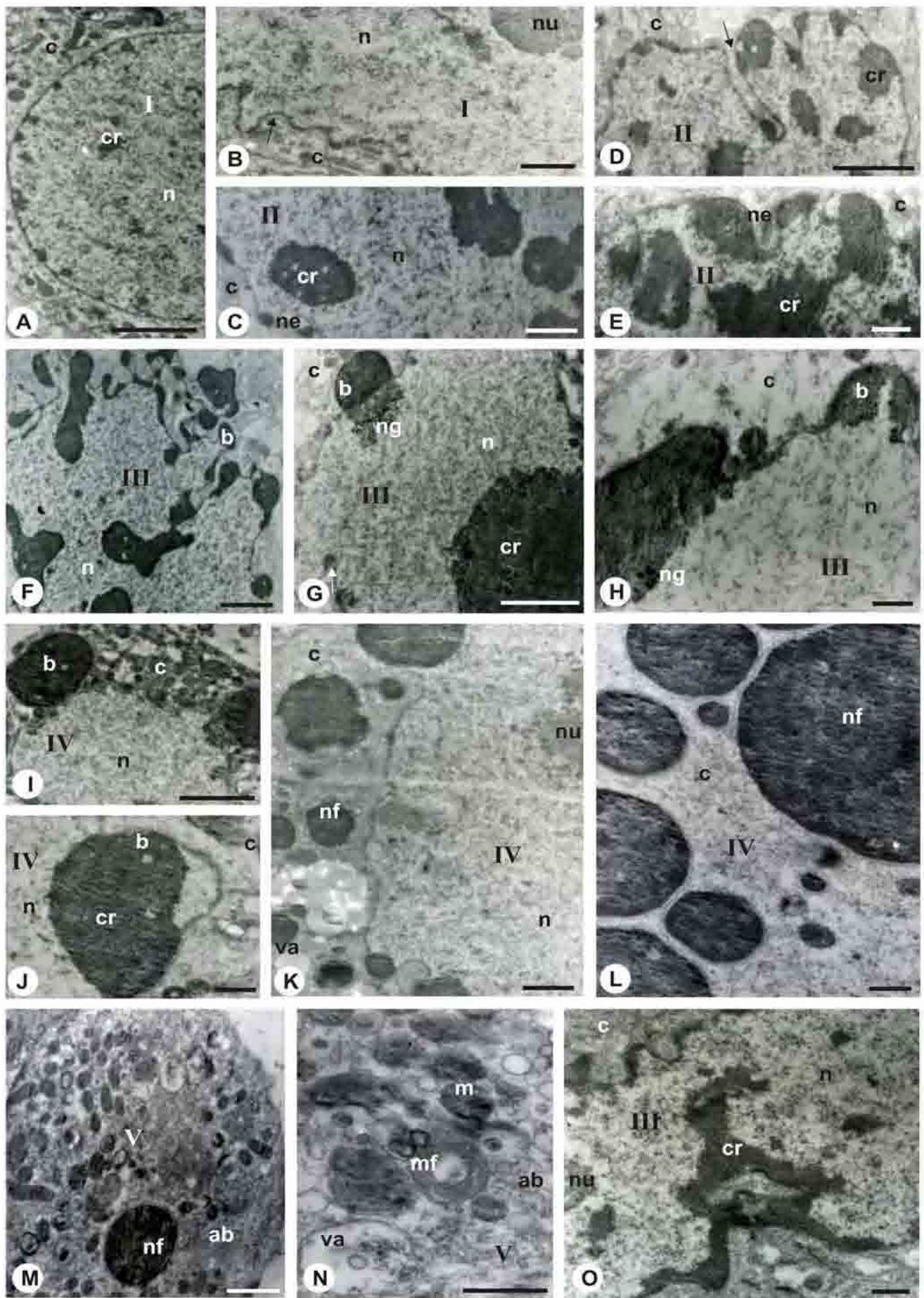


FIGURE 3:

Ultrastructural characteristics of the acinar cells nuclei (**n**) of the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* semi-engorged females. **A.B.** Stage I (**I**): semi-preserved nuclei. **C-E.** Stage II (**II**): beginning of chromatin (**cr**) condensation and its adhesion to the irregular (**arrow**) nuclear envelope (**ne**). **F-H.** Stage III (**III**): observe the beginning of blebs (**b**) formation and the presence of nucleoli granules (**ng**) adhered to chromatin. **I-L.** Stage IV (**IV**): Releasing of nuclei fragments (**nf**) involved by membrane. **M.N.** Stage V (**V**): apoptotic bodies (**ab**) formation. In **N**, detail of the apoptotic body content. **O.** Detail of semi-preserved nucleus of a duct epithelial cell where it is observed the irregular nuclear envelope and peripheral chromatin condensation.

c= cytoplasm, **nu**= nucleolus, **va**= vacuoles, **mf**= myelin figures, **m**= mitochondria.

Bars: **A, D, F, G, I**= 2µm; **B, C, K, M**= 1µm; **E, H, J, L, N, O**= 0.5µm.



DISCUSSION

Females at beginning of feeding (24-48 hours of attachment):

The ticks' ability to survive long periods without feeding is related with the fact of they have the hydric balance assured by their capacity to absorb water from the unsaturated air (Sigal et al., 1999). According to data from literature, tick through the type I acinus from the salivary gland secret, by active transport, salts from hemolymph that are concentrated at the oral region until the re-hydration and further reabsorption of atmospheric humidity (Needham & Teel, 1986).

In females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* at beginning of the feeding stage, the peripheral cells of the type I acinus have an extensive basal labyrinth delimiting spaces that are occupied by several mitochondria, confirming this function, once similar organization is also found in vertebrates ion transporting cells – a process that require considerable amount of energy (Junqueira & Sales, 1975). In these same females, the central cell, which surrounds the excretory duct of the type I acinus, presents little quantity of organelles, therefore, suggesting that they have an auxiliary function in the collected fluid from the hemolymph by the peripheral cells and sent to the acinar duct.

Walker et al. (1985) studying *R. appendiculatus* have observed that at the initial feeding stages, both types of cells of the type I acinus have presented little endoplasmic reticulum as well as lipids droplets and glycogen granules, these last ones serving as energetic reservoir. In this study, however, there were not found lipids and glycogen in the cytoplasm of these cells of females at beginning of feeding stage; being more frequent the presence of vacuoles and lysosomes.

Beyond the fluid excess, the saliva of ticks, which is produced in the granular acini contain bioactive proteins and lipid molecules with several pharmacological properties that act against the host defense mechanism in response to the fixation (Bowman et al., 1997).

According to Binnington (1978) in light microscopy study, after 72 hours of attachment of *Boophilus microplus* ticks, the morphology of type II acinus has suffered remarkable morphological changes, where only inside the **b** and **c₃** cells was

observed the cytoplasmic granulation; the remaining cells (**a**, **c**₁, **c**₂ and **c**₄) had already lost their granules at the same period. The ultrastructural results here obtained for *R. (B.) microplus* females with 24-48 hours of attachment have demonstrated, in type II acini, the presence of glycoprotein granules at different stages of maturation in **b** cells, and in **c**₃ cell beyond glycoprotein granules, only the protein and polysaccharide ones were observed; the remaining cells (**a**, **c**₁, **c**₂, **c**₄) had already lost their granulation, despite of the different time of attachment observed by Binnington (1978). The presence of rough endoplasmic reticulum and Golgi complex in the **b** and **c**₃ cells demonstrates that they are still active in the protein synthesis both structural and for exportation. However, the little quantity of mitochondria indicates the synthesized protein probably will not be exported, a process that would demand a high consumption of energy. According to Walker et al. (1985), the morphology and the level of **b** and **c** cells activities of type II acini seem to vary according to the host immune response. This variation could explain, therefore, the results here found for females of *R. (B.) microplus* at the initial feeding stage (with 24-48 hours) because the presence mainly of glycoprotein granules in these cells could point their participation in the host response manipulation, as the increased vascular permeability at the lesion (Geczy et al., 1971), the enzymatic inhibition (Willadsen & Riding, 1980), the immunosuppression (Wikel, 1981), the inflammation (Higgs et al., 1976) and the histamine blockage (Chinery & Ayitey-Smith, 1977).

The **a** cells (type II acinus) and the **d** cells (type III acinus) both located adjacently to the acinar ducts of the salivary glands of ticks in general and that contain characteristically lipoprotein granules with internal subunits were not identified in this study because the same cells would have lost their characteristic shapes and functions. Some authors have suggested that these cells, collectively to the **e** cells from type III acinus would be responsible for the cement production for the tick fixation on the host (Walker et al., 1985) what would be used in the beginning of the feeding process.

The type III acinus of salivary glands would be responsible for the osmoregulation during the tick feeding process (Tatchell, 1969), and the **f** cells would accumulate and secrete electrondense granules during the first 72 hours of

feeding in *Dermacentor variabilis* (Coons & L'Amoreaux, 1986). In *R. (B.) microplus*, the **f** cells as well as the **e** ones identified in this study according to their positions in the acinus have demonstrated, beyond the absence of cytoplasmic granulation, rare organelles and large amount of autophagic vacuoles. According to Walker et al. (1985) the **e** and **f** cells would contain enzymes that would help in the penetration and fixation of the cement, therefore at the initial feeding stage of the individual, they would have lost their function.

The interstitial epithelial cells of the types II and III acini are described as having ultrastructural characteristics of carrier cells (Coons & L'Amoreaux, 1986). In this study, such cells have presented an extensive basal membranous labyrinth that conferred an increase in the superficial area indicating the main function of these acini, mainly the type III one, in the osmotic regulation of salivary glands of *R. (B.) microplus*. The mitochondria, specially located in the membranous labyrinth, confirm the need of energy to absorb elements that circulate in the hemolymph.

The excretory ducts observed in the salivary glands of *R. (B.) microplus* females at the initial feeding phase have presented the same structure described by Balashov (1983) for ixodid ticks in general.

Semi-engorged females (4-5 days of attachment):

Salivary glands' studies of *R. appendiculatus* tick females have shown, two days after finished the engorgement, that the majority of cytoplasmic granules disappear concomitantly with the appearance of remarkable degenerative cells changes, such as the presence of a large number of phagocytes from the body cavity among the degenerating acini (Till, 1961). In this tick species females in oviposition, these glands already reached the complete degeneration remaining only the ducts and masses of connective tissue. L'Amoreaux et al. (2003), nevertheless, in studies of *D. variabilis* females found the cells of the types II and III acini in process of programmed cell death identified as type 1 only from the fifth day after the tick detachment from its host while the degeneration in type I acini cells was observed only from the 33rd day. In *R. (B.) microplus* semi-engorged females here studied, the

salivary glands already presented the indicative characteristics of cell death in all acini observed as well as in the majority of the ducts, demonstrating that the process of glandular degeneration in this tick species occurs precociously when compared to others ixodids.

The present study has identified significative structural changes in the salivary ducts of *R. (B.) microplus*, refuting the observations of Till (1961) for completely engorged females of *R. appendiculatus*, even after the detachment from their hosts. L'Amoreaux et al. (2003) studying females of *D. andersoni* on the 33rd day after the detachment have verified presence of still preserved nuclei in the cells of the excretory ducts, suggesting that in this tissue of this tick species there is cell death by necrosis. In *R. (B.) microplus*, it is little probable the occurrence of necrosis in the glandular ducts once there were not observed the typical cytoplasmic characteristics of this process; oppositely, the presence of irregular nuclei with little accumulation of chromatin close to the nuclear envelope suggests that in this species the cell death happens by apoptosis.

Still concerning the semi-engorged females of the species in subject, the cytoplasm of central and peripheral cells from the type I acinus as well as the epithelial cells from the ducts present signs of cell death with presence of rare active organelles, many vacuoles containing material under digestion and disorganized basal labyrinth, despite the nuclear alterations, differently of the observations in females at initial feeding stage.

The cell death process by apoptosis is defined by a series of morphological alterations in the cell, which looses its adherence with the surrounding cells and/or with the extracellular matrix. The cytoplasm suffers condensation and the chromatin agglutinates forming one or more masses in the internal surface of the nuclear envelope. Afterwards, the cell forms blebs, and finally, the fragments of the cytoplasm are removed by phagocytes (Zakeri & Lockshin, 2002). In semi-engorged females of *R. (B.) microplus*, the glandular cells under degeneration do not loose the adhesion, keeping consequently the acinus structure in the same way that the cells from the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* studied by Silva de Moraes (1998). Furthermore, the secretory cells of *R. (B.) microplus* are presented at different apoptosis stages, being found a range of cells from those with nuclei here classified

as in stage I (see table 2), similar to those ones found by Dai & Gilbert (1997) in the degeneration of the prothoracic gland of *Manduca sexta*, until those ones with nuclei in stage IV. In *R. (B.) microplus*, nevertheless, there was not observed the participation of phagocytes during the degenerative process, corroborating with Silva & Silva de Moraes (1999), Cruz-Landim & Silva de Moraes (2000) and Furquim et al. (2004), in study of salivary, silk and hypopharyngeal glands of *Apis*, respectively, where cell remains were kept in the individuals.

Some nuclei of glandular cells of *R. (B.) microplus* semi-engorged females showed already fragmented nucleoli with portions adhered to the masses of condensed chromatin, a typical characteristic of apoptotic cells (Schwartz & Osborne, 1995).

According to Bowen & Bowen (1990), the cell membrane specializations are, in general, lost during the apoptosis process, might occurring in the cytoplasm the vesiculation of the endoplasmic reticulum, even the mitochondria and ribosomes keep intact their structures.

In *R. (B.) microplus*, some cells of glands under degeneration have kept their membrane specializations. However, the basal labyrinth of peripheral cells of type I acinus, interstitial epithelial cells, and the cells from the excretory ducts have presented already disorganized. Furthermore, some cells still presented microvilli, while others retracted these specializations and some have lost them. Sehnal & Akai (1982) also observed in the degenerating silk gland of *Galleria mellonella*, the cellular membrane specialization retraction of the basal portion and the disappearance of the microvilli of the cell apices. In a similar way, Silva-Zacarin (2003) observed in larvae of *Apis* at beginning of the pre-pupa stage the total absence of microvilli in the silk gland cells, a fact interpreted by the author as the end of the secretory vesicles elimination process due the cellular failure.

In general, the mitochondria found in all cells of the salivary glands of *R. (B.) microplus* females have presented preserved, including those under apoptosis, with defined crests and electrondense matrix, corroborating Zakeri et al. (1993).

Concerning the rough endoplasmic reticulum, frequently observed in the majority of the secretory gland cells in *R. (B.) microplus* females at the beginning of the feeding stage predominate under vesicular shape. Registers made by Silva de

Moraes & Bowen (2000) with degenerating hypopharyngeal glands have also shown endoplasmic reticulum with dilated cisterns, conferring to it a vesicular shape, therefore, suggesting that in the beginning of the feeding stage, some cells already presented signs of degenerative process. Dai & Gilbert (1997) verified in prothoracic glands under degeneration of *M. sexta* the disappearance of this organelle.

Cruz-Landim & Silva de Moraes (1977) observed in hypopharyngeal glands of *Melipona* workers the presence of myelin figures, and they have suggested that these structures are characteristic of cells under degeneration as well as frequently observed in glandular cells of semi-engorged females belonging to the *R. (B.) microplus* species, showing that these organs already lost most of their functions.

Beyond the apoptotic characteristics already described regarding the salivary gland cells of semi-engorged females of *R. (B.) microplus*, autophagic vacuoles and lysosomes were also observed, suggesting that in the glandular degenerative processes of this species would be also involved the cell death classified by Clarke (1990) as type 2 or autophagic. However, despite the nuclear picnosis, there was observed the chromatin marginalization, a typical characteristic of the apoptotic process (Beaulaton & Lockshin, 1982), determining the improbability of the occurrence of type 2 cell death in salivary glands of this tick species. Dai & Gilbert (1997) also found autophagic vacuoles in degeneration prothoracic of *M. sexta* and they suggested that these structures are found present in the first stages of cell death by apoptosis. In 1990, Clarke pointed the difficulty of interpretation of the exactly type of cell death occurs during the degeneration processes, once some cells combine characteristics of more than one type, as observed in some studies of insects by Silva de Moraes & Bowen (2000) and Reginato & Cruz-Landim (2002).

Coons & L'Amoreaux (1986) studying *D. variabilis* during the period of rapid engorgement while females were still on the host, observed that the f cells and some interstitial epithelial ones have shown signs of autophagy. Those authors suggested that the tick coupling or detachment would be necessary for onset of the salivary gland degeneration. Concerning the case of semi-engorged females of *R. (B.) microplus* here studied, it is suggested that substances are released during the

coupling triggering the glandular cell death, as the total engorgement and consequent detachment have not occurred yet.

Recently, L'Amoreaux et al. (2003) demonstrated the morphological evidences of salivary gland degeneration of *D. variabilis* females and they have verified that this process involves programmed cell death. However, on the others species, there are not works that show the details of the degeneration cell events, being only affirmed that this process happens after the detachment of the tick from its host. Therefore, this work brings the first ultrastructural data that describe and characterize the study of the degenerative process in the salivary glands of *R. (B.) microplus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been supported by FAPESP (grants 02/10149-7 and 04/03252-1). The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Ronaldo Del Vecchio, Cristiane Marcia Mileo and Monika Iamonte for the technical support, and Karim C. Furquim for providing valuable comments. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTTD-3) supported by the European Union under contract number 510561-INCO.

REFERENCES

BALASHOV, Yu. S. 1983. Ixodid tick ultrastructure. *Entomological Society of America*. 289pp.

BALASHOV, Yu. S. 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)- vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 8: 161-376.

BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R. A. 1982. The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int. Rev. Cytol.*, 79: 215-235.

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

BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M. 1990. Programmed cell death in tumours and tissues. London: Chapman and Hall, 289pp.

BOWMAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. 1997. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 277-285.

CHINERY, W.; AYITEY-SMITH, E. 1977. Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. *Nature* (London) 265: 366-367.

CLARKE, P. G. H. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embriology*, 181: 195-213.

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

COONS, L. B.; ROSHDY, M. 1973. Fine structure of the salivary glands of unfed *Dermacentor variabilis*. *Journal of Parasitology*, 59: 900-912.

COONS, L. B.; L'AMOREAUX, W. J.; ROSSEL-DAVIS, R.; TARNOWSKI, B. I. 1989. Onset of vitellogenin production and vitellogenesis, and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.*, 6: 291-305.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. 1977. Estruturas degenerativas nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* (Apidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 37: 681-692.

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

DAI, J. D., GILBERT, L. I. 1997. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 27 (1): 69-78.

FURQUIM, K. C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SILVA DE MORAES, R. L. M. 2004. Morphological modifications induced by an artificial diet on the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) during their degenerative process. *Sociobiology*, 43(2): 279-291.

GECZY, A. F.; NAUGHTON, M. A.; CLEGG, J. B.; HEWETSON, R. W. 1971. Esterases and a carbohydrate splitting enzyme in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Parasitology*, 57: 437-438.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. 1981. Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *J. Insect Physiol.*, 27: 241-248.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. 1985. Ecdysteroids: possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the tick, *Amblyomma hebraeum*. *Experientia*, 41: 740-741.

- HIGGS, G. A.; VANE, J. R.; HART, R. J.; POTTER, C; WILSON, R. G. 1976. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bulletin of Entomological Research*, 66: 665-670.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; SALES, L. M. M. 1975. Ultra-estrutura e função celular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 121pp.
- KROLAK, J.M.; OWNBY, C. L.; SAUER, J. R. 1982. Alveolar structure of salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* unfed females. *Journal of Parasitology*, 68: 61-82.
- L'AMOREAUX, W. J.. JUNAID, L.; TREVIDI, S. 2003. Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. *Tissue and Cell*, 35: 95-99.
- MAO, H.; KAUFMAN, W. R. 1999. Profile of the ecdysteroid hormone and its receptor in the salivary gland of the adult female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 33-42.
- MEGAW, M. J. W.; BEADLE, D. J. 1979. Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. *International Journal of Insect Morphology and Embriology*, 8: 67-83.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56: 169-172.
- NEEDHAM, G. R.; ROSELL, R.; GREENWALD, L.; COONS, L. B. 1990. Ultrastructure of type-I salivary gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on the type-I acini of *Amblyomma americanum*. *Experimental and Applied Acarology*, 10: 83-104.

NEEDHAM, G. R.; TEEL, P. D. 1986. Water balance by ticks between bloodmeals. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A.(eds.). *Morphology, Physiology and Behavioral biology of ticks*. Ellis Horwood, Chichester, 100-151.

REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. 2002. Morphological characterization of cell death during ovary differentiation in worker honeybee. *Cell Biol. Int.*, 26 (3): 243-251.

SAUER, J. R; McSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C. 1995. Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*, 40: 245-267.

SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. 1995. *Methods in Cell Biology*. San Diego: Academic Press, 46: 459pp.

SEHNAL, F.; AKAI, H. 1982. Ultrastructure and function of silk glands in *Galleria mellonella*. In: AKAI, H.; KING, R. C.; MOROHOSHI, S. (eds.). *The ultrastructure and functioning of cells*. Tokyo: Soc. For Insect Cells Japan, 135-138.

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

SILVA, E. C. M.; SILVA DE MORAES, R. L. M. 1999. Silk gland degeneration of *Apis mellifera* (Hym., Apidae). *Acta Microscopica*, 8 (suppl. B): 93.

SILVA DE MORAES, R. L. M. 1998. Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Livre-Docência. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Rio Claro, S.P., 97pp.

SILVA DE MORAES, R. L. M.; BOWEN, I. D. 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera*). *Cell Biology International*, 24 (10): 737-743.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. 2003. Estudo morfológico e da expressão gênica no processo degenerativo das glândulas de seda de larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 150pp.

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

TILL, W. M. 1961. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann. *Mem. Entomol. Soc. South. African*. 6: 1-124.

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

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. 2004. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16): 5874-5879.

WIKEL, S.K. 1981. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 30: 284-288.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. 2002. Cell death during development. *Journal of Immunological Methods*, 265: 3-20.

ZAKERI, Z. F.; QUAGLINO, D.; LATHAM, T.; LOCKSHIN, R. A. 1993. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J.*, 7: 470-478.

Capítulo 4

CAPÍTULO 4

TITLE: Acid phosphatase and ATPase activities in female cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) salivary glands during the feeding period.

AUTHORS: Erika Takagi Nunes¹, Maria Izabel Camargo Mathias¹ and Gervásio Henrique Bechara²

¹. Departamento de Biologia – Instituto de Biociências- UNESP, Av. 24^A, nº1515. Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro, S.P.- Brazil. Tel: +55 (19) 3526-4135. FAX +55 (19)3526-4136.

². Departamento de Patologia Veterinária – FCAV – UNESP – Jaboticabal, S.P.- Brazil.

Send the proofs to the first author (E-mail: erikatnunes@yahoo.com.br)

RESUMO

O presente estudo investiga a presença e a localização da fosfatase ácida a fim de verificar a atividade lítica nas glândulas salivares de carrapatos fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante o processo de alimentação. A atividade da ATPase também foi analisada para evidenciar a participação desta enzima. As fêmeas semi-ingurgitadas demonstraram uma maior quantidade de fosfatase ácida quando comparadas àquelas no início de alimentação, sendo localizada principalmente na porção apical das células secretoras e no labirinto basal das células intersticiais dos ácinos granulares (tipos II e III). As observações ultra-estruturais demonstraram a presença desta enzima hidrolítica também nos grânulos de secreção e no interior de alguns núcleos das células secretoras provenientes de fêmeas em início de alimentação. A fosfatase ácida observada principalmente sob a forma livre no citoplasma das células tem, provavelmente, origem nos ribossomos ou na hemolinfa e participa do controle da secreção das glândulas salivares. A presença da ATPase foi detectada na membrana basal de todos os tipos de ácinos e/ou no citoplasma das células secretoras das fêmeas em ambos estágios de alimentação, entretanto, um decréscimo na atividade ATPásica foi encontrado durante o avanço da alimentação. As atividades tanto da fosfatase ácida como da ATPase encontradas nas glândulas salivares das fêmeas semi-ingurgitadas confirmam a ocorrência da morte celular por apoptose e descartam a necrose e/ou morte autofágica durante o processo degenerativo, nesta espécie de carrapato.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – carrapato-do-boi – glândulas salivares – histoquímica – citoquímica – fosfatase ácida - ATPase.

ABSTRACT

The present study investigates the acid phosphatase presence and its localization aiming to verify the lytic activity in the salivary glands of *Rhipicephalus*

(Boophilus) microplus females tick during the feeding process. The ATPase activity was also analyzed to show this enzyme participation. Females at semi-engorged stage showed a larger amount of acid phosphatase when compared to those at beginning of feeding, localized mainly in the apical portion of the secretory cells and in the basal labyrinth of the granular acini (types II and III) interstitial cells. The ultrastructural observations demonstrated the presence of this hydrolytic enzyme also in secretion granules and inside some nuclei of the secretory cells from females at beginning of feeding. The acid phosphatase mainly observed under free form in the cytoplasm has probably hemolymph capture and/or ribosome origin and participates of the salivary glands secretion control. ATPase presence was detected in basal membrane of all acini types and/or in the cytoplasm of the secretory cells of females at both feeding-stages, however, a decrease in ATPase activity was found during the feeding process. The acid phosphatase and ATPase activities found in the salivary glands of semi-engorged females confirm the occurrence of cell death by apoptosis and discard the necrosis and/or autophagic ones during the degenerative process in this tick species.

KEY WORDS: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – cattle-tick – salivary glands – histochemistry – cytochemistry – acid phosphatase - ATPase.

INTRODUCTION

Great interest has been sparked in studying ixodid salivary glands physiology and salivary glands secretions during feeding of the tick due to the prolonged period of its attachment, the extensive changes that these structures undergo during the feeding and the ability of ixodids to transmit a wide range of pathogens through these organs (Sauer et al., 2000).

The salivary glands in tick female degenerate when she reaches her repleted weight and is almost complete within four days following detachment from the host (Sauer et al., 2000). L'Amoreaux et al. (2003) found that salivary glands degeneration of adult engorged female *Dermacentor variabilis* involves, at least in part, type 1 programmed cell death and suggested that within the Ixodidae, these organs involution may proceed at greatly different rates.

Some studies have demonstrated that salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females are degenerating at semi-engorged stage and probably by an apoptotic process (Nunes et al., 2005).

According to Bowen & Bowen (1990), apoptosis is an energy (ATP) dependent process that would be involved in endonuclease activation leading to chromatin fragmentation. In the other hand, the loss of selective permeability of plasmic membrane and later damage in mitochondrial functions that occurs in necrosis, cause the decrease of the ATP production (Trump et al., 1981). Decreasing in the enzymes related to energy metabolism has already been mentioned a long time ago (Weber, 1969).

Acid phosphatase activity is usually utilized to characterize lytic activities in cell histolysis (Bowen & Bowen, 1990) once it is pointed out to be related to the tissue degeneration event (Cruz-Landim & Melo, 1981). The role ascribed to acid phosphatase activity is varied but falls into two basic types, lysosomal and non-lysosomal free hydrolase leading to cell autolysis. A range of distribution patterns can be seen, extending from a limited activity, associated with ribosomes to an extensive distribution being found, before cell disruption, throughout the cytoplasm, in the lysosomes and Golgi complex (Bowen & Bowen, 1990).

Some histochemical studies determined the lysosomal and free phosphatase activity in the insects' haemocytes, salivary glands and fat body (Armbruster et al., 1986; De Priester et al., 1979). Cytochemical analyses of this enzyme demonstrating physiological cell death were also employed in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster* (Jones & Bowen, 1993).

Ryder & Bowen (1975) have recommended the substrate *p*-nitrophenyl phosphate as a good marker for cell death; it demonstrates the intracellular sites of lysis and has a broad specificity picking up a wide range of iso-enzymes.

Therefore, in the present study the localization of acid phosphatase was investigated using a combination of histochemistry and ultrastructural cytochemistry in search of verifying the lytic activity that occurs in the salivary glands of *R. (B.) microplus* female tick during the feeding process. Moreover, the ATPase activity was investigated in order to show this enzyme participation and its relation with the physiological changes that would occur during the same feeding period.

MATERIAL AND METHODS

Adult females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks parasitizing bovine *Bos taurus* at the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences / UNESP – Jaboticabal, S.P., Brazil, at beginning of feeding (24-48 hours of attachment) and semi-engorged (4-5 days of attachment) have been used for this work. In this study, we considered females in the beginning of feeding stage those whose weigh was lower than 0.03g, and partially fed whose weigh was around 0.13g ad 0.25g. Approximately 20 ticks of each feeding stage were sampled for histochemistry and ultrastructural cytochemistry. Equipments in the Histology and Electron Microscopy Laboratories of the Biology Department at the Bioscience Institute, UNESP – Rio Claro, SP, Brazil, were utilized throughout the study.

The salivary glands were removed in saline solution (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L and KH₂PO₄ 2.72 g/L, pH 7.2) and utilized in the following techniques:

Histochemistry

- Acid Phosphatase Localization (According to Hussein et al., 1990)

After the fixation for 1 hour and 30 minutes at 4°C in 9:1 v/v mixture of 10% neutral buffered formalin and acetone, the salivary glands were washed in 0.05 M acetate buffer (pH 4.8) and incubated at 37°C for 45 minutes in a medium containing: 3mg of naphtol AS-TR phosphate dissolved in 2 drops of dimethyl sulphoxide (DMSO) buffered with 10mL acetate buffer (0.05M, pH 4.8). To this was added 0.2 mL of 10% manganous chloride and finally 6 mg of Fast Red Violet LB Salt. A no-substrate control was carried out. Dehydration was made in a graded 70-95% ethanol series and the inclusion was performed in Leica resin. Sections of 6 µm thickness were collected and placed on glass slides and counter-stained with Hematoxylin.

After dehydration some salivary glands were separated and observed at total set view.

- ATPase Localization (According Hussein et al., 1990)

The salivary glands were fixed in 0.5% glutaraldehyde in 0.2M cacodylate buffer at 4°C, pH 7.2 for 1 hour. Afterwards, the material were incubated for 48 minutes at 37°C in the medium: Tris-maleate (200mM, pH 7.2), ATP (5mM), MgSO₄ (5mM), KCl (15mM), CaCl₂ (10mM), lead acetate (4mM), sucrose (160mM). The tissues were washed in Tris-maleate buffer for 5 minutes at 4°C, fixed in 9:1 v/v mixture of 10% neutral buffered formalin and acetone for 20 minutes, dehydrated in a graded 70-95% alcohol series, and included in Leica resin. Sections of 6 µm thickness on glass slides were submitted to 1% ammonium sulphete solution for 5 minutes and counter-stained with Hematoxylin.

Controls tissues were incubated in medium without ATP.

Cytochemistry

- Acid Phosphatase Localization (Modification of Ryder and Bowen, 1975)

The salivary glands were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer at 4°C, pH 7.2 for 1 hour, washed in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 4.8) and incubated, for 2 hours, at room temperature, in a medium containing: p-nitrophenyl phosphate (5mg), 0.05 M acetate buffer (10 mL, pH 4.8) and lead acetate (5mg). After incubation the glands were washed in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) for 30 minutes before post-fixing in Millonig's osmium tetroxide for 1 hour at 4°C. The dehydration was performed in a graded 50-100% acetone series and then, the material was embedded in Epon resin diluted in acetone (1:1) for 12 hours, included in pure Epon resin and incubated at 60° C for 48 h. After polymerized ultrathin sections were obtained with ultramicrotome and the grids were analyzed and photographed in a PHILLIPS TEM 100 Transmission Electron Microscopy.

As controls, tissues were incubated in the above cited medium from which the substrate p-nitrophenyl phosphate had been excluded.

RESULTS

Acid Phosphatase Localization

The acid phosphatase technique applied in the light microscopy has demonstrated the lytic activity of acinar cells of salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females at beginning of the feeding stage and semi-engorged ones.

- Total Set View:

In females at beginning of feeding stage, it is detected the strongly positive marking in the acini from the distal region where there is the predomination of granular acini (types II and III) (Fig. 1A). In the salivary glands from semi-engorged females a strong positivity is observed in all acini types as well as in the excretory ducts (Fig. 1I).

- Histological Sections:

In the salivary glands of females at beginning of feeding the agranular acini (type I) present negative or weakly marked as reddish precipitates distributed in peripheral cell cytoplasm (Fig. 1C).

Among the granular acini (types II and III) of females at this same feeding stage, it is possible to observe the intense activity of acid phosphatase in the type II acinus, where it is verified the largest concentration of enzymes at the apical portion of the secretory cells, despites the weak positivity in the basal portion of interstitial epithelial cells (Fig. 1D). The type III acini present weak positivity through all cytoplasm of some cells (Fig. 1E).

In the salivary glands of the semi-engorged females, the agranular acini (type I) are negative (Fig. 1K), in contrast to the granular type II acini that demonstrate strong positive reaction in some secretory cells and mainly at the apical region (Fig. 1L).

The granular type III acini present weak positivity mainly at the apical portion of the secretory cells as well as inside the acinar lumen (Fig. 1M).

In none of the feeding stage here studied, concerning the light microscopy, it is observed the presence of this enzyme in the cells of the excretory ducts.

- Ultrastructural Detection:

Through the p-nitrophenyl phosphate technique for electron microscopic localization of cellular sites with acid phosphatase activity, it is possible to observe in the salivary glands of females at beginning of feeding stage, the slightly positive marking in the cells of type I acinus and in the excretory ducts as black precipitates spread in the cytoplasm (Fig. 2A). Strongly positivity is found in secretory cells of the type II acini, where the acid phosphatase is detected in varied amounts inside some types of secretion granules, free in the cytoplasm among granules, in the lysosomes as well as in the basal membranous labyrinth. However, no labelling in the mitochondria and in the endoplasmic reticulum were observed (Figs. 2B, C, D, E). The interior of some nuclei presented some sites of activity (Fig. 2B); however, among others, it is only observed some unspecific precipitates caused by the lead acetate (Fig. 2D), also present in the control (Fig. 2K).

The secretory cells of the type III acini demonstrate acid phosphatase activity in some nuclei, probably from the **f** cells, despite the little cytoplasmic marking close to the membrane of **e** cells (Figs. 2F, G, H). In the interstitial epithelial cells of type III acini, the activity is observed mainly in the basal membranous labyrinth (Figs. 2F, H). The granules of secretion present in the secretory cells of this acini type are negative to the test (Figs. 2G).

In the type I acini of salivary glands of *R. (B.) microplus* semi-engorged females, the ultrastructural cytochemistry evidences the presence of free acid phosphatase in the cytoplasm of secretory cells mainly among the membranes of the labyrinth of peripheral cells (Fig. 2L), being in higher quantity in the contact region with the central cell (Fig. 2M).

The cytoplasm of some cells of the excretory ducts is also strongly positive (Fig. 2N).

In the granular acini (types II and III), it is observed the free marking at the apical portion of some secretory cells including the microvilli turned to the lumen (Fig. 2O) as well as inside some nuclei (Fig. 2P). It is not found, nevertheless, the presence of acid phosphatase in the secretory granules, mitochondria or endoplasmic reticulum (Figs. 2P, Q, S). Marking can also be observed in the basal membranous labyrinth of interstitial epithelial cells (Figs. 2T, S).

ATPase Localization

The salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females at beginning of feeding stage demonstrate strong positivity for ATPase in the cytoplasm of cells of some type I acini (Fig. 3A). The cell cytoplasm as well as the basal membrane of the excretory duct and types II and III acini present strong positivity to the test (Figs. 3B, C). Despite of this fact, there are observed cells of some acini and excretory ducts with slight marking, or even, negative to the test (Fig. 3D).

In the salivary gland sections of semi-engorged females, it is observed the cellular cytoplasm of slightly positive type I acinus however, the medium positivity is found mainly in the basal membrane (Fig. 3H). Some type II acini show their basal membrane partially positive to the test (Fig. 3H); others show their basal membrane strongly positive to the same test (Fig. 3I). There are also observed acini with strongly positive secretory cells within the majority of cells that is negative to the test, despite of the strong positivity to the test of the cytoplasm of the cells from the granular type II and III acini (Figs. 3I, J). These results demonstrate the asynchrony in the enzymatic activity among the glandular acini, including those of the same type.

In general, the excretory ducts from the salivary glands of the individuals at both stage of feeding are strongly positive.

FIGURES

FIGURE 1:

Phosphatase acid activity in the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **A-H**. Salivary glands of females at beginning of feeding. Note in **A** the salivary gland total set view showing the predominance of acid phosphatase (**arrow**) in the more distal acini (**a**). **C, D, E**. Enzyme localization in the types I (**I**), II (**II**) and III (**III**) acini. It was verified in the type II acini a major acid phosphatase concentration in the region next to the lumen (**lu**) and in type III acini the enzyme was dispersed through the cytoplasm. **B, F, H**. Negative controls. **I-P**. Salivary glands of semi-engorged females. Observe in **I**, the great amount of this enzyme when compared to the females at beginning of feeding (**A**). Note in **L** and **M**, a strongly positive cell in the type II acini and the predominance in the apical region of the type III acini, respectively. **J, N-P**. Negative controls.

Bars: **A, I**= 100 μ m; **B, J**=10 μ m, **C-H, K-P**= 20 μ m.

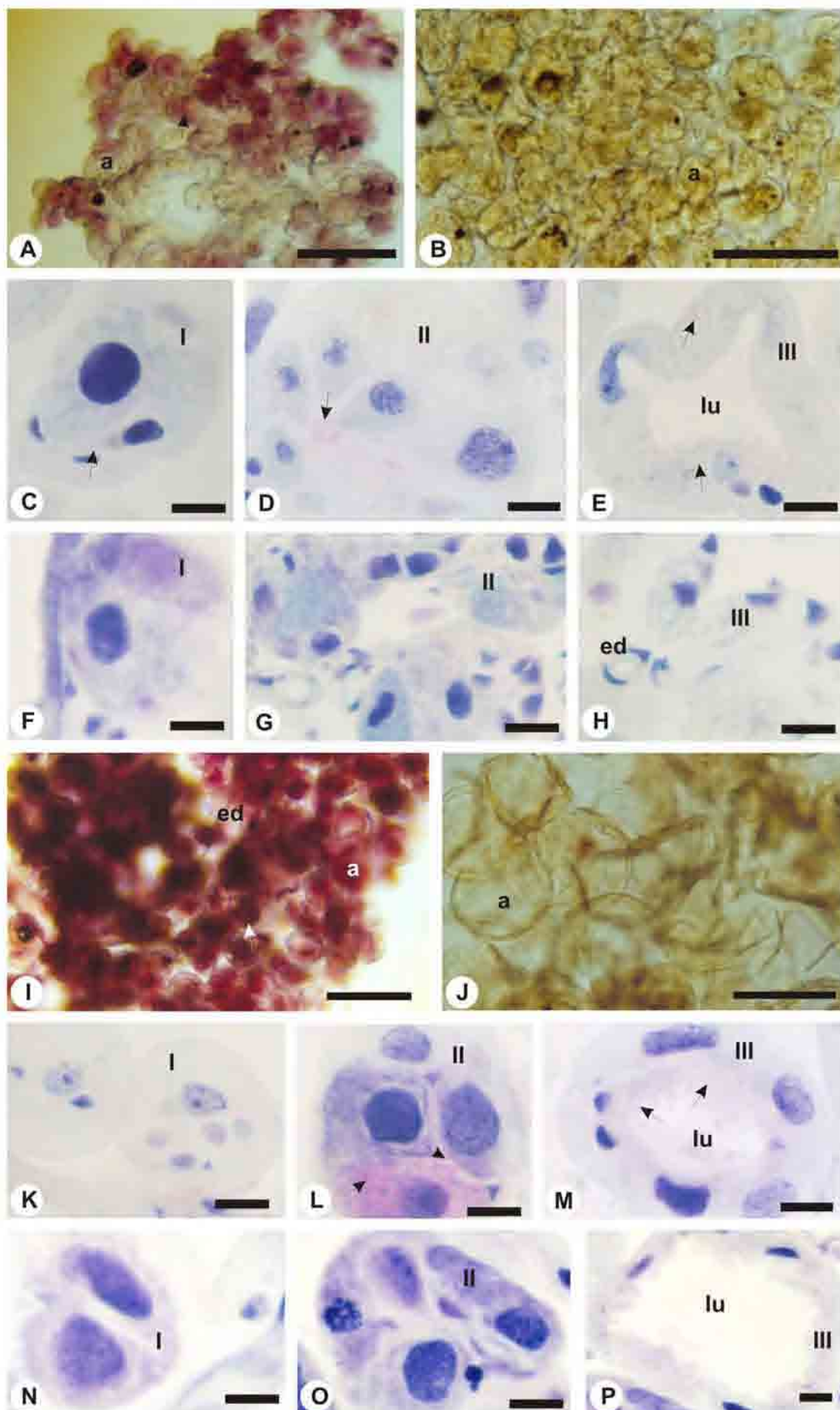


FIGURE 2:

Ultrastructural localization of the acid phosphatase activity in the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females' salivary glands. **A-K.** Salivary glands of females at beginning of feeding. Note the weak demarcation (**arrow**) in the excretory ducts (**ed**) in A. **B-E.** Observe the presence of this enzyme inside some secretion granules (**sg**), lysosomes (**ly**) and in some nuclei (**nu**) of the type II acini and the absence in the endoplasmic reticulum (**er**) and in mitochondria (**m**). In the type III acini (**F-H**) the acid phosphatase was found in the **f** cells (**fc**) nuclei, near to the membrane in the **e** cell (**ec**), and also in the basal labyrinth (**bl**) of the interstitial cells. The secretion granules were negative in this acini type. **I-K.** Negative controls. **L-V.** Salivary glands of semi-engorged females. **L, M.** Type I acini showing the presence of acid phosphates in the basal labyrinth of the peripheral cells, mainly in the contact region with the central cell (**cc**). **N.** Demarcation in the excretory duct cells. **O-S.** Note the free acid phosphatase in the apical portion (**O**) and inside some nuclei of the secretory cell (**P**). The basal labyrinth of interstitial cell is positive also (**R-S**). **T-V.** Negative controls.

dc= d cell; **lu**=lumen; **mv**= microvilli.

Bars: **A,B, D, H, I, K, Q**= 2µm; **C, E, L, N, O, V**= 0.5µm; **F, G, J, P, S**= 5 µm; **M, R, T, U**= 1 µm.

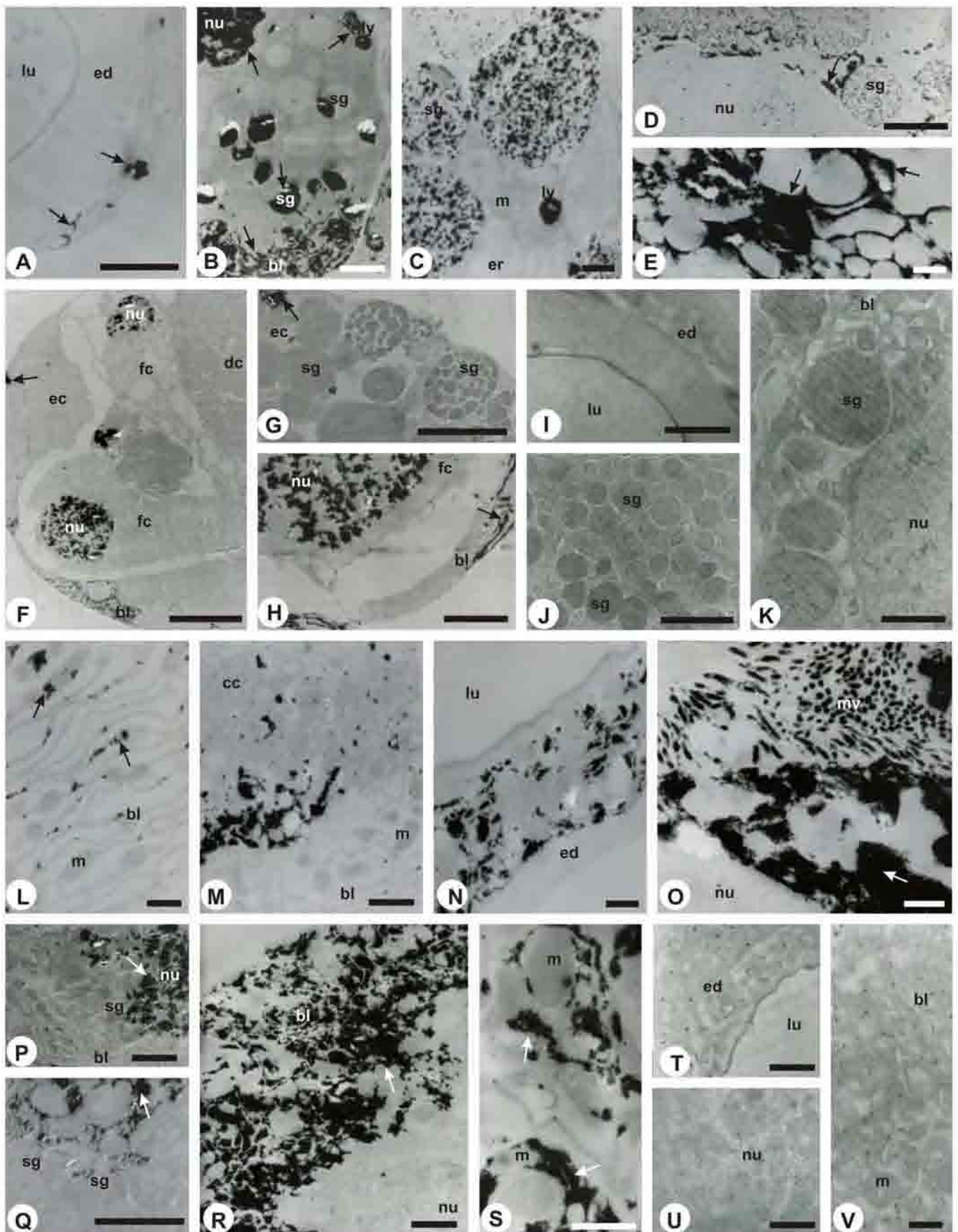
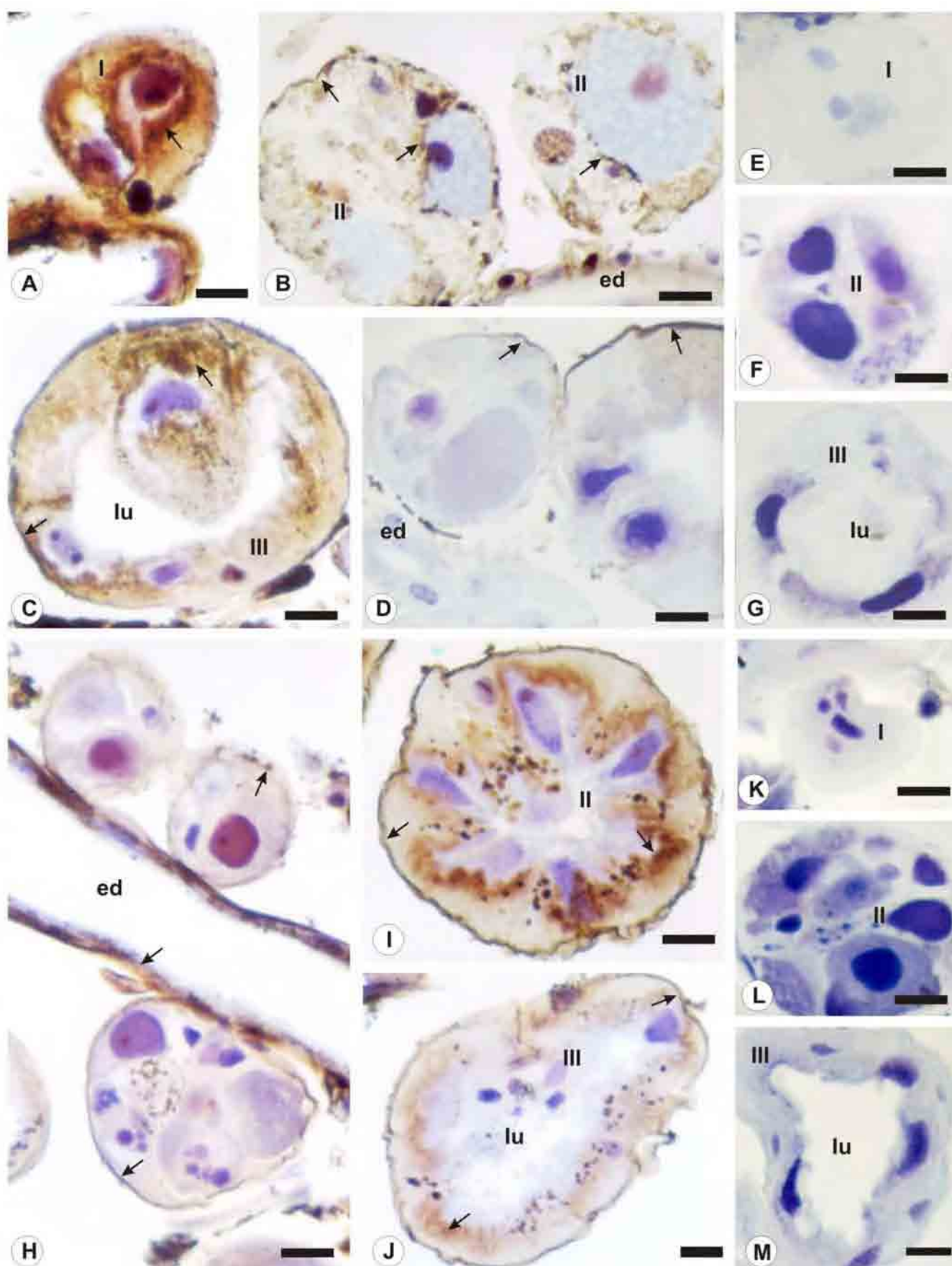


FIGURE 3:

Histochemical ATPase activity localization in the salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **A-G.** Salivary glands of females at beginning of feeding. Observe in **A**, that type I acini (**I**) reacted strongly to the enzymatic test and in **B** and **C**, that ATPase activity was found in the cytoplasm and in the basal membrane of the types II (**II**) and III (**III**) acini cells. Note in **D** that some acini demonstrate only the basal membrane positive to the test. **E-G.** Negative controls. **H-M.** Salivary glands of semi-engorged females. Observe in **H-J.** a minor quantity of this enzyme inside the glandular acini at this feeding stage when compared to those from females at beginning of feeding. The excretory ducts (**ed**) react positive to the test. **K-M.** Negative controls.

Bars: A-M= 20µm.



DISCUSSION

The total set and sections of the salivary gland of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females in light microscopy allowed visualizing the acid phosphatase enzymatic activity as well as the ATPase enzymatic activity during the beginning and the half of the feeding process.

Comparing the salivary glands of females at beginning of feeding stage to those of semi-engorged ones, it was verified a higher acid phosphatase activity with the advance of the feeding process. This increase of activity in the semi-engorged females is probably associated to the degenerative process, which in this species already starts during the feeding stage (Nunes et al., 2005). Furthermore, in individuals at initial feeding stages, there was observed a higher marking in the proximal-distal course of the gland, demonstrating the asynchronism of the enzymatic activity among the different acini and clarifying that the morphological alterations begin at the distal region where the granular acini are mainly located. Silva de Moraes (1998) also observed this activity pattern occurring along of the hypopharyngeal glands of foraging workers of *Apis mellifera*.

Throughout histological sections of the salivary glands of *R. (B.) microplus* females at both feeding stages, it was observed the acid phosphatase activity in secretory cells as free form at the apical and basal cytoplasmic regions as well as found in gut cells of *A. mellifera* larvae by Gregorc & Bowen (1997).

The results here obtained for females of *R. (B.) microplus* at beginning of feeding (24-48 hours of attachment) oppose, however, the results of Binnington (1978) that observed strongly positive reaction for acid phosphatase in the type I acinus cells and in the **d** cells of type III acini of glands from females of the same species with the same time of feeding.

Considering that the light microscopy has not allowed the definition of the exact localization of the acid phosphatase activity, the ultrastructural cytochemical analysis played in the work an important role.

Generally, in the development biology the acid phosphatase activity is frequently related to the increase in the quantity of lysosomes and to the consequent process of cell degeneration (Lockshin, 1981).

According to Van Lancker (1975), when the cells die some cytoplasmic areas suffer autolysis being at the certain moment attacked by hydrolases from the primary lysosomes as from the endoplasmic reticulum, opposing Bowen (1981) that admits the lysosomic fragmentation and the release of its content in the cytoplasm happen just after the cell death.

Bowen & Bowen (1990) observed the free acid phosphatase accumulation in the extracisternal region of the rough endoplasmic reticulum, suggesting that this stage comes before the autolysis and cell death of tissues of planaria (Bowen & Ryder, 1974). Still according to these authors, this enzyme produced specifically for the cellular lysis is not derived from the Golgi complex or from the lysosomes, but synthesized and released from the ribosomes. In the present study, there was verified the presence of this enzyme mainly as extracisternal free form, not being observed signs that this enzyme would be proceed from lysosomes. Moreover, the little quantity of lysosomes present in the cells of the glands of females at beginning of the feeding stage would not be sufficient to release the free acid phosphatase quantity found in this study.

Silva de Moraes & Bowen (2000) found in a cytochemical study of hypopharyngeal glands of *A. mellifera*, cells with little acid phosphatase in nurse bees while the foraging ones showed large activity in the lysosomes and extracisternal spaces in some cells, being the cistern interiors of the endoplasmic reticulum negative to the test. Zara (2002) studying the salivary gland of larvae ants of *P. (=Neoponera) villosa* did not observed the activity for acid phosphatase inside the endoplasmic reticulum, in the mitochondria, secretion vesicles, and nor in the acini lumen of the posterior region.

Regarding the acinar and salivary ducts cells of *R. (B.) microplus* females, there was not observed the intracisternal marking, what demonstrates that such enzymes are not produced by the reticulum, being the acid phosphatase found mainly as free form in the cytoplasm. In the female at beginning of feeding stage, some granules of secretion of type II acinus cells are positive, suggesting that the enzyme

could be captured from the hemolymph and/or produced by the ribosomes, being part of the final granular secretion which would be posteriorly eliminated in the acinar lumen, where there was also observed strong marking at the microvilli that surround this region in acini of females at more advanced feeding stage. According to Smith & Farquhar (1966), the presence of enzyme in the granules of secretion would be related to the protein degradation and to the secretory process regulation.

The presence of acid phosphatase in the plasmic membrane invaginations was observed in the salivary glands of several insects (Levy & Bautz, 1985; Jones & Bowen, 1993; Bowen et al., 1996; Azeredo-Oliveira & Mello, 1998; Zara, 2002). Zara (2002) suggested that this intense activity in cells of *P. (=Neoponera) villosa* would be the indication of the acid phosphatase capture from the hemolymph as proposed by other authors (Levy & Bautz, 1985; Armbruster et al., 1986). Concerning the females of *R. (B.) microplus* at all feeding stages here studied, the same process might be occurring, once such enzymes were observed mainly in the basal labyrinth of interstitial cells present in the granular acini, considered as carrier cells.

Ryder & Bowen (1975) affirmed that the p-nitrophenyl phosphate locates the acid phosphatase activity in organelles such as the Golgi complex, lysosomes, and endoplasmic reticulum; however, Silva de Moraes (1998) highlighted that the specific markings in the ribosomes and/or extracisternal of the endoplasmic reticulum the characteristic signal of preparation to the autolysis and cell death. Skelton & Bowen (1987) observed in cells of the *Calliphora vomitoria* larvae midgut aging 7 days and in beginning of the degenerative process, regions with free phosphatase acid as verified at the secretory portion and in the glandular ducts of semi-engorged females belonging to the species *R. (B.) microplus* that according to Nunes et al. (2005) also demonstrated signs of degeneration.

Despite the acid phosphatase is described in the literature as a cell death determiner, in females of *R. (B.) microplus* at beginning of feeding, acini with cells still containing granules of secretion and, therefore, classified as active cells, demonstrated the presence of this enzyme in a large quantity. Silva de Moraes (1998) also have found this enzyme in active cells of bee glands and it was associated to the metabolic activity of the glandular cells.

Silva-Zacarin (2003) observed in the silk gland of *A. mellifera* pre-pupa the reduction in the levels of acid phosphatase as the occurrence of the vacuoles was becoming intense and, consequently, destruction of cells. According to the author, this fall would point the failure of the protein synthesis machinery and of the capture process of material from the hemolymph, what also can be happening in the type III acini of *R. (B.) microplus* semi-engorged female's glands as they are described as being the first ones to loose their granules of secretion and present degenerative characteristics (L'Amoreaux et al., 2003).

In *R. (B.) microplus*, there was also marking for the acid phosphatase in the interior of some cells of type II and III acini of salivary glands of females at both feeding stages. This enzyme was also found at the chromatin of the cells of the Malpighian tubules of *Triatoma infestans* (Azeredo-Oliveira & Mello, 1997, 1998). Cruz-Landim et al. (2002) observed this same acid phosphatase location in cells under tissue death process of larvae of *A. mellifera*. According to these authors, this enzyme should be hydrolysing proteins from the nuclear matrix, or even, be involved in the final products of the DNA degradation (Harris et al., 1963 *apud* Love, 1969). These hypothesis for the nuclear phosphatase are not applied in the present study for females at beginning of feeding once there was found nuclear marking including in cells with activity characteristics.

The presence of this enzyme in the nucleus is doubtful as there are authors confirming it and others deny it stating that this marking occurs due to a special affinity of the chromatin to lead ions (Remy et al., 1975), or even, due to the lysosome enzyme diffusion to the nucleus (Washitani & Sato, 1976). Regarding the works with cells of corn roots, it was explained the presence of the nuclear acid phosphatase getting associated to an elevated cell metabolism (Deltour et al., 1981). This same relation would be a possible explanation to its presence in the interior of the nuclei of granular cells of females of *R. (B.) microplus* at beginning of feeding.

Few works about ticks describe the acid phosphatase and ATPase enzymatic activities in the salivary glands. Gill & Walker (1988) only mentioned a moderate activity of the acid phosphatase at the cone of fixation cement of the tick *Hyalomma anatolicum* to the host; however, this was not detected in the salivary glands, averse to fact observed for the glands of *R. (B.) microplus*. Qureshi et al. (1991) and Sauer &

Essenberg (1984) observed in the salivary glands of fecundated females of tick the highest activity ATPase rate, showing a parallel increase of the fluid secretion stimulated by dopamine and by cAMP. In the present study, contradictory, there was observed a little fall in the ATPase activity in some acini of semi-engorged individuals.

Weber (1969) had already described that concomitantly to the increase of the acid and alkaline phosphatases activities it would occur a decrease in the ATPase activity during the tissue degeneration. It is known that enzymatic alterations are also observed in the cell death processes by necrosis and apoptosis. In the present study, in some glandular acini of *R. (B.) microplus* semi-engorged females, it was detected a fall in the typical ATPase activity at the end of the cell death by apoptosis because they are at more advanced stage of degeneration, which could have required a large quantity of ATP, reinforcing that in the glandular degenerative process of this tick species, the death is by apoptosis.

The fact of the salivary glands of *R. (B.) microplus* females at beginning of feeding present large quantity of ATPase in the acinar cells indicates that these are found under intensive secretory activity. The presence of this enzyme in the acini basal membrane of *R. (B.) microplus* could be related to the need of energy supply for the transport of elements from the hemolymph to the lumen, as also suggested by Sauer et al. (2000).

In the salivary glands of *R. (B.) microplus* females at both feeding stages here studied, there were observed differences of marking for ATPase, including among acini of the same type, demonstrating asynchrony in the physiological activity of the salivary glands as found by Nunes et al. (2005) in previous work with the same species. There was also observed that some secretory cells of the types I and II acini have presented ATPase marking inside the nuclei corroborating Azeredo-Oliveira & Mello (1986) that also found in the euchromatin and nucleolus of the cells of Malpighian tubules of *T. infestans* and suggested that this enzyme would be involved in the transcriptional process and in the facilitation of the rDNA conformational changes.

The enzymatic activities found in the salivary glands of *R. (B.) microplus* are accorded with the physiology of these organs during the feeding process. In the

females at both feeding stages, the acid phosphatase would be, initially, acting in the control of the glandular secretion, not excluding the possibility of a function in the degenerative process, specifically in the semi-engorged females. In these glands, it was evident that the acid phosphatase might have a double origin that is, from the hemolymph and/or from the ribosomes, not being the same from the lysosomes. Thus, the activity of the acid phosphatase as well as the ATPase observed in semi-engorged *R. (B.) microplus* females strongly suggest the occurrence of death by apoptosis and not by autophagy or by necrosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research has been supported by FAPESP (grants 02/10149-7 and 04/03252-1). The authors thank Antonio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello Souza, Ronaldo Del Vecchio, Cristiane Marcia Mileo and Monika Iamonte for the technical support, and Karim C. Furquim for providing valuable comments. Part of this work has been facilitated through the Integrated Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTTD-3) supported by the European Union under contract number 510561-INCO.

REFERENCES

ARMBRUSTER, L.; LEVY, M.; MATHIEU, M. N.; BAUTZ, A. M. 1986. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera:Calliphoridae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 84B: 349-354.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. 1986. Mg^{2+} -dependent ATPase activity investigated on heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. *Rev. Bras. Genet.* IX, 2: 223-229.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. 1997. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, 92: 23-28.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. 1998. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, 93: 33-42.

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

BOWEN, I. D. 1981. Techniques for demonstrating cell death. In: BOWEN, I. D.; LOCKSHIN, R. A. (eds.). *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman and Hall, London and New York, 381-444.

BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M. 1990. Programmed cell death in tumours and tissues. London: Chapman and Hall, 289pp.

BOWEN, I. D.; MULLARKEY, K.; MORGAN, S. M. 1996. Programmed cell death in the salivary gland of the blow fly *Calliphora vomitoria*. *Microsc. Res. Tech.*, 34: 202-217.

BOWEN, I. D.; RYDER, T. A. 1974. Cell autolysis and deletion in the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. *Tiss. Cell. Res.*, 154: 265-274.

CRUZ- LANDIM, C.; MELO, R. A. 1981. Desenvolvimento e envelhecimento de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Aspectos histológicos e histoquímicos. *Aciesp*, v.31, São Paulo, 118p.

CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R. D.; CAVALCANTE, V. M. 2002. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. *Genet. Mol. Res.*, 1 (2): 131-138.

DELTOUR, R.; FRANSOLET, S.; LOPES, R. 1981. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo cells. *J. Cell Sci.*, 47: 77-89.

DePRIESTER, W.; VAN PELT-VERKUIL, E.; DeLEEUV, G. 1979. Demonstration of acid phosphatase activity induced by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Calliphora*. *Cell Tissue Res.*, 200: 435-442.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. 1988. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. *International Journal for Parasitology*, 18(1): 83-93.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. 1997. Programmed cell death in the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biol. Int.*, 21: 151-158.

HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. 1990. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. *Cell Biol. Int. Rep.*, 14 (9): 775-781.

JONES, H. E.; BOWEN, I. D. 1993. Acid phosphatase activity in the salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. *Cell Biol. Int.*, 17: 305-315.

L'AMOREAUX, W. J.; JUNAID, L.; TREVIDI, S. 2003. Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. *Tissue and Cell*, 35: 95-99.

LEVY, M.; BAUTZ, A. M. 1985. Degeneration of larval salivary glands during metamorphosis of the blowfly *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Insect Morphology Embriology*, 14: 281-290.

- LOCKSHIN, R. A. 1981. Cell death in metamorphosis. In: BOWEN, I.D. *Lysosomes in Biology and Pathology* . Ed. Chapman and Hall, London and New York, 79-121.
- LOVE, R.; STUDZINSKI, G. P.; WASH, R. J. 1969. Nuclear, nucleolar and cytoplasmic acid phosphatase in cultured mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, 58: 62-72.
- NUNES, E. T., BECHARA, G. H., SAITO, K. C., DENARDI, S. E., CAMARGO-MATHIAS, M. I. C. 2005. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). *Micron*, 36:437-447.
- QURESHI, A. E.; RODDY, C. W.; MUMMA, R. A.; ESSENBERG, R. C.; SAUER, J. R. 1991. Cyclic AMP and calcium modulated ATPase activity in the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Insect Biochemistry*, 21 (4): 399-405.
- REMY, L.; MICHEL-BECHET, M.; ATHORIEL-HAON, A. M. 1975. Étude critique de localisations phosphatasiques acides extralisosomiales de cellules folliculaires thyroïdiennes par la reaction de Gömöri. *Histochemistry*, 13: 1313-1345.
- RYDER, T.A.; BOWEN, I.D. 1975. A method for the fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 23: 235-237.
- SAUER, J. R, ESSENBERG, R. C., BOWMAN, A. S. 2000. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1069-1078.
- SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C. 1984. Role of cyclic nucleotides and calcium in controlling tick salivary gland function. *American Zoologist*, 24: 217-227.

SILVA DE MORAES, R. L. M. 1998. Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 97p.

SILVA DE MORAES, R. L. M.; BOWEN, I. D. 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biol. Int.*, 24 (10): 737-343.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. 2003. Estudo morfológico e da expressão gênica no processo degenerativo das glândulas de seda de larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 150pp.

SKELTON, J. K.; BOWEN, I. D. 1987. The cytochemical localization and backscattered electron images of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing *Calliphora vomitoria* larvae. *Epithelia*, 1 (3): 213-223.

SMITH, R. E.; FARQUHAR, M. G. 1966. Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.*, 31: 319-347, 1966.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; OSORNIO-VARGAS, A. R. 1981. Cell death and the disease process. The role of calcium. In: BOWEN, I. D.; LOCKSHIN, R. A. (eds.). *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman and Hall, New York, 209-242.

Van LANCKER, J. L. 1975. Hydrolases and cellular death. In: KEPPLER, D. (eds.). *Pathogenic Mechanisms of Liver cell death*, Lancaster: MT Press, 25-35.

WASHITANI, J.; SATO, S. 1976. On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. *Protoplasma*, 89: 157-170.

WEBER, R. 1969. Tissue involution and lysosomal enzymes during anuran metamorphosis. In: DINGLE, J. T.; FELL, H. B. (eds.). *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol.2. North Holland Publishing Co., Amsterdam and London, 437-461.

ZARA, F. J. 2002. Estudo químico, bioquímico e citoquímico da região posterior da glândula salivar de larvas do último estágio de formigas *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Hymenoptera: Formicide). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 217pp.

Discussão Final



V. DISCUSSÃO FINAL

As glândulas salivares dos carrapatos ixodídeos são órgãos que desempenham funções essenciais para a sobrevivência e sucesso evolutivo destes animais. Considerando sua complexidade, poucos trabalhos foram até agora desenvolvidos descrevendo as alterações morfológicas que ocorrem nestas estruturas durante o período de alimentação do carrapato no hospedeiro. Um exemplo foi o trabalho de Till, em 1961, que observou em carrapatos da espécie *Rhipicephalus appendiculatus* um aumento das glândulas salivares durante o processo de alimentação, seguido do início da degeneração das mesmas.

O presente estudo trouxe informações morfológicas em nível de microscopia de luz e eletrônica mostrando que as glândulas salivares das fêmeas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* também passam por modificações durante o período de alimentação, além de demonstrar quando e como ocorre o processo de degeneração nestas estruturas.

A microscopia eletrônica de varredura das glândulas de fêmeas de *R. (B.) microplus* confirmou a ocorrência de alterações apontando diferenças principalmente nos ácinos granulares. Além destas mudanças morfológicas, as glândulas salivares apresentaram alterações fisiológicas durante os estágios inicial de alimentação e semi-ingurgitado aqui analisados, onde as células que constituem os ácinos, antes eficientes na exclusão do corante Azul do Nilo, ou seja, completamente ativas ou em estágios iniciais de degeneração, mostraram posterior perda de atividade das bombas

de íons das membranas celulares demonstrado pelo acúmulo de corante no seu interior.

O primeiro estudo realizado com esta mesma espécie foi desenvolvido por Binnington, em 1978, que descreveu a morfologia das glândulas salivares destes carrapatos de ambos os sexos, além de ter citado a ocorrência de mudanças estruturais nestes órgãos durante todo o período de alimentação. O presente estudo, no entanto, vem estabelecer quando o processo degenerativo destas estruturas tem início em fêmeas de *R. (B.) microplus* mostrando que as mesmas começam a degenerar enquanto o animal ainda encontra-se em alimentação, contrariando todas as descrições existentes na literatura disponível sobre a morfo-fisiologia das glândulas de carrapatos.

Segundo Binnington (1978) a maioria das células dos ácinos II e todas dos ácinos III perderiam seus grânulos de secreção após aproximadamente 72 horas de alimentação, sendo observado apenas alguns grânulos PAS positivos nas células **b** e **c₃** do ácino tipo II. Os resultados aqui encontrados corroboram parcialmente este autor, uma vez que, apesar de confirmada a perda de grânulos de secreção, ficou ainda demonstrado, por meio das análises ultra-estruturais, que este evento ocorre em tempo menor e diferente daquele citado pelo mesmo autor, ou seja, alguma granulação citoplasmática pôde ser observada apenas nas glândulas daquelas fêmeas que estavam se alimentando há 24 a 48 horas, aproximadamente.

O presente estudo, com as glândulas salivares de fêmeas em início de alimentação, demonstrou que estas realmente parecem exercer funções relacionadas com a produção de cemento durante a fase de fixação do carrapato ao hospedeiro (WALKER et al., 1985), uma vez que foram aqui observadas células que perderam suas atividades nas primeiras horas de alimentação, ou seja, logo após a infestação. Estes dados estão baseados na observação de núcleos já condensados e picnóticos nas células **a** (ácino II), **d** e/ou **e** (ácino III) dos ácinos granulares através da coloração tanto pela hematoxilina como pela aplicação das técnicas do Azul de Toluidina e Reação de Feulgen.

Binnington (1978) ainda no seu primeiro estudo, observou que nas fêmeas com 72 horas de alimentação as células intersticiais presentes nos ácinos granulares ficariam mais visíveis e, juntamente com as células secretoras dos ácinos III

formariam agora uma camada que limitaria um amplo lúmen, antes não observado. Este aumento no tamanho das células intersticiais estaria relacionado com a função das mesmas, ou seja, a de transportar fluido para a concentração do sangue, estas então desenvolvendo um extenso labirinto basal durante a alimentação (COONS; L'AMOREAUX, 1986), como evidenciado por meio da microscopia eletrônica. Esta modificação foi também observada em secções histológicas de glândulas de fêmeas no presente estudo, porém, com 24 a 48 horas de alimentação, deixando claro que os eventos descritos por Binnington (1978) para esta mesma espécie ocorrem, na realidade, anteriormente àquele por ele proposto.

O trabalho aqui desenvolvido com fêmeas desta espécie de carrapatos, além de mostrar que as mudanças morfológicas ocorrem precocemente quando comparadas às informações descritas em trabalhos clássicos anteriores, identificou ainda, nas células destas estruturas, a presença das enzimas fosfatase ácida e ATPase, sendo a detecção desta última relatada pela primeira vez nas glândulas salivares de carrapatos. Binnington (1978) já havia previamente citado em seu trabalho que a fosfatase ácida estaria presente nas glândulas de fêmeas com 24 a 48 horas de alimentação, observando em microscopia de luz, reação fortemente positiva principalmente nos ácinos I e nas células **d** do ácino III. No entanto, no presente estudo com microscopia eletrônica em fêmeas nesta mesma fase de alimentação, esta enzima foi observada principalmente nas células intersticiais dos ácinos granulares, localizada por entre as membranas do labirinto basal e nas células secretoras em alguns tipos de grânulos de secreção, livre no citoplasma bem como no interior dos núcleos. A presença da fosfatase ácida especificamente no labirinto basal sugere que a mesma seria captada da hemolinfa enquanto que sua presença nas células secretoras indicaria a sua participação na regulação do processo secretor destes órgãos, bem como na degradação de proteínas, como já proposto por outros autores em trabalhos com outros invertebrados (SMITH; FARQUHAR, 1966; ARMBRUSTER et al., 1986; LEVY; BAUTZ, 1985; SILVA DE MORAES, 1998; ZARA, 2002).

Ainda com relação à presença de enzimas nas glândulas, a observação de forte marcação para ATPase nos três tipos de ácinos das fêmeas em início de alimentação confirmaram que as glândulas salivares, neste estágio, encontravam-se

em intensa atividade secretora e a sua localização nas membranas basais dos ácinos indicariam a necessidade de ATP principalmente para o transporte de íons e outras enzimas da hemolinfa para o lúmen acinar, não descartando, entretanto, a possibilidade de também haver transporte de substâncias do lúmen para a hemolinfa.

A degeneração das glândulas salivares dos carrapatos em geral é um assunto pouco estudado, existindo na literatura disponível apenas citações superficiais dos eventos que comumente ocorrem. Segundo a maioria dos trabalhos, que são em número pequeno, este processo inicia-se após o total ingurgitamento e conseqüente desprendimento destes animais de seus hospedeiros (VITZUM, 1943; TILL, 1961; L'AMOREAUX et al., 2003). O presente estudo, em contraposição, traz dados que demonstram que nas fêmeas da espécie *R. (B.) microplus* este processo inicia-se precocemente quando comparado às demais espécies de ixodídeos, ou seja, quando estas encontram-se ainda no estágio semi-ingurgitado.

A confirmação de que o processo de degeneração das glândulas salivares das fêmeas de *R. (B.) microplus* teria início no estágio de alimentação semi-ingurgitado decorre do fato de ter-se verificado um aumento da presença da fosfatase ácida, inclusive tomando locais diferentes na célula, à medida que o processo de alimentação avançava. Associado a este aumento, alterações celulares como a presença de vacúolos indicaram que a fosfatase ácida também poderia estar participando da queda de atividade da glândula, uma vez que é descrito que a presença desta enzima está freqüentemente associada com os processos de degeneração celular (LOCKSHIN, 1981).

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou, em glândulas salivares de fêmeas de *R. (B.) microplus*, células apresentando características indicativas de morte, tais como, perda das especializações de membrana (SEHNAL; AKAI, 1982; BOWEN; BOWEN, 1990), vesiculação do retículo endoplasmático (SILVA DE MORAES; BOWEN, 2000), presença de figuras mielínicas (CRUZ-LANDIM; SILVA DE MORAES, 1977), vacúolos autofágicos e lisossomos (ZAKERI; LOCKSHIN, 2002). Presença de muitos lisossomos e vacúolos autofágicos nas células é característica geralmente associada com a ocorrência de morte celular autofágica ou tipo 2 (CLARKE, 1990). Entretanto, nas fêmeas semi-ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, ficou demonstrada a presença de fosfatase ácida principalmente

localizada extracisterna ao retículo endoplasmático e não sendo liberada a partir de lisossomos como ocorreria se o caso fosse de morte celular autofágica. A presença desta enzima nas invaginações da membrana plasmática basal das células intersticiais e sob a forma livre no citoplasma das células secretoras, reforça a proposta de que a mesma, nestes artrópodos, tenha duas fontes de origem: uma exógena, ou seja, captada diretamente da hemolinfa, e a outra endógena, sendo sintetizada a partir dos ribossomos (BOWEN; RYDER, 1974).

Alterações morfológicas nos núcleos das células glandulares de outros animais, de maneira geral, têm sido apontadas como sinais indicativos de processo de degeneração (ZAKERI et al., 1993; KERR et al., 1995). Nas glândulas salivares de fêmeas semi-ingurgitadas de *R. (B.) microplus* os núcleos apresentaram diversas alterações morfológicas que permitiram classificá-los em diferentes estágios (I a V): que variaram desde aqueles ainda semi-preservados (no estágio I) até aqueles totalmente fragmentados e/ou participando da formação de corpos apoptóticos (no estágio V). Portanto, a observação destas características de degeneração nuclear, incluindo a condensação e marginalização cromatínica, descarta a idéia de que em glândulas salivares de *R. (B.) microplus* esteja ocorrendo morte celular tipo autofágica, uma vez que nessa a degradação do material genético seria um evento posterior à destruição citoplasmática (ZAKERI et al., 1993).

O presente estudo demonstrou também que a ATPase é uma enzima presente nos ácinos durante todo o processo de alimentação das fêmeas de *R. (B.) microplus* aqui estudadas. Naquelas em estágio semi-ingurgitado fica aqui demonstrado que o processo de morte celular nas glândulas se dá por apoptose, partindo do princípio de que o ATP é necessário para que alterações nucleares ocorram como, por exemplo, condensação da cromatina e seu deslocamento para a periferia com conseqüente formação de corpos apoptóticos (LEIST; NICOTERA, 1997). A presença constante da ATPase, neste caso, reforçaria a ocorrência da morte celular por apoptose e descartaria completamente a morte por necrose que, ao contrário da primeira, é um fenômeno multicelular (KERR et al., 1995) e tem como característica principal a queda na produção de ATP (BOWEN; BOWEN, 1990). Os dados aqui obtidos revelaram a existência de um assincronismo funcional entre os

diferentes tipos de ácinos e até mesmo entre as células secretoras, contrariando o que é descrito para necrose.

Assim, diante dos resultados obtidos, o presente trabalho deixa claro que o processo de degeneração das glândulas salivares de fêmeas de *R. (B.) microplus* tem início ainda quando estas encontram-se no estágio semi-ingurgitado e que as células morrem por apoptose. Fica também aqui demonstrado que a degeneração das glândulas salivares destas fêmeas não é um processo sincrônico, sendo observadas características degenerativas ocorrendo primeiro nos ácinos granulares e depois nos ductos excretores e nos ácinos I. Ainda nestas fêmeas, fica estabelecido que os ductos excretores entram em degeneração antes de terminado o processo de alimentação e que o tipo de morte que os atinge também é o apoptótico e não o necrótico como sugerido por L'Amoreaux et al. (2003) ao analisar carrapatos *Dermacentor variabilis*.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

Por meio da aplicação de técnicas morfológicas de microscopia de luz e eletrônica nas glândulas salivares de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nos estágios inicial (24 a 48 horas) de alimentação e semi-ingurgitado (4 a 5 dias), o presente estudo demonstrou que:

1) as fêmeas em início de alimentação apresentam suas glândulas salivares com a maioria das células secretoras em atividade;

2) alterações morfológicas glandulares ocorrem durante o processo de alimentação, acontecendo precocemente nas fêmeas desta espécie, quando comparadas às outras espécies descritas na literatura;

3) a degeneração destes órgãos tem início nas fêmeas em estágio semi-ingurgitado, ou seja, enquanto as mesmas ainda se encontram em alimentação no hospedeiro;

4) a degeneração glandular é um processo assincrônico nesta espécie, sendo observadas células e/ou ácinos em falência, em meio àqueles ainda em atividade;

5) os ácinos tipo I, bem como os ductos excretores já apresentam características degenerativas nas fêmeas ainda no estágio semi-ingurgitado, contrariando dados da literatura;

6) a fosfatase ácida presente nas glândulas salivares não é de origem lisossômica nesta espécie, sendo provavelmente, oriunda da hemolinfa e/ou sintetizada pelos ribossomos;

7) aumenta a presença da fosfatase ácida nas células à medida que o processo de alimentação avança, com provável papel da mesma no controle do metabolismo secretor da glândula, ou ainda, com participação no processo de degeneração já em fêmeas semi-ingurgitadas;

8) presença de ATPase nas glândulas das fêmeas em início de alimentação sugere a necessidade de energia para o transporte de substâncias da hemolinfa para o lúmen acinar, e/ou vice-versa; já nas fêmeas semi-ingurgitadas esta pode estar relacionada com o processo de degeneração;

9) nesta espécie, descarta-se a ocorrência da morte autofágica ou necrótica nas glândulas salivares, sendo as células dos ácinos atingidas pela apoptose, da mesma forma que as dos ductos excretores, contrariando o que é descrito na literatura, que relata que estas últimas estruturas morrem por necrose.

Referências

VII. REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R. **Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIs) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovinos.** 2002. 98p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

ARMBRUSTER, L.; LEVY, M.; MATHIEU, M. N.; BAUTZ, A. M. Acid phosphatase activity in the hemolymph, hemocytes, fat body and salivary glands during larval and prepupal development in *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Tarrytown, v. 84B, n.3, p. 349-354, 1986.

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

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. **Cytobios**, Cambridge, v. 92, p. 23-28, 1997.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. Mg^{2+} -dependent ATPase activity investigated on heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. IX, n. 2, p. 223-229, 1986.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MELLO, M. L. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. **Cytobios**, Cambridge, v. 93, p. 33-42, 1998.

BALASHOV, Yu. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)- vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, Lanham, v.8, p. 161-376, 1972.

BALASHOV, Yu. S. **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. In: RAIKHEL, A. S.; HOOGSTRAAL, I. I. (ed.), Entomological Society of America (Special Publication), Lanham, 1983. 289p.

BARKER, D. M.; OWNBY, C. L.; KROLAK, J. M.; CLAYPOOL, P.L.; SAUER, J. R. The effects of attachment, feeding and mating on the morphology of type I alveolus of salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 70, p. 99-113, 1984.

BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R. A. The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 79, p. 215-235, 1982.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). Influences of temperature, humidity and light. **Acarologia**, Paris, v. 16, p. 250-257, 1974.

BERGES, R.; ISAACS, J. T. Programming events in the regulation of cell proliferation and death. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 39, p. 356-361, 1993.

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

BINNINGTON, K. C.; STONE, B. F. Distribution of catecholamines in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, New York, v. 58 (1C), p.21-28, 1977.

BOWEN, I. D. **Cell Aging and Cell Death**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 1-35.

BOWEN, I. D. Techniques for demonstrating cell death. In: BOWEN, I. D.; LOCKSHIN, R. A. (eds.). **Cell Death in Biology and Pathology**. New York: Chapman and Hall, 1981. p. 381-444.

BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M. **Programmed cell death in tumours and tissues**. London: Chapman and Hall, 1990. 289p.

BOWEN, I. D.; MORGAN, S. M.; MULLARKEY, K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. **Cell Biology International Reports**, London, v. 17, p. 13-34, 1993.

BOWEN, I. D.; MULLARKEY, K.; MORGAN, S. M. Programmed cell death in the salivary gland of the blow fly *Calliphora vomitoria*. **Microscopy Research and Technique**, New York, 34: 202-217. 1996.

BOWEN, I. D.; RYDER, T. A. Cell autolysis and deletion in the planarian *Polycelis tenuis* Iijima. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 154, p. 265-274, 1974.

BOWMAN, A. S.; COONS, L. B.; NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.11, p. 277-285, 1997.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K., Immunology of interactions between ticks and host. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 11, p. 270-276, 1997.

BUENDIA, B., SANTA-MARIA, A., AND COURVALIN, J. C. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 112, p. 1743–1753, 1999.

BURSCHE, W.; KLEINE, L.; TENNISWOOD, M. Biochemistry of cell death by apoptosis. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 68, p. 1071-1074, 1990.

CAMICAS, J. L.; MOREL, P. C. Position systematique et classification des tiques (Acarida: Ixodida). **Acarologia**, Paris, v. 18, p. 410-420, 1997.

CAVALCANTE, W. M. **Reorganização do intestino médio em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) durante a metamorfose: estudos ultra-estruturais e citoquímicos**. 1998. 134p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 1998.

CHINERY, W. A. The nature and origin of the ‘cement’ substance at the site of attachment and feeding of adult *Haemaphysalis spinigera* (Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 10, p. 355-362, 1973.

CHINERY, W.; AYITEY-SMITH, E. Histamine blocking agent in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. **Nature**, London, v. 265, p. 366-367, 1977.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embriology**, Berlin, v. 181, p. 195-213, 1990.

COHEN, M.; LEE, K. K.; WILSON, K. L.; GRUENBAUM, Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the function evolution of the nuclear lamina. **Trends in Biochemical Science**, Kidlington, v. 26, p. 41-47, 2001.

COONS, L. B. ALBERTI, G. The Acari ticks. In: F. W. HARRISON; R. FOELIX (ed). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Chelicerate. Arthropoda, New York: Wiley-Liss, v. 8B, 1999. p. 267-514.

COONS, L. B. KAUFMAN, W. R. Evidence that developmental changes in type III acini in the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari:Ixodidae) are initiated by hemolymph-borne factor. **Experimental and Applied Acarology**, London, v.4, p. 117-139, 1988.

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

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

COONS, L. B.; ROSHDY, M. Fine structure of the salivary glands of unfed *Dermacentor variabilis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 59, p. 900-912, 1973.

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

CRAUSE, J. C.; VERSCHOOR, J. A.; COETSEE, J.; HOPPE, H. C.; TALJAARD, J. N. GOTHE, R.; NEITZ, A. The localization of a paralysis toxin in granules and

nuclei of prefed *Rhipicephalus evertsi evertsi* tick salivary-glands-cells. **Experimental and Applied Acarology**, London, v. 17, n. 5, p. 357-363, 1993.

CRUZ- LANDIM, C.; MELO, R. A. **Desenvolvimento e envelhecimento de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Aspectos histológicos e histoquímicos.** São Paulo: Aciesp, v.31, 1981. 118p.

CRUZ-LANDIM, C. Cell reorganization and cell death during the secretory cycle of the hypopharyngeal gland in Meliponinae bee workers (Hymenoptera: Apidae). **Acta Microscopica**, Supl. B. Proc. XVI Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy, v. 6., p.75-78, 1997.

CRUZ-LANDIM, C.; COSTA, R. A. C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Hypopharyngeal gland function, glandular cell senescence and gland reactivation. **Proceedings of the 4th. International Hymenopterists Conference**, 1999.

CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R. D.; CAVALCANTE, V. M. Cell nucleus activity during post-embryonic development of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Intranuclear acid phosphatase. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, p. 131-138, 2002.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Estruturas degenerativas nas glândulas hipofaríngeas de operárias de *Apis mellifera* (Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 681-692, 1977.

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

DAI, J. D., GILBERT, L. I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 69-78, 1997.

De PRIESTER, W.; VAN PELT-VERKUIL, E.; De LEEUW, G. Demonstration of acid phosphatase activity induced by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Calliphora*. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 200, p. 435-442, 1979.

DELTOUR, R.; FRANSOLET, S.; LOPES, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo cells. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 47, p. 77-89, 1981.

DENARDI, S. E. 2002. **Caracterização morfológica interna e externa do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)**. 2002. 65pp. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2002.

DIMITRIADIS, V. K.; KASTRITSIS, C. D. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae. Distribution of alkaline phosphatase leucine aminopeptidase and glycogen phosphorylase. **Cytologia**, Tokio, v. 50, p. 690-700, 1985.

ELLIS, R. E.; YUAN, J.; HORVITZ, H. R. Mechanism and function of cell death. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 7, p. 663-698, 1991.

EL-SHOURA, S. M. Ultrastructure of salivary glands of *Ornithodoros (Ornithodoros) moubata* (Ixodoidea: Argasidae). **Journal of Morphology**, New York, v. 186, p. 45-52, 1985.

FARIAS, N. A. **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Guaíba: Agropecuária, 1995.

FAWCETT, D. W.; BINNINGTON, K. C.; VOIGHT, W. R. The cell biology of the ixodid tick salivary gland. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A. (ed.) **Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p.22-45.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch – Chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhend elective Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten Hoppe-Seylers **Zeitschrift für Physiologische Chemie**, Strassburg, v.135, p.203-248, 1924.

FREITAS, M. G. **Entomologia e Acarologia Médica e Veterinária**. Belo Horizonte: Precisa, 1982. 253p.

FURQUIM, K. C. S.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Morphological modifications induced by an artificial diet on the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) during their degenerative process. **Sociobiology**, Chico, v. 43, n. 2, p. 279-291, 2004.

GECZY, A. F.; NAUGHTON, M. A.; CLEGG, J. B.; HEWETSON, R. W. Esterases and a carbohydrate splitting enzyme in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 57, p. 437-438, 1971.

GILL, H. S.; WALKER, A. R. The salivary glands of *Hyalomma anatolicum anatolicum*: nature of salivary gland components and their role in tick attachment and feeding. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 83-93, 1988.

GONZALES, J. C. 1995. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. Programmed cell death in the honeybee (*Apis mellifera*) larvae midgut. **Cell Biology International**, London, v. 21, n. 3, p. 151-158, 1997.

GREGSON, J. D. Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. **Parasitology**, Cambridge, v. 57, p.1-8, 1967.

HALABY, R.; ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Metabolic events during programmed cell death in insect labial glands. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 72, p. 597-601, 1994.

HAMMAR, S. P.; MOTTET, N. K. Tetrazolium salt and electron microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of developing chick limb. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 8, p. 229-231, 1971.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Ecdysteroids: possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the tick, *Amblyomma hebraeum*. **Experientia**, Basel, v. 41, p. 740-741, 1985.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 27, p. 241-248, 1981.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 109, p. 281-290, 1984.

HARWOOD, R.F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7. ed. New York: Macmillan Publishing Co., 1979. 548p.

HENGARTNER, M. O. Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Recent Progress in Hormone Research**, Bethesda, v. 54, p. 213–222, 1999.

HIGGS, G. A.; VANE, J. R.; HART, R. J.; POTTER, C; WILSON, R. G. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, v. 66, p. 665-670, 1976.

HOWELL, C. J.; NEITZ, A. N. H.; POTGIETER, D. J.J. Some toxic, physical and chemical properties of the oral secretion of the tsetse fly, *Ornithodoros savignyi* (1927). Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**, Indore, v. 42, p. 99 – 102, 1975.

HUSSEIN, M. A.; BOWEN, I. D.; LEWIS, G. H. The histochemical localization of ATPase, cholinesterase and acid phosphatase activity in *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) larvae using a methacrylate embedding technique. **Cell Biology International Reports**, London, v. 14, n. 9, p. 775-781, 1990.

JIMENEZ, D. R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of the acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 61, p.431-443, 1990.

JOCHOVÁ, J.; ZAKERI, Z.; LOCKSHI, R. A. Protein synthesis, DNA degradation, and morphological changes during programmed cell death in labial glands of *Manduca sexta*. **Developmental Genetics**, New York, v. 21, p. 249-257, 1997b.

JONES, H. E.; BOWEN, I. D. Acid phosphatase activity in the salivary glands of developing *Drosophila melanogaster*. **Cell Biology International**, London, v. 17, p. 305-315, 1993.

JONES, H. **Programmed cell death in the larval salivary glands of *Drosophila melanogaster***. 1990. 322p. PhD Thesis. University of Wales, Cardiff, 1990.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983. p. 48-81.

JUNQUEIRA, L. C. U.; SALES, L. M. M. **Ultra-estrutura e função celular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975. 121p.

KAUFMAN, W. R. The influence of various factors on fluid secretion by *in vitro* salivary glands of ixodid ticks. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 64, p.: 727-742, 1976.

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

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

KAUFMAN, W. R.; LOMAS, L. O. Male factors in ticks: Their role in feeding and egg development. **Invertebrate Reproduction and Development**, Rehovot, v. 30, p. 191-198, 1996.

KAUFMAN, W. R.; PHILLIPS, J. E. Ion and water balance in the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. I. Mechanism and control of salivary secretion. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 58, p. 537-547, 1973b.

KEMP, D. H.; STONE, B. F.; BINNINGTON, K. C. Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. (ed.). **Tick Physiology**. Oxford: Pergamon Press, 1982.

KERR, J. F. R.; GOBÉ, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMONT, B. V. Anatomical methods in Cell Death. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. (ed.). **Cell Death**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 1-27.

KIDD, V. J. Proteolytic activities that mediate apoptosis. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 60, p. 533-573, 1998.

KLOMPEN, J. S. H.; BLACK, W. C.; KEIRANS, J. E.; OLIVER Jr, J. H. Evolution of ticks. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p. 141-161, 1996.

KROLAK, J.M.; OWNBY, C. L.; SAUER, J. R. Alveolar structure of salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* unfed females. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 68, p. 61-82, 1982.

KÜNSBERG, K. V. Eine Anticoagulindrüse bei Zecken. **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v. 38, p. 263-268, 1911.

LAICINE, E. M.; FERNANDEZ, M. A. ; SAUAIA, H.. Acid phosphatase activity in mature secretory granules of *Bradysia hyjida*. **Journal of Morphology**, New York city, v. 208, p. 247-255, 1991.

L'AMOREAUX, W. J.; JUNAID, L.; TREVIDI, S. Morphological evidence that salivary gland degeneration in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say), involves programmed cell death. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 35, p. 95-99, 2003.

LANE, N. J. Distribution of phosphatase in the Golgi region and associated structures of the thoracic ganglionic neurons in the grasshopper *Melanoplus differentialis*. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 37, n. 1, p. 89-104, 1968.

LAVOIEPIERRE, M. M. J.; RIEK, R. F. Observations on the feeding habits of argasid ticks and on the effect of their bites on laboratory animals, together with a note on the production of coxal fluid by several of the species studied. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon, v. 99, p.96-113, 1955.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 286, p. 1-9, 1997.

LEVY, M.; BAUTZ, A. M. Degeneration of larval salivary glands during metamorphosis of the blowfly *Calliphora erythrocephala* Meigen (Diptera: Calliphoridae). **International Journal of Insect Morphology and Embriology**, Oxford, v. 14, p. 281-290, 1985.

LOCKSHIN, R. A. Cell death in metamorphosis. In: BOWEN, I.D. **Lysosomes in Biology and Pathology**. New York: Chapman and Hall, 1981. p. 79-121.

LOCKSHIN, R. A.; ABLES, A.; KODAMAN, N.; ZAKERI, Z. F. Programmed cell death and apoptosis: early DNA degeneration does not appear to be prominent in either embryonic cell death or metamorphosis of insects. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 115, p.41, 1991.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. F. Physiology and protein synthesis in programmed cell death. Early synthesis and DNA degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 663, p. 234-249, 1992.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. F. Programmed cell death: early changes in metamorphosing cells. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 72, p. 589-596, 1994.

LOMAS, L. O.; GELMAN, D.; KAUFMAN, W. R. Ecdysteroid regulation of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: a reconciliation of *in vivo* and *in vitro* observations. **General and Comparative Endocrinology**, Orlando, v. 109, p. 200-211, 1998.

LOMAS, L. O.; KAUFMAN, W. R. An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Bonn, v. 21, p.169-178, 1992b.

LOMAS, L. O.; KAUFMAN, W. R. The influence of a factor from the male genital tract on salivary gland degeneration in the female ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, p. 595-601, 1992a.

LOVE, R.; STUDZINSKI, G. P.; WASH, R. J. Nuclear, nucleolar and cytoplasmic acid phosphatase in cultured mammalian cells. **Experimental Cell Research**, Orlando v. 58, p. 62-72, 1969.

MAO, H.; KAUFMAN, W. R. Profile of the ecdysteroid hormone and its receptor in the salivary gland of the adult female tick, *Amblyomma hebraeum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 33-42, 1999.

MATHIAS DA SILVA, E. C. A Base Genética e o Controle Molecular da Morte Celular Programada. In: **Seminários de Biologia Celular: Diferenciação, Senescência e Morte Celular Programada**. Unesp, Instituto de Biociências, Rio Claro, v. 3, 1999. 18 p.

McCONKEY, J.; ORRENIUS, S.; JONDAL, M. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). **Immunology Today**, Cambridge, v. 11, p. 120-121, 1990.

MEGAW, M. W. J. **Structure and function of the salivary glands of the tick *Boophilus microplus***. PhD Thesis, University of Cambridge, Cambridge, 1976.

MEGAW, M. W. J.; BEADLE, D. J. Structure and function of the salivary glands of the tick, *Boophilus microplus* Canestrini (Acarina: Ixodidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v.8, p. 67-83, 1979.

- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. **Práticas de Biologia Celular**. Campinas: Edgard Blucher, 1980. 71p.
- MEREDITH, J.; KAUFMAN, W. R. A proposed site of fluid secretion in the salivary gland of the ixodid tick *Dermacentor andersoni*. **Parasitology**, Cambridge, v. 67, p. 205-217, 1973.
- MOORHOUSE, D. E.; TATCHELL, R. J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). A study in host-parasite relations. Part I: Attachment to the host. **Parasitology**, Cambridge, v. 56, p. 623-632, 1966.
- MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, Dordrecht, v. 56, p. 169-172, 2003.
- MURREL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 21, n. 2, p. 244-258, 2001.
- NEEDHAM, G. R.; GREENWALD, L.; FRED, T. J.; COONS, L. B. The ultrastructure of the tick (*Amblyomma americanum*) salivary gland acini responsible for secretion of the hygroscopic fluid and localization of $\text{Na}^+ / \text{K}^+ = \text{ATPase}$. **American Zoologist**, Lawrence, v. 23, p.1013, 1983.
- NEEDHAM, G. R.; ROSELL, R.; GREENWALD, L.; COONS, L. B. Ultrastructure of type-I salivary gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on the type-I acini of *Amblyomma americanum*. **Experimental and Applied Acarology**, London, v. 10, p. 83-104, 1990.
- NEEDHAM, G. R.; SAUER, J. R. Control of fluid secretion by isolated salivary glands on the lone star tick. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 21, p. 1893-1898, 1975.
- NEEDHAM, G. R.; TEEL, P. D. Water balance by ticks between blood meals. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A.(ed.). **Morphology, Physiology and Behavioral biology of ticks**. Chichester: Ellis Horwood, 1986. p. 100-151.
- NEUMANN, L. G. Notes sur les Ixodidés. II. **Archives de Parasitologie**, Paris, v. 8, p. 444-464, 1904.

- NUNES, E. T.; BECHARA, G. H.; SAITO, K. C.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. C. Morphological, histological, and ultrastructural characterization of degenerating salivary glands in females of the cattle-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae). **Micron**, Oxford, v. 36, p.437-447, 2005.
- NUTTAL, G. H. F.; STRICKLAND, C. On the presence of an anticoagulin in the salivary glands and the intestines of *Argas persicus*. **Parasitology**, Cambridge, v. 1, p.300-10, 1908.
- OAKS, J. F.; MCSWAIN, J. L.; BANTLE, J. A.; ESSENBERG, R. C.; SAUER, J. R. Putative new expression of genes in ixodid tick salivary gland development during feeding. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 77, p. 378–83, 1991.
- OLIVEIRA, P. R. **Estudo morfológico comparativo das glândulas salivares de carrapatos fêmea de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) coletados no Brasil e na Argentina**. 2003. 64p. Trabalho de Conclusão de curso (Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 2003.
- OLIVER, J. H. Jr. **Undescribed glandular tissues from *Amblyomma tuberculatum* (Arachnida/ Parasitiformes: Ixodidae)**. Bull. ASB, v.21, n. 2, 1974, 72 p.
- PAESEN, G. C.; ADAMS, P. L.; HARLOS, K.; NUTTAL, P. A.; STUART, D. I. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 3, p. 661-671, 1999.
- PEREIRA, M. C. ***Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica**. Rio de Janeiro: Químico Divisão Veterinária, 1982.
- QURESHI, A. E.; RODDY, C. W.; MUMMA, R. A.; ESSENBERG, R. C.; SAUER, J. R. Cyclic AMP and calcium modulated ATPase activity in the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 399-405, 1991.
- RAO, L.; PEREZ, D.; WHITE, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 135, p. 1441-1455, 1996.
- REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. Morphological characterization of cell death during ovary differentiation in worker honeybee. **Cell Biology International**, London, v. 26, n. 3, p. 243-251, 2002.

REMY, L.; MICHEL-BECHET, M.; ATHORIEL-HAON, A. M. Étude critique de localizations phosphatasiques acides extralisosomiales de cellules folliculaires throidiennes thyroïdiennes par la reaction de Gömori. **Histochemistry**, Berlin, v. 13, p. 1313-1345, 1975.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 633-641.

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious Agents and Disease**, [S. I.], v. 4, p. 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J. M. C.; MAKOUL, G.T.; LEVINE, J; ROBINSON, D. K.; SPILMAN, A. Antihaemostatic, inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva tick, *Ixodes dammini*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 161, p. 332-344, 1985.

RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. *Ixodes scapularis*. Salivary kininase activity is a metallo-dipeptidyl carboxypeptidase. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 89, p.213-221, 1998.

ROBINSON, L. E. DAVIDSON, J. The anatomy of *Argas persicus* (Oken, 1818). Part 2 – **Parasitology**, Cambridge, v. 6, p. 217-56, 1913b.

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

RUPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 642-651.

RYDER, T. A.; BOWEN, I.D. A method for fine structural localization of acid phosphatase activity using p-nitrophenyl phosphate as substrate. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v.23, p.235-237, 1975.

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

SAUER, J. R.; ESSENBERG, R. C. Role of cyclic nucleotides and calcium in controlling tick salivary gland function. **American Zoologist**, Lawrence, v. 24, p. 217-227, 1984.

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

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

SAUER, J. R.; McSWAIN, J. L.; BOWMAN, A. S.; ESSENBERG, R. C.. Tick salivary gland physiology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 40, p. 245-267, 1995.

SAUNDERS, J. W.; GASSELING, M. T.; SAUNDERS, L. C. Cellular death in morphogenesis of the avian Wing. **Developmental Biology**, San Diego, v. 5, 1962. 146p.

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

SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A. **Methods in Cell Biology**. San Diego: Academic Press, v. 46, 1995. 459p.

SEHNAL, F.; AKAI, H. Insect silk glands: their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 79-132, 1990.

SEHNAL, F.; AKAI, H. Ultrastructure and function of silk glands in *Galleria mellonella*. In: AKAI, H.; KING, R. C.; MOROHOSHI, S. (ed.). **The ultrastructure and functioning of cells**. Tokio: Soc. For Insect Cells Japan, 1982. p. 135-138.

SERRA-FREIRE, N. M.; OLIVIERI, J. A. Estádio adulto do ciclo de *Amblyomma cajennense*. **Arquivos da Faculdade**, [S.I.], v. 20, p. 224-234, 1992.

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

SILVA DE MORAES, R. L. M. **Morte celular nas glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 1998. 97p. Tese (Livre Docência), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 1998.

SILVA DE MORAES, R. L. M.; BOWEN, I. D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera*). **Cell Biology International**, London, v. 24, n. 10, p. 737-743, 2000.

SILVA DE MORAES, R. L. M.; SILVA, R. M.; CRUZ-LANDIM, C. Citoquímica ultra-estrutural na avaliação dinâmica do processo secretor em glândulas exócrinas de meliponíneos (Hymenoptera: Apidae). **Anais do II Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, p. 78-86, 1996b.

SILVA, E. C. M.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Silk gland degeneration of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Acta Microscopica**, Caracas, v. 8 (Suppl B), p. 93, 1999.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. **Estudo morfológico e da expressão gênica no processo degenerativo das glândulas de seda de larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae)**. 2003. 150p Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2003.

SKELTON, J. K.; BOWEN, I. D. The cytochemical localization and backscattered electron imaging of acid phosphatase and cell death in the midgut of developing *Calliphora vomitoria* larvae. **Epithelia**, Oxford, v. 1, p. 213-223, 1987.

SMITH, R. E.; FARQUHAR, M. G. Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 31, p. 319-347, 1966.

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

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. 3. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, vol. 8, 1977. p. 23-524.

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

TATCHELL, R. J.; CARNELL, R.; KEMP, D. H. Electrical studies on the feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift fuer Parasitenkunde**, Berlin, v. 38, p.32-44, 1972.

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

TOMAINO, G. A. **Alterações celulares e da secreção na degeneração das glândulas de seda de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apinae) sob ação do hormônio juvenil**. 2003. 92p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2003.

TRUE, G. H. Studies of the anatomy of the Pajoroello tick, *Ornithodoros coriaceus* Koch. I. The alimentary canal. – **University of California Publication in Entomology**, Berkeley, v.6, p. 21-48, 1932.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; OSORNIO-VARGAS, A. R. Cell death and the disease process: the role of the calcium. In: BOWEN, I.D.; LOCKSHIN, R. A. (ed.). **Cell Death in Biology and Pathology**. London: Chapman and Hall, 1981. p. 209-242.

TZUR, Y. B.; HERSH, B. M.; HORVITZ, R.; GRUENBAUM, Y. Fate of the Nuclear Lamina during *Caenorhabditis elegans* Apoptosis. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 137, p. 146-153, 2002.

Van LANCKER, J. L. Hydrolases and cellular death. In: KEPPLER, D. (ed.). **Pathogenic Mechanisms of Liver Cell Death**, Lancaster: MT Press, 1975. p.25-35.

Van PELT VERKUIL, E. The induction of lysosomal activity in the fat body of *Calliphora erythrocephala*: changes in the internal enviroment. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 26: p. 91-101, 1980.

VITZHUM, H. G. Acarina. In: Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreiches, 5: IV. Abt., 5. Buch. Leipzig, Becker u. Erler, 1943.

WALKER, A. **Arthropods of domestic animals. A guide to preliminary identification**. London: Chapman and Hall, 1994. p. 25-29.

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

WALKER, N. I.; HARMON, B. V.; GOBE, G. C.; KERR, J. F. R. Patterns of cell death. **Methods and Achievements in Experimental Pathology**, Basel, v. 13, p. 18-54, 1988.

WALL, R.; SHEARER, D. **Veterinary Entomology**. London: Chapman and Hall, 1997. p.43-139.

WASHITANI, J.; SATO, S. On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. **Protoplasma**, Vienna, v. 89, p. 157-170, 1976.

WEBER, R. Tissue involution and lysosomal enzymes during anuran metamorphosis. In: DINGLE, J. T.; FELL, H. B. (ed.). **Lysosomes in Biology and Pathology**, Amsterdam: North Holland Publishing Co., vol.2., 1969. p. 437-461.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. The relationship between 'critical weight' and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, p. 1261-1267, 2001.

WEISS, B. L.; KAUFMAN, W. R. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Allahabad, v. 101, n. 16, p. 5874-5879, 2004.

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

WILLADSEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-Borne Diseases. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 7, p. 258-62, 1999.

WILLADSEN, P.; RIDING, G. A. On the biological role of a proteolytic enzyme inhibitor from the ectoparasitic tick *Boophilus microplus*. **The Biochemical Journal**, London, v. 189; p. 295-303, 1980.

WORRIL, N. A. **Studies on the cell biology and histopathology of *Heliothus armigera* midgut**. 1991. 193pp. PhD Thesis. University of Wales, Cardiff, 1991.

WYLLIE, A. H. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: BOWEN, I. D.; LOCKSHIN, R. A. (ed.). **Cell death in biology and pathology**. New York: Chapman and Hall, 1981. p. 9-34.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-556, 1980.

ZAKERI, Z. F.; QUAGLINO, D.; LATHAM, T.; LOCKSHIN, R. A. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 7, p. 470-478, 1993.

ZAKERI, Z.; BURSCH, W.; TENNISWOOD, M.; LOCKSHIN, R. A. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? **Cell Death and Differentiation**, [S. I.], v. 2, p. 87-96, 1995.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 265, p. 3-20, 2002.

ZARA, F. J. 2002. **Estudo químico, bioquímico e citoquímico da região posterior da glândula salivar de larvas do último estágio de formigas *Pachycondyla* (=Neoponera) villosa (Hymenoptera: Formicidae)**. 2002. 217p. Tese (Doutorado em Zoologia), Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro, 2002.

Rio Claro, 22 de Fevereiro de 2006.

Orientada:

Erika Takagi Nunes

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias