

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DO LOBO OLFATIVO DO
CARRAPATO**
Amblyomma sculptum (ACARI: IXODIDAE)

Karolina Martins Ferreira Menezes
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lígia Miranda Ferreira Borges

GOIÂNIA
2017



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Karolina Martins Ferreira Menezes

Título do trabalho: RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DO LOBO OLFATIVO DO CARRAPATO
Amblyomma sculptum (ACARI: IXODIDAE)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Karolina M. F. Menezes
Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 29 / 03 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

KAROLINA MARTINS FERREIRA MENEZES

**RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DO LOBO OLFATIVO DO
CARRAPATO
Amblyomma sculptum (ACARI: IXODIDAE)**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa:

Parasitos e Doenças parasitárias dos animais

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Lígia Miranda Ferreira Borges

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares – EVZ/UFG

Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes – IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Martins Ferreira Menezes, Karolina
Reconstrução Tridimensional do Lobo Olfativo do Carrapato
Amblyomma sculptum (ACARI: IXODIDAE) [manuscrito] / Karolina
Martins Ferreira Menezes. - 2017.
xv, 41 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges; co
orientador Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares ; co-orientador Dr.
Welber Daniel Zanetti Lopes .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui mapas, fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. *Amblyomma sculptum*. 2. glomérulos. 3. lobos olfativos. 4. órgão
de Haller. 5. reconstrução 3D. I. Miranda Ferreira Borges, Lígia, orient.
II. Título.

CDU 576.8

King M P Borog
Katie Marie Farnaday

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges** lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges

Profa. Dra. Kátia Maria Famadas

Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Lígia M.F. Borges
Kátia Maria Famadas
Caio Márcio de Oliveira Monteiro

Dedico a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde, perseverança e sabedoria na realização e concretização deste projeto.

Aos meus pais, Odair Francisco Ferreira da Silveira e Wânia de Cássia Martins Oliveira. À minha família, em especial minha avó Terezinha Martins de Oliveira e minha irmã Patricia Martins Oliveira da Silva. Ao "vô João Antônio" (*in memoriam*) pelas boas lembranças e eternas saudades. Ao meu querido Diogo de Carvalho Menezes pelo carinho, companheirismo, paciência, atenção e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Miranda Ferreira Borges pela orientação, paciência, atenção e prontidão em todos os momentos de dúvidas e dificuldades.

As professoras do Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFG que me auxiliaram durante esta jornada na realização do experimento, Prof^a. Dr^a. Simone Maria Teixeira de Sabóia-Morais e Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Parente. Ao Dr. Claudio Pereira Figueira da Plataforma de Microscopia do Instituto Gonçalo Muniz Fiocruz Bahia pelo auxílio na aquisição das imagens geradas pelo microscópio confocal.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFG, Prof. Dr. Welber Daniel Zanetti Lopes e Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro pelos conhecimentos compartilhados e aos amigos e colegas que me ajudaram na condução dos experimentos e contribuíram para a ampliação dos meus entendimentos na área, Lorena Lopes Ferreira, Jaires Gomes de Oliveira Filho, Fernanda de Oliveira Silva, Leonardo Bueno Cruvinel e Luiza Gabriella Ferreira de Paula.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia pela minha formação profissional e pela oportunidade em participar deste programa. Aos meus professores, pelos conhecimentos transmitidos e pela disposição e empenho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos. E à Plataforma de Microscopia do Instituto Gonçalo Muniz Fiocruz Bahia pela oportunidade em conhecer o instituto e pelo serviço de microscopia confocal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Gênero <i>Amblyomma</i>	3
2.2 Estrutura sensorial	5
2.2.1 Órgão de Haller	8
2.3 Sistema Nervoso	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Materiais	16
4.1.1 Local e duração do experimento.....	16
4.1.2 Obtenção de carrapatos adultos não alimentados	16
4.2 Métodos	16
4.2.1 Preenchimento anterógrado dos nervos olfativos até o singânglio.....	16
4.2.2 Microscopia e análise computacional tridimensional.....	18
4.3 Análise Estatística	19
5 RESULTADOS	20
5.1 Número e volume dos glomérulos.....	21
5.2 Análise Quantitativa	24
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXO	40

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense* sensu strictu, *Amblyomma cajennense* sensu lato e *Amblyomma sculptum* de acordo com estudo realizado por Martins et al³³ (A). Carrapatos fêmea (B) e macho (C) de *Amblyomma sculptum* encontrados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e partes da Sul e Nordeste. Fonte: Adaptado de Martins³³ e Nava¹⁰.4
- FIGURA 2 – Órgãos sensoriais dos carrapatos. A: Órgão de Haller no primeiro par de patas (setas) de carrapato *Ixodes rubicundus*. B: Palpos (P) e quelíceras (Q) de carrapato *Amblyomma sculptum*. Fonte: Adaptado de Belozarov et al⁴⁸ e Nava et al¹⁰.7
- FIGURA 3 – A: Órgão de Haller de *Amblyomma sculptum* destacando a cápsula (Ca) e a depressão anterior (Da). B: Nomenclatura das sensilas do tarso dorsal (d I – VI, c: cápsula do órgão de Haller) e ventral (v I-V) representada em *Amblyomma variegatum*. As linhas tracejadas indicam o limite entre as faces dorsal (d), lateral anterior (la) e ventral (v) e a numeração é feita de distal para proximal. Fonte: Adaptado de Nava et al¹⁰ e Hess et al⁵⁹.9
- FIGURA 4 – Anatomia do singânglio e nervos periféricos associados. A: Representação dos lobos do singânglio vista dorsal e ventral. Ch: lobo queliceral, Ol: lobo olfativo, Os: lobo opstossomal, Pa: lobo palpal, Pd 1-4: lobos pedais 1-4, Pc: lobo protocerebral, St: lobo estomodeal, Pgsh: bainha perigangliônica. B: Vista dorsal de nervos periféricos. ChN: nervo queliceral, GeN: nervo genital, LN: nervo lateral, OsN: nervo opstossomal, OpN: nervo óptico, PaN: nervo palpal, PsN: nervo paraspinal, PeN 1-4: nervos pedais 1-4, StN: nervo estomodeal, SgN 1-4: nervos glandulares salivares, E: esôfago, NI: neurilema. Fonte: Adaptado Sonenshine et al².13
- FIGURA 5 – Representação da técnica de Preenchimento anterógrado dos nervos olfativos até o singânglio em carrapatos *Amblyomma sculptum*. (A) Carrapatos adultos fêmeas não alimentados imobilizados individualmente com fita crepe e posicionados dorsalmente sobre uma lâmina para microscopia usando fita dupla face, com o primeiro par de pernas estendidos sobre cera odontológica. (B) Local de secção (traço vermelho) após o órgão de Haller nas duas pernas. (C) Corante Dextran Tetrametilrodamina 1% no local das secções. (D) Lâmina com carrapatos preparados armazenada em Placa de Petri contendo um lenço de papel umedecido. (E) Carrapato posicionado em Placa de Petri com gel contendo PBS para dissecação do singânglio.17
- FIGURA 6 – Projeções neuronais originadas no Órgão de Haller em direção aos lobos olfativos de carrapato *Amblyomma sculptum*. A: Lobos olfativos corados (setas) no interior do singânglio. B: Glomérulos evidenciados no interior dos lobos olfativos.20
- FIGURA 7 – Marcação dos glomérulos nos lobos olfativos realizada no programa Reconstruct utilizando uma série de imagens produzidas pelo microscópio confocal. A e B: marcação na fêmea 2. C e D: marcação no macho 1.22
- FIGURA 8 – Reconstrução tridimensional dos lobos olfativos da fêmea 2 (A e B, ventral e dorsal respectivamente) e do macho 1 (C e D, ventral e dorsal respectivamente).23
- FIGURA 9 – Correlação de Pearson realizada entre os volumes dos pares de glomérulos das fêmeas 1, 2 e 3.25

FIGURA 10 – Correlação de Pearson realizada entre os volumes dos pares de glomérulos do macho e das fêmeas 1, 2 e 3.	26
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ocorrência dos glomérulos identificados nos lobos olfativos dos carrapatos <i>Amblyomma sculptum</i> selecionados para a reconstrução tridimensional.	23
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SNC – Sistema Nervoso Central

OBP – Proteína Ligadora de Odor

GPCR – Receptor acoplado codificador de proteína G

CSP – Proteína Quimiossensorial

ddH₂O – Água deionizada

L1 – Lobo Olfativo 1

L2 – Lobo Olfativo 2

RESUMO

Amblyomma sculptum, pertencente ao complexo *A. cajennense*, parasita humanos, animais domésticos e silvestres. Apresenta importância mundialmente reconhecida na saúde pública e animal por espoliar seus hospedeiros e transmitir patógenos causadores de doenças, como *Rickettsia rickettsii* agente de Febre Maculosa no Brasil. Os carrapatos orientam-se por estímulos químicos detectados por seus órgãos sensoriais, como o órgão de Haller, localizado no primeiro par de patas, que possui sensilas olfativas capazes de detectarem moléculas voláteis, como os odores. No interior destas sensilas há neurônios que se projetam para os lobos olfativos, organizados em glomérulos, no interior do singânglio, o sistema nervoso central. Em carrapatos, pouco se sabe sobre como a percepção da informação olfativa é integrada no singânglio e esta compreensão permitiria obter mais detalhes sobre a biologia, contribuindo para o desenvolvimento de novas tecnologias de controle. Objetivou-se verificar a integração entre o órgão de Haller e o singânglio por meio da determinação dos padrões de projeção neuronal das sensilas olfativas aos lobos olfativos e da reconstrução tridimensional dos glomérulos. Machos e fêmeas adultos de *A. sculptum* foram imobilizados, o órgão de Haller seccionado e o nervos olfativos corados com dextran tetrametilrodamina 1%. Os singânglios foram dissecados em PBS, fixados em paraformaldeído 4%, lavados em PBST e PBS, desidratados em séries ascendente de etanol e montados em lâminas com glicerol. Os singânglios foram observados em microscópio de fluorescência Axio Scope.A1 para determinar aqueles onde houve projeção. Os lobos olfativos corados foram digitalizados em microscópio confocal a laser TCS SP8 e as séries de imagens confocais foram avaliadas no programa *Reconstruct*. Selecionaram-se os lobos olfativos de um macho e três fêmeas para identificação dos glomérulos, marcação manual e numeração, com posterior reconstrução 3D. O programa permitiu o cálculo dos volumes glomerulares que foram analisados por correlação de Pearson. As projeções neuronais originadas nas sensilas olfativas do órgão de Haller estiveram confinadas estritamente aos lobos olfativos, organizados em glomérulos. Os glomérulos no macho variaram entre 26 e 30 e nas fêmeas, entre 24 e 29. Macho e fêmeas apresentaram glomérulos similares, denominados homólogos, nos dois lobos olfativos quando comparados intra- e intersexualmente, com correlação positiva entre 72% e 95%. Com relação aos tamanhos e formas, os glomérulos foram similares e não foram identificados macroglomérulos, uma vez que os glomérulos com maiores volumes no macho e nas fêmeas não apresentaram valores superiores a duas vezes o valor da média. O número de indivíduos avaliados não permitiu inferir se a menor quantidade de glomérulo nas fêmeas foi estatisticamente significativa e, portanto, não se pode afirmar se há dimorfismo sexual. Em carrapatos este foi o primeiro trabalho em que se realizou a reconstrução tridimensional dos lobos olfativos. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento do processamento central da informação olfativa em carrapatos.

Palavras-chave: *Amblyomma sculptum*, glomérulos, lobos olfativos, órgão de Haller, reconstrução 3D.

ABSTRACT

Amblyomma sculptum belongs to *Amblyomma cajennense* complex and parasites human beings as well domestic and wild animals. This tick species has a world recognized importance in public and animal health due blood exploitation and transmission of some pathogens such as *Rickettsia rickettsia*, causal agent of Rocky Mountain Spotted Fever in Brazil. Ticks oriented themselves using chemical stimuli perceived by their sensorial organs. The Haller organ, which is localized in the first leg, has olfactory sensilla which perceive volatile molecules, as the odors. Inside of the sensilla there are neurones that project themselves to olfactory lobes in the synganglion, the central nervous system. In ticks, there is a gap in how the perception of the olfactory information is integrated in the synganglion and this comprehension would allow obtain details that could be used to the development of new control strategies. This work aims to verify the integration between the Haller organ and the synganglion by determining its neuronal projection patterns until the olfactory lobes as well accomplish its three-dimensional reconstruction. Males and females of *A. sculptum* were immobilized and the Haller organ was excised. The olfactory nerves were filled with one drop of dextran tetramethylrhodamine 1%. The synganglions were dissected in saline, fixed in 4% paraformaldehyde, washed in saline and triton X-100, dehydrated in alcohol series and mounted in glicerol. The synganglions were examined in a fluorescence microscope (Axio Scope.A1) to confirm filling from the peripheral neurons to the synganglion. The olfactory lobes stained were digitalized in a confocal microscope TCS SP8 (Leica) and the series were examined in the *Reconstruct* software. The olfactory lobes of one male and three females were selected to tracing the edges of each glomerulus in successive optical sessions in order to obtain the 3D reconstruction. The volume was calculated using the same software and their correlation was analyzed by Pearson correlation. The neuronal projections from the Haller organ were confined in the olfactory lobes, which were organized in glomeruli. The number of glomeruli in the males was 26 and 30 in each olfactory lobe examined and in the females varied between 24 and 29. Male and females showed similar glomeruli in both olfactory lobes, meaning they are homologues, when compared intra and intersexually, with a positive correlation between 72% and 95%. Considering the volume, the glomeruli were also similar and no macroglomerulus was identified, as any glomerulus in the male and female were two times bigger than the average volume. The number of specimens evaluated does not allow inferring if the lower number of glomeruli in the females was statistically significant. This work shows, for the first time, the 3D reconstruction of the olfactory lobe in a tick species. The results obtained contribute to understand how ticks process their olfactory information.

Keywords: *Amblyomma sculptum*, glomeruli, olfactory lobes, Haller organ, 3D reconstruction.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores, principalmente artrópodes ectoparasitos, são um dos grandes problemas de saúde pública e animal. Dentre os artrópodes, os carrapatos têm importância mundialmente reconhecida¹⁻⁵, podendo transmitir uma grande variedade de organismos patogênicos, incluindo fungos, vírus, bactérias e protozoários aos seus diferentes hospedeiros². Ainda, podem ocasionar a morte do hospedeiro por paralisia, toxicose, irritação e alergia⁶, e serem responsáveis por quedas nos índices de produtividade e depreciação do couro de animais de produção^{5,6}. Portanto, estudos que os envolvem são de relevância sanitária e econômica.

São descritas aproximadamente 900 espécies subdivididas em três famílias⁷: Argasidae (carrapatos moles), Ixodidae (carrapatos duros) e Nuttalliellidae (pouco conhecida)⁸. Cerca de 80% dos carrapatos descritos pertencem a família Ixodidae e dentre estes encontram-se carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae), representado por 135 espécies distribuídas mundialmente⁹. *Amblyomma cajennense*, após reavaliação de sua morfologia, biologia e variabilidade genética, foi reclassificado como um complexo de seis espécies que se distribuem geograficamente do sul dos Estados Unidos até distintas regiões da América Central e do Sul¹⁰.

Carrapatos *A. sculptum*, pertencentes ao complexo “cajennense”, podem ser encontrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e parte das regiões Sul e Nordeste do Brasil¹⁰. Esta espécie parasita animais domésticos e silvestres, além de humanos, e é responsável pela transmissão de agentes patogênicos, como *Rickettsia rickettsii*, agente causal da Febre Maculosa¹¹. Podem ainda transmitir o agente que provoca borreliose em humanos no Brasil, similar à Doença de Lyme¹² e laboratorialmente, o protozoário *Theileria equi*, responsável pelo desenvolvimento de teileriose em equinos¹³.

Os carrapatos orientam-se principalmente em função de estímulos químicos detectados por seu aparelho sensorial¹⁴, constituído por sensilas localizadas principalmente no órgão de Haller, palpos e quelíceras². O órgão de Haller, localizado na superfície dorsal do tarso do primeiro par de pernas, possui sensilas olfativas responsáveis por detectarem moléculas voláteis, como os odores¹⁵⁻¹⁷, devido a presença de neurônios no interior destas sensilas que se projetam para o sistema nervoso central (singânglio). A informação olfativa é propagada por meio de impulsos nervosos do órgão de Haller até o singânglio, local em que é processada. O singânglio corresponde a uma massa de nervos fusionados, de onde partem e chegam inervações

aos apêndices, estruturas sensoriais e vários órgãos internos. Em seu interior há dois lobos olfativos que recebem axônios enviados do órgão de Haller².

Os arranjos anatômico e histológico do sistema nervoso de carrapatos têm sido estudados por vários autores, mostrando as similaridades entre machos e fêmeas de uma mesma espécie e entre diferentes estágios de vida¹⁸⁻²⁰. Entretanto pouco se conhece a respeito da interação entre o sistema nervoso periférico e o central e como e em quais locais específicos do singânglio os carrapatos processam as informações. Em um estudo com *A. americanum* foi demonstrada a projeção das sensilas do órgão de Haller até o singânglio utilizando-se corante para estruturas neurais. Assim, utilizando-se microscopia confocal, foi possível verificar que as sensilas olfativas deste órgão projetam-se até os lobos olfativos, os quais são organizados em glomérulos^{18,21}.

Enquanto nos insetos, estudos apresentam mapas tridimensionais do lobo antenal, evidenciando os glomérulos e apresentando como se desenvolve a percepção olfativa²²⁻²⁴, nos carrapatos os estudos são limitados, e não há conhecimento de como a percepção da informação olfativa pelos receptores periféricos é integrada no sistema nervoso central¹⁸. Desta forma, realizar a reconstrução tridimensional do lobo olfativo de *A. sculptum* permitirá compreender as zonas alvo dos neurônios sensoriais olfativos no singânglio do carrapato. Este conhecimento é essencial para a obtenção de mais detalhes sobre a biologia deste carrapato, contribuindo para o desenvolvimento de novas tecnologias de controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Amblyomma*

Os carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma* apresentam uma grande importância médica e veterinária e distribuem-se geograficamente em regiões tropicais e subtropicais²⁵. Aproximadamente 135 espécies estão descritas neste gênero mundialmente e cerca de 33 são encontradas no Brasil^{9,12}.

A. cajennense sensu lato (Fabricius, 1787) é uma das espécies deste gênero que apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde o sul dos Estados Unidos, passando pela América Central e do Sul até a Argentina, e se alimenta em uma variedade de hospedeiros vertebrados, principalmente mamíferos¹⁰. Este carrapato é um importante parasito de animais domésticos e humanos na região Neotropical²⁶ e também um dos principais vetores de *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa em humanos, em algumas áreas da América Central e do Sul²⁷.

Estudos morfológicos com *A. cajennense* s.l. foram realizados para esclarecimentos quanto a taxonomia^{28,29}. Dois experimentos foram conduzidos, um com cruzamentos entre carrapatos *A. cajennense* s.l. de dois estados brasileiros com localização geográfica distante (São Paulo e Rondônia)³⁰ e outro com cruzamento entre *A. cajennense* s.l. na Argentina³¹. Ambos sugeriram que este táxon era provavelmente representado por um complexo de diferentes espécies. Posteriormente, foi efetuada uma análise molecular da diversidade genética dentre carrapatos *A. cajennense* s.l. baseada na comparação de uma sequência múltipla de genes em carrapatos coletados em toda a área de distribuição desta espécie e evidenciaram-se seis grupos geneticamente diferentes³².

A partir dos dados obtidos anteriormente, a morfologia dos espécimes representativos de cada clado foi examinada e comparada com o objetivo de verificar se a subdivisão genética observada estava associada com distintas características fenotípicas. Conclui-se que a morfologia era coerente com os resultados das análises molecular e biológica, indicando que *A. cajennense* é um complexo de seis espécies: *Amblyomma cajennense* sensu stricto (Fabricius, 1787), *Amblyomma interandinum* (Beati, Nava e Cáceres, 2014), *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844), *Amblyomma patinoi* (Labruna, Nava e Beati, 2014), *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888) e *Amblyomma tonelliae* (Nava, Beati e Labruna, 2014). No Brasil *A. cajennense* s.s. apresenta ocorrência na região amazônica e *A. sculptum* pode ser encontrado nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e parte das regiões Sul e Nordeste¹⁰ (Figura 1).

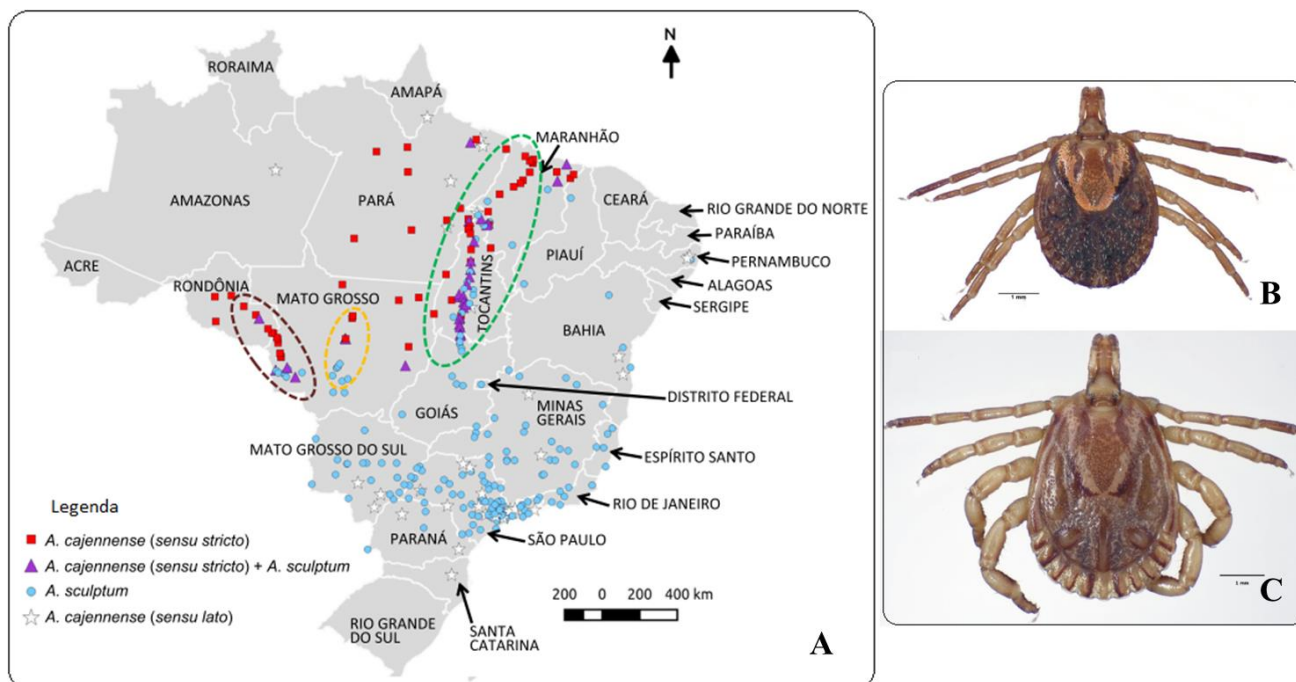


FIGURA 1 – Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica de *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma cajennense sensu lato* e *Amblyomma sculptum* de acordo com estudo realizado por Martins et al³³ (A). Carrapatos fêmea (B) e macho (C) de *Amblyomma sculptum* encontrados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e partes da Sul e Nordeste. Fonte: Adaptado de Martins³³ e Nava¹⁰.

Por fim, nas Américas, carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma* estão agrupados em três “complexos de espécies”, denominados “complexo *cajennense*”, “complexo *maculatum*” e “complexo *ovale*”, sendo que no Brasil importantes espécies destes complexos são encontradas, como por exemplo *A. sculptum*, *A. triste* e *A. aureolatum*, respectivamente^{25,34,35}.

Os carrapatos do complexo *cajennense* além de ocasionarem danos diretos pelo parasitismo, estão associados a transmissão de agentes patogênicos causadores de enfermidades em animais e humanos. Diferentes espécies de carrapatos têm sido implicadas como vetores de *R. rickettsii* de acordo com a localização geográfica. No Brasil os principais carrapatos vetores pertencem a este complexo¹¹. A febre maculosa ocasionada por este agente apresenta uma alta letalidade nas Américas. Segundo dados do Ministério da Saúde foram notificados 113 casos da doença e 42 óbitos no ano de 2016³⁶.

Os carrapatos do complexo *cajennense*, além de transmitirem a Febre Maculosa, podem estar relacionados com a transmissão de um agente causal que provoca borreliose em humanos no Brasil, similar à Doença de Lyme¹². Ainda, estudos laboratoriais confirmam a capacidade de transmissão do protozoário *T. equi*, responsável pelo desenvolvimento de

teileriose em equinos, uma doença endêmica em grandes partes do mundo, incluindo algumas áreas da América do Sul¹³.

As espécies de carrapatos deste complexo são trioxênicas, isto é, têm ciclo de vida de três hospedeiros. A larva deixa seu hospedeiro após se alimentar e muda para o estágio de ninfa, subsequentemente as ninfas não alimentadas buscam o mesmo ou outro hospedeiro, alimentam-se, o deixam e mudam para o estágio adulto. Os adultos então, buscam outro hospedeiro. Os machos encontram as fêmeas e se acasalam. Após se alimentarem as fêmeas deixam os hospedeiros, põem os ovos no solo e morrem².

Estudos realizados mostram que carrapatos deste complexo apresentam apenas uma geração por ano. Utilizando equinos para alimentação de todos os estágios parasitários foi possível caracterizar a dinâmica sazonal de picos populacionais distribuídos ao longo do ano. Observou-se que as maiores infestações por estágios imaturos ocorreram durante o outono e o inverno, um período de baixas temperaturas e poucas chuvas, com consequente redução na umidade. Enquanto o período de maior atividade dos adultos foi identificado durante os meses de primavera e verão, quando o período de luz do dia é mais longo, a temperatura, umidade e chuvas são mais elevadas³⁷⁻³⁹.

Na dinâmica das populações notaram-se picos populacionais de um determinado estágio durante meses específicos alternados. A redução drástica ou ausência de outro estágio na pastagem sugeriu a ocorrência de diapausa durante uma fase do ciclo de vida³⁸. Nos invertebrados, a diapausa é um comportamento pré-adaptativo que precede o início de uma condição ambiental desfavorável. Esta adaptação fisiológica permite a otimização de suas atividades durante períodos de máxima disponibilidade de alimentos⁴⁰.

No Brasil, o comportamento de diapausa da larva apresentou-se como um importante fator de controle para o padrão de uma geração por ano⁴¹. As larvas que eclodem entre os meses de novembro a março, período de maior atividade do estágio adulto, permanecem no solo em “repouso”, assim, próximo ao mês de abril sobem nas folhas do capim e formam aglomerados, caracterizando esta diapausa que regula o ciclo biológico em condições naturais^{12,41}.

2.2 Estrutura sensorial

Os carrapatos, assim como a maioria dos animais, interagem por meio de estímulos responsáveis por guiarem seus comportamentos¹⁴. A comunicação é realizada através de estímulos sensoriais, os quais podem ser químicos, de temperatura, sinais sonoros, visuais, táteis, iluminação e umidade ou água².

Os semioquímicos, compostos portadores da informação, são secretados externamente ao indivíduo e, quando reconhecidos, direcionam uma resposta comportamental específica¹⁴, como localização de alimentos, parceiros para cópula, hospedeiros, proteção individual e outros comportamentos². Esses compostos são classificados em quatro categorias: feromônios, alomônios, cairomônios e sinomônios¹⁴, com exceção deste último, todas as classes podem ser identificadas e/ou demonstradas desempenhando papel na regulação da adaptação comportamental em carrapatos².

Os feromônios são emitidos por um indivíduo para influenciar o comportamento de indivíduos de mesma espécie de uma maneira que a beneficie. Já os semioquímicos que influenciam o comportamento entre indivíduos de espécies diferentes são os alomônios e os cairomônios, enquanto alomônios beneficiam os indivíduos que emitem, os cairomônios beneficiam os que recebem^{2,14,42}. Os sinomônios, compostos que beneficiam tanto o emissor quanto o receptor¹⁴, são mais documentados em plantas como voláteis que atraem agentes polinizadores contribuindo para o aumento da produção².

Os carrapatos possuem órgãos sensoriais responsáveis por detectarem estímulos químicos assim como redes neurais para interpretar e responder a informação recebida¹⁴. O sistema nervoso central (SNC), constituído por uma massa de nervos altamente condensados denominada singânglio², é responsável por coordenar as ações de todos os órgãos⁴³. Enquanto o sistema nervoso periférico compreende nervos que inervam apêndices, músculos, estruturas sensoriais, integumento e vários órgãos internos². As informações chegam ao SNC por meio de impulsos nervosos (potenciais elétricos) propagados, onde são processados e a ação é determinada aos órgãos⁴⁴.

Os órgãos sensoriais distribuem-se pelo corpo e apêndices dos carrapatos e auxiliam na sobrevivência dos mesmos, monitorando o ambiente externo e interno². As principais localizações são o tarso do primeiro par de patas, palpos, quelíceras e o escudo⁴⁵ (Figura 2). O órgão de Haller, localizado no primeiro par de patas, foi descrito em 1881 como um órgão de função auditiva encontrado em carrapatos ixodídeos. Mas posteriormente evidenciou-se a presença de receptores de função olfativa e de detecção de umidade^{46,47}. No primeiro par de patas, como um todo, podem ser encontrados receptores olfativos, gustativos, mecanorreceptores e de umidade⁴⁵.

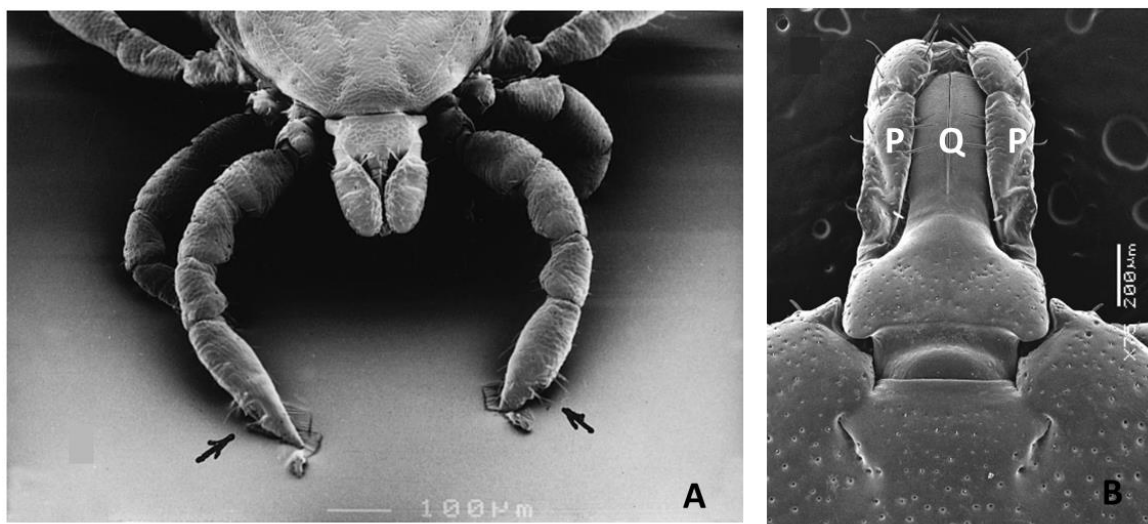


FIGURA 2 – Órgãos sensoriais dos carrapatos. A: Órgão de Haller no primeiro par de patas (setas) de carrapato *Ixodes rubicundus*. B: Palpos (P) e quelíceras (Q) de carrapato *Amblyomma sculptum*. Fonte: Adaptado de Belozarov et al⁴⁸ e Nava et al¹⁰.

Os palpos estão localizados ao lado das peças bucais, cada palpo consiste de quatro segmentos⁴⁷ e no segmento terminal podem ser encontrados dois tipos de receptores, os quimiorreceptores e os mecanorreceptores^{2,45}. Suas sensilas detectam substâncias solubilizadas e podem ser considerados órgãos de quimiorrecepção de contato, uma vez que respondem a estímulos por contato direto⁴⁷. Estas sensilas estão relacionadas com a localização do sítio de fixação para posterior alimentação nos hospedeiros².

As quelíceras situam-se dorsal ao capítulo⁴⁵ e facilitam a penetração no integumento do hospedeiro e a fixação para estabelecer o local de alimentação². Possuem receptores gustativos e mecanorreceptores. Assim, quando os carrapatos introduzem seu aparelho bucal no integumento de seu hospedeiro, os quimiorreceptores conseguem identificar os componentes sanguíneos e desta maneira, identificam também o hospedeiro preferencial. Desta forma, as quelíceras participam das fases de fixação e ingurgitamento do carrapato⁴⁵.

Estudos eletrofisiológicos realizados com carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*⁴⁹ e *Rhipicephalus microplus*⁵⁰ evidenciam essa capacidade de identificação dos componentes sanguíneos dos hospedeiros. Ambos os estudos mostram que estas duas espécies são capazes de identificar fagoestimulantes, compostos químicos percebidos pelo contato com uma quimiossensila que promovem um efeito positivo no comportamento alimentar. Em *R. microplus*, a sensila do dígito interno da quelícera além de perceber fagoestimulantes já conhecidos, é mais responsiva ao soro de bovinos resistentes ao carrapato e menos responsiva

ao soro de bovinos sensíveis, sugerindo assim que são também capazes de distinguir componentes do soro que diferenciam hospedeiros resistentes dos sensíveis⁵⁰.

Algumas espécies de carrapatos possuem também fotorreceptores⁴⁵ localizados em pares de olhos simples na lateral do escudo e um gânglio óptico no cérebro. No geral, carrapatos respondem a sombras e variações na intensidade da luz, e algumas espécies, especialmente aquelas que buscam ativamente seus hospedeiros, podem ser capazes de discriminar formas².

Receptores celulares, neurônios, mais conhecidos como sensilas, são classificados de acordo com suas funções e formato⁵¹. Esses receptores correspondem a neurônios bipolares constituídos por um axônio (processo central) que se estende para o SNC e um dendrito (processo periférico), para a superfície do corpo⁵². Essas sensilas podem ser quimiossensilas, mecanossensilas, fotossensilas e termossensilas².

As quimiossensilas de maior importância são as sensilas olfativas localizadas no órgão de Haller, sensilas palpais e do dígito interno das quelíceras⁵¹. Sinais elétricos neuronais foram detectados, por meio de estudos eletrofisiológicos, quando essas sensilas foram expostas a químicos específicos. Odores de hospedeiros e feromônios sexuais foram detectados por sensilas no órgão de Haller^{15,53,54,55} e fagoestimulantes por sensilas das quelíceras^{49,50}.

2.2.1 Órgão de Haller

O órgão de Haller, localizado na superfície dorsal do primeiro par de pernas (tarso dianteiro), é uma estrutura quimiossensorial primária usada para detectar voláteis, como odores¹⁷, e também calor e outros estímulos externos². Sua função de quimiorrecepção é semelhante ao complexo tarsal localizado no primeiro par de patas dos ácaros⁵ e as antenas dos insetos⁴⁷. Este órgão está envolvido na detecção de alimentos, feromônios, cairomônios de hospedeiros, alomônios de plantas e fungos, além de repelentes de artrópodes^{2,5,42}.

Consiste de uma cápsula posterior, com numerosas sensilas expostas por meio de uma pequena abertura, e uma depressão anterior, contendo algumas sensilas localizadas distal à cápsula posterior (Figura 3)^{2,17,47}. As sensilas localizadas na cápsula possuem receptores olfativos associados ao reconhecimento de odores de bovinos e coelhos, assim como de compostos sintéticos análogos aos componentes destes odores, e também podem responder a respiração de vertebrados^{56,57}. Sensilas localizadas fora da cápsula podem também detectar odores associados a voláteis de vertebrados⁵⁸, assim como feromônios⁵⁵.

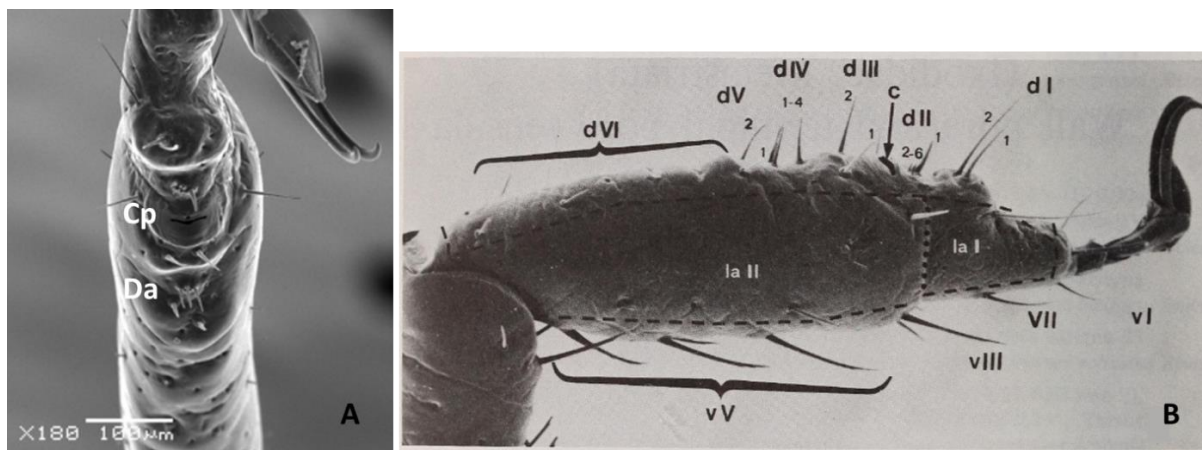


FIGURA 3 – A: Órgão de Haller de *Amblyomma sculptum* destacando a cápsula (Ca) e a depressão anterior (Da). B: Nomenclatura das sensilas do tarso dorsal (d I – VI, c: cápsula do órgão de Haller) e ventral (v I-V) representada em *Amblyomma variegatum*. As linhas tracejadas indicam o limite entre as faces dorsal (d), lateral anterior (la) e ventral (v) e a numeração é feita de distal para proximal. Fonte: Adaptado de Nava et al¹⁰ e Hess et al⁵⁹.

A depressão anterior contém entre 6 a 7 sensilas inervadas por 2 a 9 neurônios sensoriais bipolares. Já a cápsula posterior contém entre 4 a 13 sensilas, cada uma inervada por 4-5 neurônios sensoriais bipolares. O número de sensilas e receptores varia entre as diferentes espécies de carrapatos¹⁷.

Neste órgão sensorial são encontrados quatro tipos morfológicos de sensilas basicônicas: sensila multiporosa de parede simples (receptores olfativos), sensila porosa de parede dupla com sulcos longitudinais (químio-mecanorreceptores), sensila porosa de parede dupla com cutícula interna (químio-termorreceptores) e processo apical sem poros (possivelmente com receptores que detectam umidade e temperatura)^{47,51}. Dos dois tipos de sensilas quimiorreceptoras conhecidas, as olfatossensilas detectam moléculas em forma de vapor, enquanto as gustativas detectam moléculas em soluções ou sólidas por meio do contato direto².

As paredes das sensilas olfativas contêm numerosos poros através dos quais moléculas de odor vaporizadas passam e subsequentemente, entram na linfa da sensila. Esta linfa contém numerosas proteínas ligadoras de odor (OBPs) e cátions. Evidências sugerem que odores relevantes sejam selecionados e ligados a uma OBP, posteriormente solubilizados e transportados ao receptor de odor no dendrito. Os dendritos que inervam as sensilas olfativas podem ou não ser ramificados e funcionalmente diversificados².

Nos ácaros, similarmente aos carrapatos, sensilas basicônicas são encontradas nas estruturas quimiossensoriais também localizadas nos palpos e no tarso dianteiro do primeiro par de patas⁶⁰. O complexo tarsal, considerado um órgão homólogo ao Órgão de Haller, consiste

de 9-28 sensilas inervadas por 6-15 neurônios bipolares⁶¹. As principais diferenças entre as sensilas dos carrapatos e dos ácaros referem-se a estrutura interna, incluindo a presença de poros e cavidades nas paredes sensilares e a estrutura das partes periféricas dos dendritos sensoriais. No entanto, a topografia deste complexo tarsal, o número de sensilas e os tipos morfológicos dependem do grau de especialização do ácaro, sendo possível encontrar diferenças entre ordens e espécies⁶⁰.

Em insetos, as antenas são os principais órgãos sensoriais olfativos⁶² e possuem sensilas com variáveis neurônios alojados em seu interior^{63,64}. Esses neurônios, assim como nos carrapatos, são bipolares e projetam-se para o sistema nervoso central⁶⁴. Estudos moleculares mostram que receptores localizados nos dendritos desses neurônios interagem de maneira específica com odores relevantes ou feromônios, conduzidos por OBPs, seguindo-se a transdução do sinal químico para uma resposta elétrica^{65,66} com posterior processamento da informação no sistema nervoso central do inseto^{67,68}.

Esses receptores são fundamentais para o reconhecimento molecular e a discriminação de odores. Em insetos são receptores acoplados codificadores de proteína G (GPCRs), similares aos apresentados pelos vertebrados, e localizam-se no citoplasma da membrana citoplasmática. Esses receptores ligam-se a uma proteína G, composta de três subunidades (α , β e γ). Assim, quando há a ligação do odor ao receptor, este passa por uma alteração conformacional que ativa o complexo proteína G e libera uma de suas subunidades, induzindo as enzimas efetoras a sintetizarem segundos mensageiros responsáveis por originarem os potenciais elétricos que produzem a mensagem elétrica a ser enviada ao longo dos axônios do sistema nervoso central^{67,68}. Além desses receptores de odor, receptores ionotrópicos do tipo glutamato podem ser expressos em algumas sensilas dos insetos^{64,65,69}.

Em carrapatos, estudos moleculares ainda são pouco expressivos. No genoma de *Ixodes scapularis* não foi encontrada nenhuma sequência de OBPs, apenas uma proteína quimiossensorial (CSP) e receptores ionotrópicos foram identificados⁷⁰. No transcriptoma do órgão de Haller de machos de *Dermacentor variabilis* foram identificados GPCRs nas patas frontais, no entanto ausentes nas traseiras, provavelmente estes atuam como receptores olfativos e gustativos. Adicionalmente, foram identificados sinais do mecanismo em cascata ativado pelo GPCR e enzimas envolvidas na degradação química das moléculas na linfa sensilar de outros organismos^{71,72}. Estas enzimas atuam por prevenir uma superestimulação dos receptores, o que poderia ocasionar a morte dos mesmos. Entretanto, as OBPs não foram identificadas e possivelmente, as lipocalinas identificadas poderiam estar transportando os químicos na linfa sensilar ao GPCR⁵. Em estudo posterior foram identificadas duas proteínas similares as OBPs

em *A. americanum*, nos palpos e no primeiro tarso. Além de outras proteínas envolvidas com a quimiorrecepção⁷³.

Uma vez conduzida a mensagem elétrica pelos axônios, a porção cerebral nos insetos responsável pelo processamento da informação olfativa é o lobo antenal^{62,74}. Já nos carrapatos, os lobos olfativos recebem os axônios provenientes do órgão de Haller². No interior dos lobos antenal e olfativo, dos insetos e carrapatos, respectivamente, são encontrados glomérulos^{18,21,63,65}. Os glomérulos dos lobos antenais, variáveis em diferentes espécies^{62,65}, recebem a entrada sensorial de um único tipo de receptor de odor e transmitem essa informação a outras partes do cérebro⁷². Além da diferença na quantidade de glomérulos, em algumas espécies de baratas, vespas e abelhas, o dimorfismo sexual dos glomérulos é observado. Glomérulos de tamanhos maiores, conhecidos como Complexo Macrogglomerular servem como exemplo de forte pressão de seleção, para aumentar a sensibilidade dos machos aos odores liberados pelas fêmeas, além de odores associados à alimentos^{63,65}.

Os estudos realizados com insetos mostram a estrutura do sistema olfativo, evidenciando os lobos antenais e seus glomérulos, além de apresentarem como se desenvolve a percepção olfativa. Em contraste, nos carrapatos é desconhecida como a percepção da informação olfativa pelos receptores periféricos é integrada no sistema nervoso central. Em *A. americanum*, as fêmeas possuem entre 16 e 22 glomérulos associados ao processamento do sinal do odor, possivelmente a olfação nos carrapatos é similar a dos insetos a nível celular¹⁸.

Sugere-se que a detecção de uma variedade de composições e concentrações de compostos induza a busca por hospedeiros e o comportamento de acasalamento devido a especialização de muitos dos quimiorreceptores encontrados no órgão de Haller⁴⁵. Receptores presentes na cápsula e na região anterior foram detectados, por meio de estudos eletrofisiológicos, para CO₂, H₂S, lactonas, ácidos graxos de cadeias curtas¹⁷, aldeídos aromáticos, como o nonanal¹⁵ e fenóis substituídos, incluindo o feromônio sexual 2,6-diclorofenol².

Em *A. cajennense* s.l. verificou-se por meio de estudos eletrofisiológicos respostas distintas em dois grupos sensilares específicos. Dentre 20 compostos testados, o 1-octen-3-ol, associado aos voláteis de vertebrados, e o 2,6-diclorofenol e 2-nitrofenol, feromônios de carrapatos, produziram resposta eletrofisiológica nos neurônios olfativos da sensila D.II.1. Já a sensila D.I.1 teve seus neurônios estimulados apenas por 2,6-diclorofenol e o nonanal⁵⁵, um volátil presente em odor de mamíferos que auxilia na localização de hospedeiros por insetos hematófagos⁷⁵.

Posteriormente, empregando-se a técnica de cromatografia gasosa foi possível constatar que fêmeas de *A. cajennense* s.l. são capazes de produzir 2,6-diclorofenol. Seguindo-se com testes de olfatometria observou-se o comportamento de atração e monta nos machos. No entanto, ao se testarem carrapatos *R. sanguineus*, observou-se que as fêmeas produzem o 2,6-diclorofenol, mas os machos não são capazes de reconhecer esta molécula e, portanto, não são atraídos⁷⁵. A evidencia do comportamento esperado em machos de *A. cajennense* s.l. estimulados pelo 2,6-diclorofenol pode estar relacionada com a ativação de receptores na periferia, sugerindo a integração com o singânglio.

2.3 Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso dos carrapatos é caracterizado como um órgão vital para o sucesso biológico deste grupo, uma vez que apresenta uma diversidade de funções, como o controle de todos os processos metabólicos que ocorrem no organismo dos mesmos¹⁹. A estrutura deste sistema já foi descrita em carrapatos Argasídeos e Ixodídeos mostrando similaridade⁷⁶⁻⁷⁹. Em carrapatos *R. sanguineus* de diferentes estágios (larva, ninfa e adultos) não foram observadas diferenças morfo-histológicas²⁰ assim como não houve diferenças morfológicas no tecido nervoso em fêmeas alimentadas e não alimentadas⁸⁰.

O sistema nervoso central corresponde a uma massa de nervos fusionados altamente condensadas, denominado singânglio^{78,80}, de onde partem nervos periféricos de numerosos gânglios nervosos para inervar os apêndices, músculos, estruturas sensoriais, integumento e vários órgãos internos². O singânglio localiza-se ventralmente entre o gnatossoma e o poro genital, aproximadamente entre o primeiro e o segundo par de patas^{51,78}, é recoberto por uma bainha perivascular denominada bainha perigangliônica⁷⁸. O esôfago passa através do singânglio e o divide em duas regiões: supraesofageal (anterior e dorsal ao esôfago) e subesofageal (posterior e ventral ao esôfago). A região supraesofageal, a menor das duas regiões, consiste de gânglios protocerebral, queliceral e palpal, enquanto a subesofageal contém quatro gânglios pedais, gânglio opistossomal e lobos olfativos pareados, além de nervos que se ramificam para órgãos internos (Figura 4)^{2,19,80,81}.

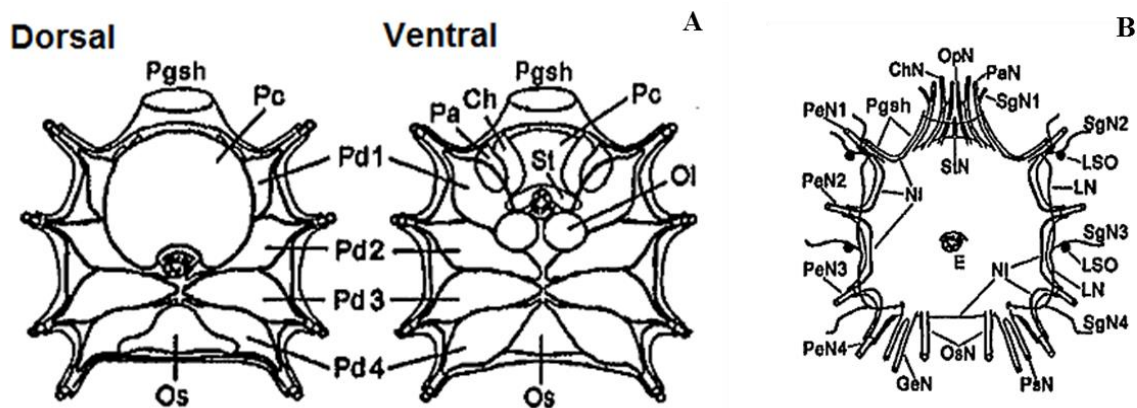


FIGURA 4 – Anatomia do singânglio e nervos periféricos associados. A: Representação dos lobos do singânglio vista dorsal e ventral. Ch: lobo queliceral, Ol: lobo olfativo, Os: lobo opstossomal, Pa: lobo palpal, Pd 1-4: lobos pedais 1-4, Pc: lobo protocerebral, St: lobo estomodeal, Pgsh: bainha perigangliônica. B: Vista dorsal de nervos periféricos. ChN: nervo queliceral, GeN: nervo genital, LN: nervo lateral, OsN: nervo opstossomal, OpN: nervo óptico, PaN: nervo palpal, PsN: nervo paraspiracular, PeN 1-4: nervos pedais 1-4, StN: nervo estomodeal, SgN 1-4: nervos glandulares salivares, E: esôfago, NI: neurilema. Fonte: Adaptado Sonenshine et al².

Externamente o singânglio é recoberto por uma camada acelular ou neurilema localizada acima da membrana perigangliônica ou perineuro. Internamente é dividido em uma região cortical externa (córtex), que contém os corpos das células nervosas e células da glia, e a região interna, a neurópila, formada por extensões das células nervosas^{2,81}. Essas duas regiões são separadas pelo subperineuro, uma camada de células da glia, traqueia e traqueolos^{20,81}.

A zona cortical contém uma fina camada de células da glia, localizada abaixo do neurilema, associada com a regulação de atividades neurais. Os corpos celulares são constituídos de neurônios motores e neurônios secretórios². Podem ser encontrados três tipos de células neuronais classificadas de acordo com o tamanho da célula, a relação núcleo:citoplasma e a atividade neurosecretória^{4,19,77}. Neurônios do Tipo I são os mais abundantes, menores, apresentam caracteristicamente baixa relação citoplasma:núcleo e possuem função motora. Os neurônios do Tipo II são células neurosecretórias com tamanho variável e apresentam alta relação citoplasma:núcleo. Enquanto neurônios do Tipo III são relativamente menores, agrupados no primeiro gânglio pedal e com função desconhecida^{4,77}.

A região interna, a neurópila, consiste de tratos fibrosos de axônios e dendritos⁴. Estudos histológicos mostram a presença das regiões externa e interna e seus respectivos tipos celulares em diferentes espécies de carrapatos e nas fases de larva, ninfa e adulto. Evidenciando a similaridade entre as distintas espécies de carrapatos ixodídeos^{19,20,81,81}.

Estudos voltados para a compreensão da fisiologia, biologia, bioquímica e biologia molecular das funções neurais e sensoriais em carrapatos ainda são pouco significativos. Catalogar e sequenciar neuropeptídios, assim como identificar quimiorreceptores, proteínas de ligação de odores e as vias do processamento da informação sensorial, principalmente a olfativa, apresentam uma grande importância, uma vez que por meio desses sistemas os carrapatos conseguem reconhecer hospedeiros e por meio de feromônios e outros odores localizar parceiros sexuais, se alimentarem, e conseqüentemente se desenvolverem e reproduzirem.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O Objetivo Geral deste trabalho foi determinar a estrutura tridimensional dos lobos olfativos de *A. sculptum* e comparar os glomérulos de machos e fêmeas.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os padrões da projeção neuronal das sensilas olfativas de machos e fêmeas de *A. sculptum* no lobo olfativo.
- Realizar a reconstrução tridimensional dos glomérulos no lobo olfativo de machos e fêmeas de *A. sculptum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Local e duração do experimento

A técnica de preenchimento anterógrado dos nervos olfativos até o singânglio, microscopia e análise computacional tridimensional foram conduzidos no Centro de Parasitologia Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPV/EVZ/UFG). A microscopia confocal foi realizada na Plataforma de Microscopia do Instituto Gonçalo Muniz Fiocruz Bahia.

4.1.2 Obtenção de carrapatos adultos não alimentados

Fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* foram coletadas de equídeos naturalmente infestados e sem tratamento anterior com carrapaticidas da EVZ/UFG e do setor Goiânia 2. As larvas foram inoculadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para realizarem o repasto sanguíneo e completarem o ciclo biológico. Os carrapatos em fase de vida livre foram mantidos em estufa climatizada (temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 85%) no interior de seringas plásticas com o ápice cortado e vedadas com algodão. Procedeu-se da mesma forma com as ninfas até a obtenção de adultos não alimentados (machos e fêmeas) e foram utilizados carrapatos de um a três meses de idade mantidos na estufa. Todo o procedimento para a obtenção da colônia de carrapatos foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) 024/14.

4.2 Métodos

4.2.1 Preenchimento anterógrado dos nervos olfativos até o singânglio

Os carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* foram imobilizados individualmente e posicionados dorsalmente em lâminas para microscopia utilizando fita dupla face (Scotch 3M). Para corar os nervos olfativos, o primeiro par de pernas foi seccionado após o Tarso I com uma tesoura Vannas, na altura do órgão de Haller e o local do corte das secções recebeu uma gota de água deionizada (ddH₂O) por 30 s. Após este tempo, a gota de ddH₂O foi removida com um papel do tipo Kimwipe (Kimberly-Clark, Dallas, Texas, Estados Unidos) e substituída por uma gota de Dextran Tetrametilrodamina a 1% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) em ddH₂O, revestida por vaselina líquida para impedir evaporação do corante. As lâminas foram então colocadas em placas de Petri contendo um lenço de papel umedecido e mantidas por 48 horas a 4°C .

Subsequentemente, o singânglio foi dissecado em solução salina (PBS) e então fixado em paraformaldeído a 4% em solução salina a 4°C durante a noite. Posteriormente, o singânglio foi lavado em tampão PBST por seis vezes, sendo cada uma por uma hora, sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida foi feita a lavagem em PBS, por 30 min., sob agitação, no escuro, à temperatura ambiente. O singânglio foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (40%, 60%, 80%, 100% por duas vezes) sendo cada uma por 15 min., sob agitação, no escuro, à temperatura ambiente e montada em meio de Glicerol com Tampão Tris (9:1) (Figura 5).

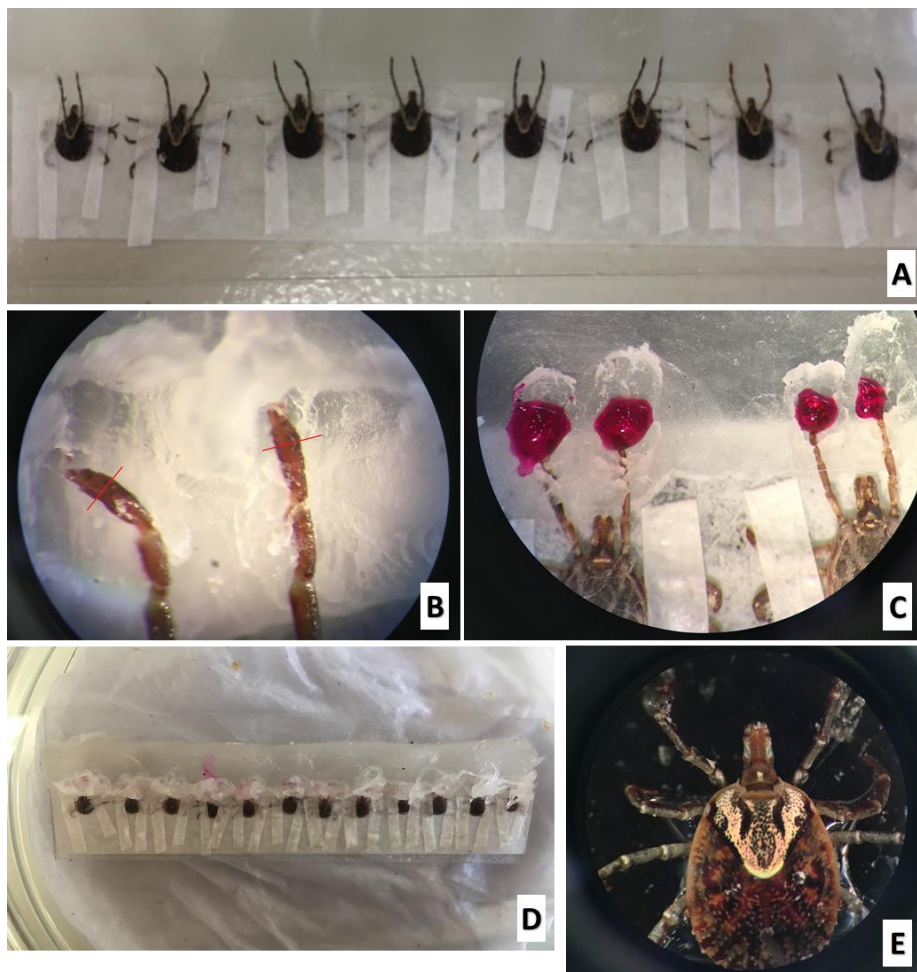


FIGURA 5 – Representação da técnica de Preenchimento anterógrado dos nervos olfativos até o singânglio em carrapatos *Amblyomma sculptum*. (A) Carrapatos adultos fêmeas não alimentados imobilizados individualmente com fita crepe e posicionados dorsalmente sobre uma lâmina para microscopia usando fita dupla face, com o primeiro par de pernas estendidos sobre cera odontológica. (B) Local de secção (traço vermelho) após o órgão de Haller nas duas pernas. (C) Corante Dextran Tetrametilrodamina 1% no local das secções. (D) Lâmina com carrapatos preparados armazenada em Placa de Petri contendo um lenço de papel umedecido. (E) Carrapato posicionado em Placa de Petri com gel contendo PBS para dissecção do singânglio.

4.2.2 Microscopia e análise computacional tridimensional

As lâminas preparadas foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1, Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) e aquelas cujos lobos olfativos apresentaram fluorescência foram identificadas e separadas para serem vistas no microscópio confocal.

A digitalização óptica foi realizada em um microscópio confocal a laser (TCS SP8, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) equipado com dois detectores tipo PMT, um externo para iluminação transmitida (DIC) e três lasers de diodo para excitação em 405, 488, 552 e 638 nm. As estruturas marcadas com Dextran Tetrametilrodamina a 1% foram excitadas com o laser DD 488/552 nm utilizando-se a objetiva de 63x/1,4 (com óleo de imersão). Foi gerada uma série de imagens de um mesmo singânglio, denominadas “Z-stacks”, obtidas a intervalos de 0,896 μm . Aproximadamente 80 a 176 imagens confocais foram geradas em cada série. A resolução das imagens foi de 1024 x 1024 pixels e o tamanho do pixel (“pixel size”) foi de 240,50 nm.

As imagens obtidas no microscópio confocal foram analisadas pelo programa livre *Reconstruct* disponível no site eletrônico: <http://synapses.clm.utexas.edu/tools/reconstruct/reconstruct.stm> que permitiu a análise tridimensional da organização glomerular dos lóbulos olfativos.

As séries de secções ópticas selecionadas foram importadas individualmente no programa *Reconstruct* criando pastas separadas para cada singânglio, ou seja, para cada carrapato, a ser observado. Cada série óptica foi analisada separadamente, nela os mesmos glomérulos, dentro de um mesmo lobo olfativo, foram marcados manualmente em cada imagem com a mesma coloração e receberam o mesmo número. Conforme os glomérulos apareciam nas imagens os seus contornos eram circundados até que não pudessem mais ser vistos nas imagens subsequentes, preenchendo dessa forma os lobos olfativos. Após concluir a marcação dos glomérulos de um lobo olfativo, estes eram comparados aos do outro lobo olfativo do mesmo carrapato. Posteriormente, comparavam-se os lobos olfativos de carrapatos diferentes para que fossem identificados os glomérulos homólogos, com posição e tamanhos similares. Desta maneira, estes glomérulos recebiam coloração e numeração iguais.

Ao final das marcações e numerações individuais os volumes dos glomérulos dos dois diferentes lobos de cada série de imagens, foram gerados pelo programa *Reconstruct*. O volume de cada glomérulo em uma série de secções ópticas foi calculado pelo programa como uma média a partir de cada marcação que obteve a mesma numeração. Uma vez que o “pixel size” utilizado pelo microscópio confocal (240,50 nm) fosse fornecido ao programa no

momento da importação das imagens. Após a conclusão das marcações e a confirmação da numeração entre os glomérulos foi possível a realização da reconstrução tridimensional.

4.3 Análise Estatística

Os volumes glomerulares fornecidos pelo programa *Reconstruct* foram tabelados e comparados por meio da Correlação de Pearson ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

A técnica de preenchimento anterógrado dos nervos localizados no órgão de Haller usada neste estudo permitiu a visualização dos lobos olfativos corados em aproximadamente 2% do total de carrapatos preparados (de 650 carrapatos preparados em 11 obteve-se coloração). Algumas áreas dos lobos olfativos apresentaram intensa coloração dificultando a contagem individual dos glomérulos. Esta observação pode estar relacionada com um excesso de corante ou com a presença de neurônios de segunda ordem que inervam a neurópila e estão manchados por um extravasamento de corante. Diante desta dificuldade em distinguir os glomérulos, foram selecionados para a avaliação do volume glomerular um macho e três fêmeas.

Nestes carrapatos observou-se a coloração dos nervos olfativos até os glomérulos, estruturas encontradas no interior dos dois lobos olfativos, no singânglio. As projeções neuronais originadas nas sensilas olfativas do órgão de Haller estiveram confinadas estritamente aos lobos olfativos, visto que ao entrar nos mesmos o nervo olfativo se ramifica em direção aos glomérulos, não sendo possível a visualização de outras estruturas coradas (Figura 6).

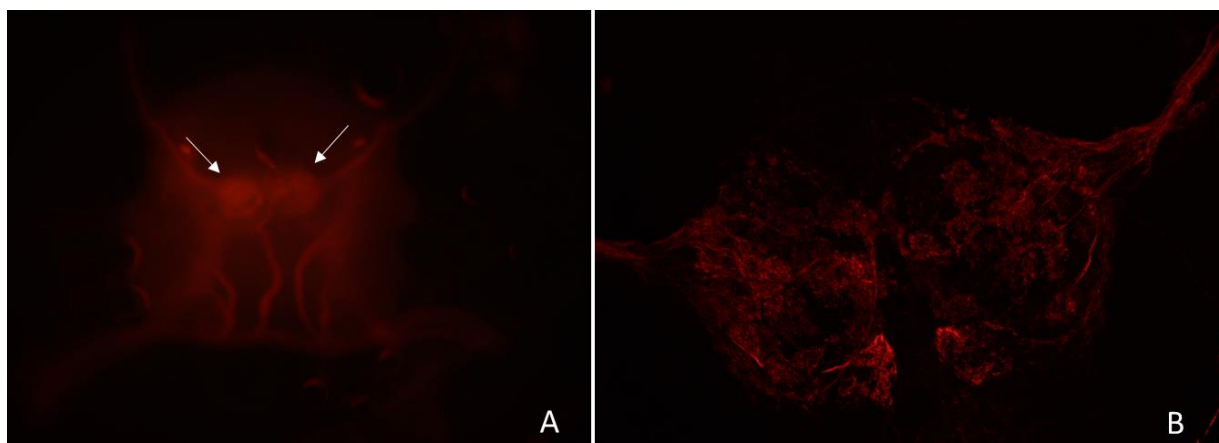


FIGURA 6 – Projeções neuronais originadas no Órgão de Haller em direção aos lobos olfativos de carrapato *Amblyomma sculptum*. A: Lobos olfativos corados (setas) no interior do singânglio. B: Glomérulos evidenciados no interior dos lobos olfativos.

A reconstrução tridimensional realizada por meio do programa *Reconstruct*, permitiu o reconhecimento do mesmo glomérulo entre os lobos olfativos de um mesmo indivíduo e de indivíduos diferentes, possibilitando atribuir mesmo número e coloração aos glomérulos homólogos. Dentre os lobos olfativos avaliados no macho de *A. sculptum* foi estimado 26 e 30 glomérulos (média=28), enquanto nas fêmeas, o número de glomérulos variou entre 24 e 29 (média=26,8).

Os lobos olfativos apresentaram glomérulos com tamanhos e formas similares e nenhum macroglomérulo foi observado. Embora o número de glomérulos tenha sido menor nas fêmeas quando comparado ao macho, o número de indivíduos avaliado não permite inferir se esta diferença é estatisticamente significativa e, portanto, não há como afirmar se há dimorfismo sexual.

5.1 Número e volume dos glomérulos

O macho 1 e a fêmea 2 foram selecionados como referências para a marcação dos glomérulos dos outros carrapatos por apresentarem os lobos olfativos mais completos quando comparados aos demais, o que pode ser visualizado pela marcação (Figura 7) e reconstrução tridimensional (Figura 8). Ao se considerar o número total de glomérulos encontrados em ambos os lobos olfativos de cada carrapato, ou seja, os glomérulos correspondentes no lobo olfativo 1 (L1) com os do lobo olfativo 2 (L2), pode-se dizer que no macho 1, 87% dos glomérulos foram encontrados (26 de 30 glomérulos foram reconhecidos em ambos os lobos olfativos). Na fêmea 1, 90% dos glomérulos foram marcados (26 de 29 glomérulos), na fêmea 2, 100% dos glomérulos (27), e na fêmea 3, 86% (24 de 28).

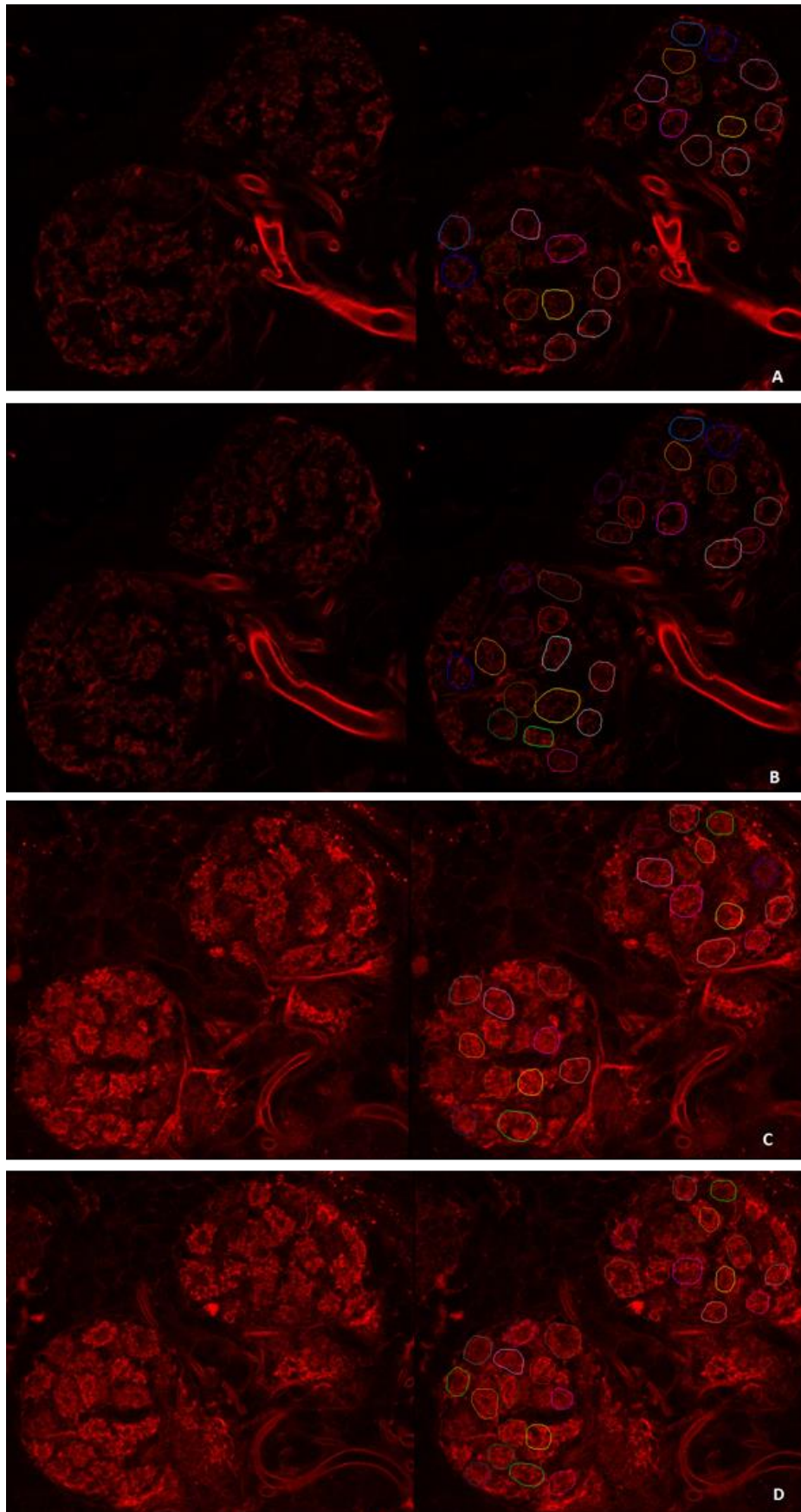


FIGURA 7 – Marcação dos glomérulos nos lobos olfativos realizada no programa *Reconstruct* utilizando uma série de imagens produzidas pelo microscópio confocal. A e B: marcação na fêmea 2. C e D: marcação no macho 1.

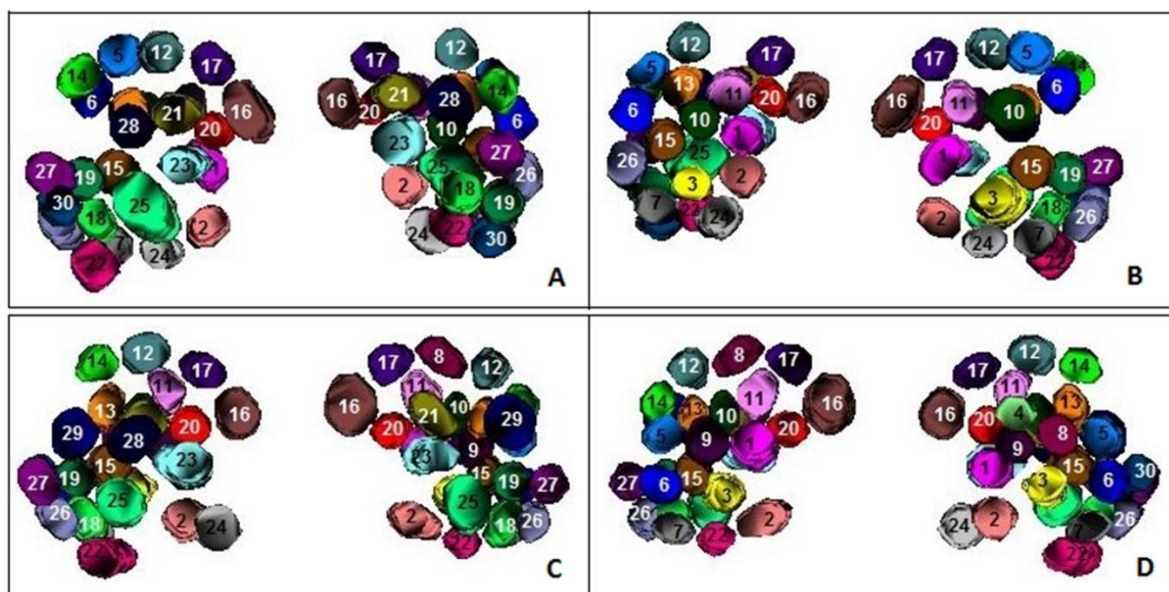


FIGURA 8– Reconstrução tridimensional dos lobos olfativos da fêmea 2 (A e B, ventral e dorsal respectivamente) e do macho 1 (C e D, ventral e dorsal respectivamente).

O volume dos glomérulos foi calculado em micrometros cúbicos. Na Tabela 1 pode-se verificar a presença e ausência dos glomérulos numerados e a variação volumétrica.

TABELA 1 - Ocorrência dos glomérulos identificados nos lobos olfativos dos carrapatos *Amblyomma sculptum* selecionados para a reconstrução tridimensional.

Glomérulos	M1		F1		F2		F3		Volume Mínimo - Máximo (μm^3)	Média - Erro Padrão (μm^3)
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	100,329 - 309,427	168,806 $\pm$ 21,982
2	1	1	1	0	1	1	1	0	77,370 - 325,733	139,755 $\pm$ 34,565
3	1	1	1	1	1	1	1	1	74,631 - 402,041	184,679 $\pm$ 44,688
4	1	0	1	1	0	0	1	0	46,819 - 189,758	117,428 $\pm$ 30,144
5	1	1	1	1	1	1	1	1	63,781 - 156,442	97,188 $\pm$ 12,143
6	1	1	1	1	1	1	1	1	73,387 - 288,243	133,628 $\pm$ 23,695
7	1	1	1	1	1	1	1	1	88,073 - 134,575	100,555 $\pm$ 5,890
8	1	1	1	1	0	0	1	1	84,785 - 301,557	151,008 $\pm$ 35,230
9	1	1	1	1	1	1	1	1	75,609 - 102,12	88,655 $\pm$ 3,431
10	1	1	1	1	1	1	1	1	69,003 - 103,242	89,048 $\pm$ 3,424
11	1	1	1	0	1	1	1	1	79,645 - 120,345	96,352 $\pm$ 5,223
12	1	1	1	1	1	1	1	1	106,397 - 185,249	137,056 $\pm$ 8,178
13	1	1	1	1	1	1	1	1	81,935 - 129,865	110,792 $\pm$ 5,952
14	1	1	1	1	1	1	1	1	65,060 - 105,917	87,673 $\pm$ 4,394
15	1	1	1	1	1	1	1	1	98,431 - 136,057	116,866 $\pm$ 4,796
16	1	1	1	1	1	1	1	1	165,971 - 288,497	217,708 $\pm$ 12,044
17	1	1	1	1	1	1	1	1	54,021 - 120,309	96,728 $\pm$ 8,325
18	1	1	1	1	1	1	1	1	81,699 - 128,657	102,640 $\pm$ 5,080

19	1	1	1	1	1	1	1	1	78,999 - 135,429	113,886 ± 6,010
20	1	1	1	1	1	1	1	1	77,058 - 116,896	93,100 ± 15,086
21	1	1	1	1	1	1	1	1	91,242 - 113,645	101,692 ± 2,829
22	1	1	1	1	1	1	1	0	62,370 - 195,309	106,922 ± 17,214
23	1	1	1	1	1	1	1	1	116,626 - 182,869	140,272 ± 7,446
24	1	0	1	1	1	1	1	0	96,302 - 117,632	107,551 ± 2,906
25	1	1	0	0	1	1	1	1	141,129 - 202,293	182,267 ± 8,310
26	1	1	1	1	1	1	1	1	91,648 - 123,378	106,102 ± 3,136
27	1	1	1	1	1	1	1	1	82,741 - 143,273	108,881 ± 6,659
28	1	0	1	1	1	1	1	1	110,501 - 182,767	133,803 ± 10,794
29	1	1	1	0	0	0	0	0	160,952 - 211,424	183,002 ± 12,177
30	1	0	1	1	1	1	0	0	64,505 - 77,433	70,686 ± 2,116
Total	30	26	29	26	27	27	28	24		

M1, macho 1; F1, fêmea 1; F2, fêmea 2; F3, fêmea 3; L1, Lobo Olfativo 1; L2, Lobo Olfativo 2.

A comparação entre as fêmeas (intrassexual), permitiu identificar 83% dos glomérulos correspondentes (25 glomérulos foram marcados em pelo menos um lobo olfativo de cada fêmea de um total de 30 glomérulos identificados). Ao se comparar o macho com as fêmeas (intersexual), constatou-se que dos oito lobos olfativos avaliados, 83% apresentaram correspondência em ambos os sexos, ou seja, 25 glomérulos dos 30 marcados foram identificados em pelo menos um lobo olfativo de cada um. O glomérulo que apresentou menor correspondência foi o 29, sendo marcado apenas no macho 1 e em um lobo da fêmea 1.

O volume glomerular entre machos e fêmeas apresentou uma variação entre 46,819 μm^3 e 402,041 μm^3 (menor e maior volume), sendo a maior variação encontrada entre os glomérulos 3, com valores de 74,631 μm^3 e 402,041 μm^3 (184,679 $\mu\text{m}^3 \pm 44,688 \mu\text{m}^3$) e a menor entre os glomérulos 30, com valores entre 64,505 μm^3 e 77,433 μm^3 (70,686 $\mu\text{m}^3 \pm 2,116 \mu\text{m}^3$). Ao se observar o macho individualmente o volume dos glomérulos (menor e maior) variou entre 46,819 μm^3 e 242,920 μm^3 (120,932 $\mu\text{m}^3 \pm 4,966 \mu\text{m}^3$). Nas fêmeas os volumes dos glomérulos menores e maiores variaram entre: fêmea 1, 54,021 μm^3 e 402,041 μm^3 (148, 895 $\mu\text{m}^3 \pm 11,110 \mu\text{m}^3$), fêmea 2, 63,781 μm^3 e 199,581 μm^3 (105,188 $\mu\text{m}^3 \pm 3,832 \mu\text{m}^3$) e fêmea 3, 70,093 μm^3 e 223,643 μm^3 (110,407 $\pm 4,829 \mu\text{m}^3$).

5.2 Análise Quantitativa

A determinação visual dos pares de glomérulos foi confirmada por meio da realização da análise quantitativa baseada na correlação entre os volumes dos glomérulos homólogos.

Inicialmente a comparação entre os pares homólogos foi realizada em cada indivíduo (intraindividualmente) por meio da correlação de Pearson, calculada entre os glomérulos dos dois lobos olfativos. O coeficiente de correlação foi significativamente diferente de zero ($P < 0,05$). As duas variáveis (o par de glomérulos, sendo cada um em um lobo olfativo) apresentaram-se correlacionados positivamente (correlação entre 72% e 95%), com os pontos alinhados em uma mesma direção ascendente.

O mesmo procedimento foi aplicado para a comparação entre as fêmeas 1, 2 e 3. Mostrando que as fêmeas apresentaram volumes glomerulares similares com correlação positiva de 92,6% (Figura 9).

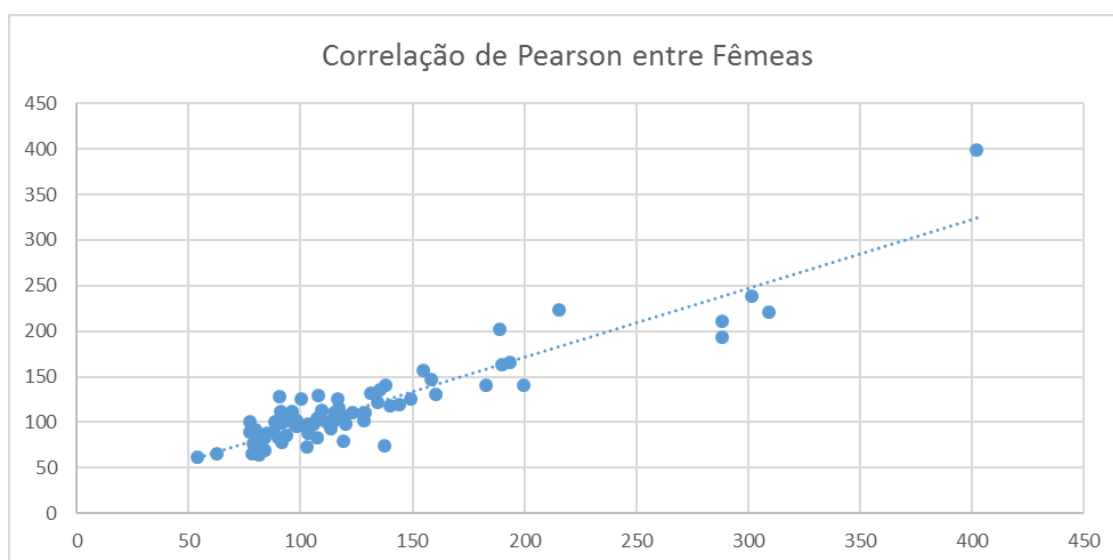


FIGURA 9 – Correlação de Pearson realizada entre os volumes dos pares de glomérulos das fêmeas 1, 2 e 3.

Posteriormente a correlação foi realizada entre o macho e as fêmeas (intersexual), revelando que os glomérulos descritos em ambos os sexos apresentaram dimensões similares, com uma correlação positiva de 89,78% (Figura 10).

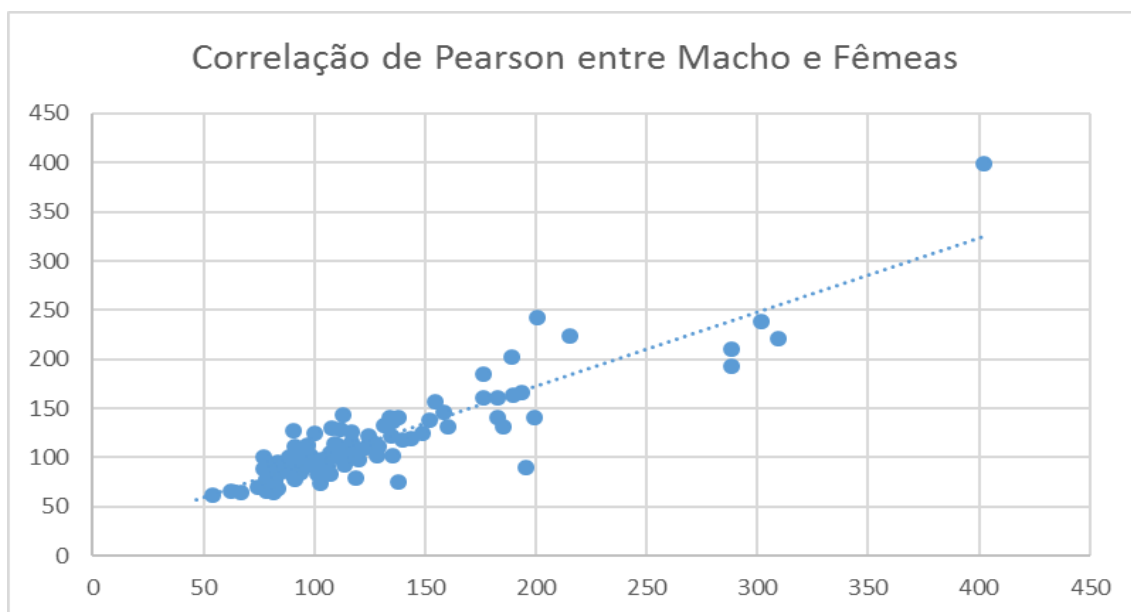


FIGURA 10 – Correlação de Pearson realizada entre os volumes dos pares de glomérulos do macho e das fêmeas 1, 2 e 3.

Assim, a avaliação dos volumes glomerulares por meio da correlação permitiu a confirmação das marcações realizadas nos lobos olfativos, uma vez que se obteve uma forte correlação positiva, permitindo a identificação destes glomérulos como homólogos.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se a projeção das sensilas olfativas do órgão de Haller de *A. sculptum* em direção aos lobos olfativos situados no singânglio. No interior destes lobos os neurônios sensoriais olfativos se ramificaram em estruturas identificadas como glomérulos. Os volumes dos glomérulos marcados foram comparados e estes foram identificados como homólogos entre os lobos olfativos de carrapatos do mesmo sexo e de sexos diferentes. A quantidade variou entre machos, 26 e 30, e fêmeas, entre 24 e 29. A forma e o tamanho dos glomérulos entre machos e fêmeas não apresentaram diferenças significativas. Procedeu-se pela primeira vez em carrapatos a reconstrução tridimensional dos lobos olfativos.

A projeção das sensilas olfativas do órgão de Haller de *A. sculptum* assim como a morfologia dos glomérulos no interior dos lobos olfativos foram similares ao demonstrado em *Amblyomma americanum*¹⁸. As sensilas olfativas localizadas no órgão de Haller de *A. sculptum* aparentemente projetaram-se exclusivamente para os lobos olfativos, uma vez que não foram observadas outras regiões coradas no interior do singânglio. Em estudos com o carrapato *A. americanum* e com o ácaro *Phytoseiulus persimilis* foi verificado que ao realizar a projeção dos nervos olfativos os mesmos estavam associados aos glomérulos olfativos e ao realizar a projeção dos palpos os nervos palpais estavam confinados ao gânglio palpal em ambos^{18,82}. É sugerido assim, que os lobos olfativos recebem inervação proveniente apenas dos neurônios sensoriais olfativos do órgão de Haller.

A posição dos lobos olfativos de *A. sculptum* é semelhante à descrita em carrapatos *A. americanum* e no ácaro *P. persimilis*, porção ventral do singânglio próxima ao primeiro gânglio pedal^{18,83}. A transmissão da informação química para o centro olfativo produz representações internas dos odores detectados a nível periférico assim como em insetos e ácaros, sugerindo que a organização do sistema olfativo é altamente conservada em diferentes linhagens de artrópodes^{82,84}.

Glomérulos similares entre os lobos olfativos do carrapato *A. sculptum* foram identificados por meio da marcação realizada no programa *Reconstruct* e, confirmados como homólogos pela correlação de Pearson calculada com os volumes dos glomérulos marcados. Constataram-se valores de correlação superiores a 72% quando os glomérulos foram comparados. De acordo com Sampaio⁸⁵ variáveis independentes com correlação superior a 50% apresentam uma confiança média e quando este valor supera 70% e se aproxima de 100%, percebe-se uma forte associação. Ou seja, neste estudo verificou-se a presença de correlação positiva entre os glomérulos, sugerindo que em ambos os lobos olfativos, glomérulos com

mesma numeração provavelmente são capazes de identificar e interpretar voláteis similares, assim como ocorre em abelhas, cujos estudos eletrofisiológicos mostram que glomérulos homólogos podem ser morfologicamente idênticos⁸⁶.

O número de glomérulos observado nos lobos olfativos corados das três fêmeas apresentou uma pequena variação assim como quando comparada a variação dentro de apenas um macho e entre o total (macho e fêmeas). Essa diferença na quantidade entre macho e fêmeas pode não ser uma diferença sexual, uma vez que tanto nas fêmeas quanto no macho o número de lobos olfativos corados pode ser considerado insuficiente para tal comparação. Outros estudos utilizam números maiores de insetos machos e fêmeas para a comparação, como por exemplo, em estudos com *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*, em que foram comparadas imagens confocais de 30 mosquitos (60 lobos antenais) de cada sexo para cada espécie e em ambos os estudos, os autores observaram a presença de dimorfismo sexual, seja por variações de tamanho e forma dos glomérulos, como também pela diferença de apenas uma unidade glomerular entre machos e fêmeas^{23,24}.

Estimou-se em *A. sculptum* que os machos apresentam entre 26 e 30 glomérulos, enquanto nas fêmeas, o número pode variar entre 24 e 29. Quantidade similar a encontrada em *P. persimilis*, em que os glomérulos variaram entre 14 e 21⁸¹. Estes números observados foram próximos ao identificado no triatomíneo *Rhodnius prolixus*, entre 15 e 22²², mas inferior ao encontrado em outros insetos hematófagos, como o *A. aegypti* com 49²³ e o *A. gambiae* com 61²⁴. Assim como observado em carrapatos, em insetos pode haver uma variação na quantidade, no tamanho e na localização dos glomérulos no interior dos lobos antenais de acordo com a espécie⁸⁴ e também entre machos e fêmeas de uma mesma espécie⁸⁷⁻⁸⁹.

Os glomérulos foram identificados e contados nos machos de *A. sculptum*, no entanto em um estudo com carrapatos *A. americanum*, os glomérulos dos machos apresentaram-se empacotados o que dificultou a visualização individual e impossibilitou a contagem. Neste mesmo estudo foi possível identificar os glomérulos das fêmeas, que variaram entre 16 e 22 por lobo olfativo. Mas não procederam com a reconstrução tridimensional¹⁸, diferentemente do obtido em *A. sculptum*. Essas diferenças entre espécies e entre machos e fêmeas podem estar associadas a diferenças morfológicas existentes no órgão de Haller, assim como observadas em um estudo entre machos e fêmeas de *Ixodes scapularis*, *A. americanum* e *Dermacentor variabilis*⁹⁰.

Apesar da possibilidade de diferenças morfológicas no órgão de Haller entre espécies justificar as diferenças glomerulares encontradas, deve-se considerar a quantidade de carrapatos que apresentaram os glomérulos corados, e assim as dificuldades na adequação da

técnica utilizada. Em insetos, estudos mostram o uso de anticorpos monoclonais exclusivamente ou associados a outros marcadores de células neuronais para a obtenção da coloração e identificação dos glomérulos. Dentre os anticorpos monoclonais, o nc82 apresenta maior capacidade de corar neurônios aferentes e outros componentes no interior dos glomérulos, permitindo uma melhor identificação das bordas glomerulares^{23,24,91}.

Os principais pontos de dificuldades para adequação e execução da técnica aqui utilizada foram levantados. O primeiro obstáculo foi relacionado com a montagem e manutenção da colônia de carrapatos, uma vez que esta espécie possui apenas um ciclo anual e predileção por determinadas temperaturas e umidades, e seus hospedeiros preferenciais são os equinos. Como os carrapatos eram colocados para se alimentarem em coelhos, não foi possível obter adequados ingurgitamento, mudanças de estágios e oviposição. Desta maneira, foi necessário um tempo maior para a obtenção dos carrapatos adultos não alimentados, e estes foram inicialmente utilizados em idades diferentes para posteriormente fixação de uma idade de acordo com melhor aproveitamento. Com relação ao desenvolvimento da técnica, a identificação do local adequado para realizar o corte na perna dos carrapatos, a escolha do corante e a obtenção da coloração dos nervos olfativos, assim como a dissecação e a manipulação dos singânglios cuidadosamente para evitar perdas por esmagamento com pinças foram pontos cruciais que necessitaram de treinamentos. Ainda, a ausência de um microscópio confocal na unidade de trabalho não permitiu um melhor aproveitamento do equipamento.

Diante dos resultados encontrados após o ajustamento e estabelecimento da técnica de montagem e coloração dos nervos olfativos de carrapatos, considerando-se as similaridades entre o sistema olfativo de carrapatos e insetos, ainda neste mesmo estudo, além da utilização de apenas um corante, associou-se a este corante (tetrametilrodamina) o anticorpo primário 3C11 (anti-SYNORF1-s) (DSHB Hybridoma Product 3C11 anti SYNORF 1, Iowa, Estados Unidos) e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), no entanto, nenhum dos carrapatos preparados apresentou o resultado esperado. Sugere-se a inserção de outros anticorpos monoclonais, como nc82 devido a maior efetividade, para a obtenção de uma melhor coloração dos glomérulos.

Ao se determinar as médias dos volumes dos glomérulos nos dois lobos olfativos do macho (média dos glomérulos do L1: 121,815 μm^3 e média dos glomérulos do L2: 119,913 μm^3) e compará-las com os valores individuais dos glomérulos, é possível identificar a presença ou não de macroglomérulos. De acordo com Kleineidam et al⁹², o volume dos macroglomérulos é superior à média dos volumes em nove a dez vezes. Como neste estudo o maior glomérulo do macho foi o 16, e este glomérulo no L1 (200,699 μm^3) foi 1,6 vezes superior à média

correspondente e o localizado no L2 ($242,920 \mu\text{m}^3$) foi duas vezes superior à média correspondente, sugerindo assim que o macho não possui macroglomérulos. Espécies que apresentam macroglomérulos, tais como a mosca *Drosophila melanogaster*, precisam identificar feromônios sexuais em longas distâncias, por isso, estes glomérulos foram adaptados para perceber nesta espécie o composto 11-cis-vaccenyl acetato⁶⁵, no entanto, em carrapatos comumente a cópula ocorre no próprio hospedeiro e os feromônios sexuais atuam em curtas distâncias^{42,55,75}. Desta maneira, a ausência de macroglomérulos em carrapatos poderia ser justificada, uma vez que seus glomérulos não possuem capacidade de reconhecer feromônios sexuais a longas distâncias por não apresentarem esta adaptação.

Assim como observado em fêmeas de insetos, as fêmeas de *A. sculptum* também não apresentaram macroglomérulos^{22,23,87,88,93}. Semelhante a obtenção das médias dos volumes dos glomérulos do macho, determinaram-se as médias dos glomérulos do L1 e L2 da fêmea 1 ($160,043 \mu\text{m}^3$ e $136,461 \mu\text{m}^3$), fêmea 2 ($110,463 \mu\text{m}^3$ e $99,913 \mu\text{m}^3$) e fêmea 3 ($110,646 \mu\text{m}^3$ e $110,128 \mu\text{m}^3$). O maior glomérulo na fêmea 1 foi o 3, enquanto nas fêmeas 2 e 3 foi o glomérulo 16. Como esperado nenhum destes glomérulos apresentou volume superior à média em mais de duas vezes.

Os mapas tridimensionais dos lobos antenais em insetos têm mostrado importância na compreensão dos princípios fundamentais da integração da informação olfativa central e a discriminação a nível dos lobos antenais e nos altos centros cerebrais, assim como demonstrado em abelhas^{86,94}, *D. melanogaster*⁹⁵ e mosquitos^{23,24}. Estas reconstruções possibilitam comparações do processamento e da regulação da olfação intra- e interespecies. Em carrapatos este foi o primeiro trabalho em que se realizou a reconstrução tridimensional dos lobos olfativos, mas sugere-se a utilização de outra técnica que possibilite a obtenção de um maior número de machos e fêmeas marcados pelos corantes para posterior comparação. A marcação de neurônios sensoriais olfativos de sensilas específicas do órgão de Haller de *A. sculptum*, como as sensilas DI.1 e DII.1, permitiriam a distinção dos glomérulos que identificam feromônios de importância já reconhecida nesta espécie, para a comparação destes com os demais, a fim de se excluir a presença de macroglomérulos. A utilização de outro programa, como o Amira 6.2, também poderá ser uma alternativa para obtenção de dados mais precisos.

7 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a visualização das projeções neuronais das sensilas olfativas do órgão de Haller de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas confinadas aos glomérulos, no interior dos lobos olfativos, do singânglio. Em adição, observou-se glomérulos homólogos no interior dos lobos olfativos de um mesmo indivíduo e entre indivíduos do mesmo sexo e de sexos diferentes. Semelhante ao encontrado em outra espécie de carrapato e em insetos e ácaros. O número de glomérulos encontrados em macho e fêmeas de *A. sculptum* são semelhantes e não foram observados macroglomérulos.

A reconstrução tridimensional realizada por meio das marcações dos glomérulos de *A. sculptum* em cada secção de imagem obtida pelo microscópio confocal ainda é incipiente, mas possibilita a visualização das diferenças existentes intra- e interespécies. Os mapas tridimensionais já realizados em insetos foram os passos iniciais para a compreensão do processamento e da regulação da olfação, informações importantes para o conhecimento da biologia do parasito e essenciais para permitir o avanço dos estudos na área. Desta maneira, estes representam resultados iniciais para a compreensão da interação entre sistema periférico e central e do processamento da informação olfativa nos carrapatos. Avanços nesta área poderão permitir o desenvolvimento de novos métodos de controle.

REFERÊNCIAS

1. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasite and vectors [online]. 2010;3:26 [acesso 23 mar 2015]. Disponível: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/26>.
2. Sonenshine DE, Roe RM. Biology of ticks. 2 ed. Vol 1 e 2. Oxford: Oxford University Press; 2014. 539p.
3. De La Fuente J. The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). Experimental and Applied Acarology. 2003;29:331-344.
4. De La Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine, DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Frontiers in Bioscience. 2008;13:6938-6946.
5. Carr AL, Roe M. Acarine attractants: Chemoreception, bioassay, chemistry and control. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2016;131:60–79.
6. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology. 2004;129:3-14.
7. Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, Shao R, Barker SC. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa. 2010;2528:1-28.
8. Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. Frontiers in Bioscience. 2009;14:2857-2877.
9. Guglielmone AA, Nava S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names- with notes on confusions and misidentifications. Zootaxa. 2014;3767:256.
10. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. And *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:252–76
11. Labruna MB. Ecology of Rickettsia in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann NY Acad Sci. 2009;1166:156–66.
12. Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.
13. Scoles GA, Ueti MW. *Amblyomma cajennense* is na intrastadial biological vector of *Theileria equi*. Parasites & Vectors. 2013;6:306.

14. Sonenshine DE. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Parasitology*. 2004; 129: S405-S425.
15. Steullet P, Guerin PM. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsos I of the tick *Amblyomma vadeatum* Fabricius (Ixodidae): II. Receptors outside the Haller's organ capsule. *J Comp Physiol A*. 1994;174:39-47.
16. Leonovich SA, Belozero VN. Regeneration of Haller's sensory organ in two species of hard ticks of the genus *Haemaphysalis* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 2004;33:131-144.
17. Allan SA. Chemical ecology of tick-host interactions. In: Takken W, Knols BGJ, editors. *Ecology and control of vector-borne diseases*. Vol.2. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2010.p.327-48.
18. Borges LMF, Li AY, Olafson PU, Renthall R, Bauchan GR, Lohmeyer KH, Pérez de León AA. Neuronal projections from the Haller's organ and palp sensilla to the synganglion of *Amblyomma americanum*. *Braz. J. Vet. Parasitol*. 2016;25(2):217-224.
19. Roma GC, Nunes PH, Oliveira PR, Remédio RN, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Central nervous system of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae): na ultrastructural study. *Parasitol Res*. 2012;111:1277-85.
20. Roma GC, Camargo-Mathias MI, Nunes PH, Bechara GH. Changes in the synganglion of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,1806) (Acari: Ixodidae) female ticks exposed to permethrin: An ultrastructural overview. *Acta Trop*. 2014;136:19-26.
21. Borges LMF, Li AY, Olafson PU, Renthall R, Bauchan GR, Lohmeyer KH, Pérez de León AA. Confocal microscopy of Haller's organ and palp sensillar projections to the synganglion of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: ixodidae). II Workshop on Recent Advances and Applications in Confocal and Widefield Microscopy; Campinas, Brasil. São Paulo; 2015.
22. Barrozo RB, Couton L, Lazzari CR, Insausti TC, Minoli AS, Fresquet N, Rospars JP, Anton S. Antennal pathways in the central nervous system of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct Dev*. 2009;38:101-10.
23. Ignell R, Dekker T, Ghaninia M, Hansson BS. Architecture of the Mosquito Deutocerebrum. *J Comp Neurol*. 2005;493:207-40.
24. Ghaninia M, Hansson BS, Ignell R. The antennal lobe of the African malária mosquito, *Anopheles gambiae* e innervation and three-dimensional reconstruction. *Arthropod Struct Dev*. 2007;36:23-39.
25. Sampieri BR, Moreira JCS, Páez FAR, Camargo-Mathias MI. Comparative morphology of the reproductive system and germ cells of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae): A contribution to Ixodidae systematics. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2016;4:95-107.

26. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MPJ, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol*. 2006;40:83–100.
27. Labruna MB, Kamakura O, Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco RC. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(3):459-460.
28. Aragão HB, Fonseca F. Notas de ixodologia: V-A propósito da validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari: Ixodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1953;51:485-492.
29. Kohls GM. *Amblyomma imitator*, a New Species of Tick from Texas and Mexico, and Remarks on the Synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina-Ixodidae). *The Journal of Parasitology*. 1958;44(4):430-433.
30. Labruna MB, Soares HS, Cabrera RR, Soares JF, Martins TF. Cross-mating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2011;54:41–49.
31. Mastropaolo M, Mangold AJ, Nava S, Guglielmone AA. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp Appl Acarol*. 2011;53:371–375.
32. Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone AA, Cáceres AG, Guzmán-Cornejo CM, Dirden LA, Faccini JLH, León R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*. 2013;13:267.
33. Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, Terassini FA, Camargo LMA, Peterka CRL, Pacheco RC, Dias RA, Nunes PH, Scofield A, Ramirez DG, Campos AK, Barros-Battesti DM, Horta MC, Guilloux AGA, Labruna MB, Marcili A, Benatti HR. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors*. 2016;9:186.
34. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet Par*. 2003;113:273–88.
35. Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(7):1111-1113.
36. Brasília (Distrito Federal). Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/693-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-maculosa/11269-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 16 jan 2017.
37. Oliveira PR. Biologia e Controle de *Amblyomma cajennense*. *Rev. Bras. Parasitol.Vet*. 2004;13(1):118-122.

38. Oliveira PR, Borges LMF, Lopes CML, Leite RC. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2000;92:295–301.
39. Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JLH, Gennari SM. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2002;105:65–77.
40. Oliver Jr JH. Biology and Systematics of Ticks (Acari: Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1989;20:397-430.
41. Cabrera RR, Labruna MB. Influence of Photoperiod and Temperature on the Larval Behavioral Diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2009;1303-1309.
42. Sonenshine DE. Tick pheromones and their use in tick control. *Annu. Rev. Entomol.* 2006;51:557–80.
43. Ivanov VP, Leonovich SA. Sensory organs. In: Balashov YS, Raikhel AS, Hoogstraal H. *An atlas of ixodid tick ultrastructure*. 1.ed. Leningrad: Naka Publishers; 1983, p. 191-220.
44. Rashbass C. Sense organs - transducers of the environment. *Reports on Progress in Physics*. 1967;30:375-407.
45. Wallade SM, Rice MJ. The sensory basis of tick feeding behaviour. In: Obenchain FD, Galun R, editors. *Physiology of Ticks*. New York: Pergamon Press; 1982. p.71-118.
46. Lees AD. The sensory physiology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Journal of Experimental Biology*. 1948;25(2):145.
47. Foelix RF, Axtell RC. Ultrastructure of Haller's organ in the tick *Amblyomma americanum* (L). *Z Zellforsch*. 1972;124:275-292.
48. Belozarov VN, Kok DJ, Fourie LJ. Regeneration of Haller's sensory organ in the tick, *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*. 1997;21:629–648.
49. Soares SF, Louly CCB, Marion-Poll F, Ribeiro MFB, Borges LMF. Study on cheliceral sensilla of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) involved in taste perception of phagostimulants. *Acta Tropica*. 2013;126:75–83.
50. Ferreira LL, Soares SF, Oliveira Filho JG, Oliveira TT, Pérez de León AA, Borges LMF. Role of *Rhipicephalus microplus* cheliceral receptors in gustation and host differentiation. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015;6(3):228–233.
51. Sonenshine DE. *Biology of ticks*, 1. ed. New York: Oxford University Press, USA, 1991. 472 p.
52. Slieffer EH. The structure of arthropod chemoreceptors. *Annual Review of Entomology*. 1970;15:121-142.

53. Haggart DA, Davis EE. Ammonia-Sensitive Neurones on the First Tarsi of the Tick, *Rhipicephalus Sanguineus*. J. Insect Physiol. 1980;26:517-23.
54. Wallade SM. Tip-Recording from Ixodid Tick Olfactory Sensilla: Responses to Tick Related Odours. J Comp Physiol. 1982;148:411-418.
55. Soares SF, Borges LMF. Electrophysiological responses of the olfactory receptors of the tick *Amblyomma Cajennense* (Acari: Ixodidae) to host-related and tick pheromone-related synthetic compounds. Acta Trop. 2012;124:192-98.
56. Steullet P, Guerin PM. Perception of breath components by the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). Journal of Comparative Physiology A. 1992;170:665–676.
57. Steullet P, Guerin PM. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). I. Receptors within the Haller's organ capsule. Journal of Comparative Physiology A. 1994;174:27–38.
58. Steullet P, Guerin PM. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae). II. Receptors outside the Haller's organ capsule. Journal of Comparative Physiology A. 1994;174:39–47.
59. Hess E, Vlimant M. The tarsal sensory system of *Amblyomma variegatum* Fabricius (Ixodidae, Metastriata) I. Wall pore and terminal pore sensilla. Ver Suisse Zool. 1982;89:713-729.
60. Leonovich SA. The Main Evolutionary Trends in Sensory Organs and Questing Behavior of Parasitiform Ticks and Mites. Entomological Review. 2013;93(9):1190–1195.
61. Leonovich SA. Sensory Systems of Parasitic Ticks and Mites, Nauka Press, St. Petersburg, 2006.
62. Rospars JP. Structure and Developmente of the Insect Antennodeutocerebral System. Int J Insect Morphol e Embryol. 1988;17(3):243-94.
63. Hansson BS, Stensmyr MC. Evolution of Insect Olfaction. Neuron. 2011;72:698-711.
64. Lorenzo MG, Melo ACA. Olfção e Comportamento. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2012; 120.
65. Sachse S, Krieger J. Olfaction in insects: The primary processes of odor recgnition and coding. e-Neuroforum. 2011;2:49-60.
66. Ramdya P, Benton R. Evolving olfactory systems on the fly. Trends Genet. 2010;26:307-16.
67. Zwiebel LJ, Takken W. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34:645-52.

68. Klein BD. Cunningham tratado de fisiologia veterinária. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014. 608p.
69. Benton R, Vannice K, Gomez-Dias C, Vosshall L. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*. 2009;136:149-62.
70. Gulia-Nuss M et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature communications*. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncomms10507>
71. Liggett SB. Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling, *Sci. Signal*. 2011;4:36.
72. Rodgers ME, Jani MK, Vogt RG. An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol*. 1999;202:1625–1637.
73. Renthal R, Manghnani L, Bernal S, Qu Y, Griffith WP, Lohmeyer K, Guerrero FD, Borges LMF, de León AP. The chemosensory appendage proteome of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) reveals putative odorant-binding and other chemoreception-related proteins. *Insect Science*. 2016;1-13.
74. Homberg U, Christensen TA, Hildebrand JG. Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Ann. Rev. Entomol*. 1989;34:477-501.
75. Louly CCB, Silveira DN, Soares SF, Ferri PH, Melo ACC, Borges LMF. More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):60-5.
76. Coons LB, Roshdy MA, Axtell RC. Fine structure of the central nervous system of *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma americanum* and *Argas arboreus* (Ixodidea). *J Parasitol*. 1974;60:687–698.
77. El Shoura SM. Fine structure of the synganglion of *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea: Argasidae). *Acarologia*. 1986;27:295–302.
78. Binnington KC, Obenchain FD. Structure and function of the circulatory, nervous, and neuroendocrine system of ticks. In: Obenchain FD, Galun R (eds) *Physiology of ticks*. Pergamon, Oxford, 1982. pp 351–398.
79. Ivanov VP. Central nervous system. In: Balashov YuS (ed) *Na Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure*, Entomol Soc Am Spec Publ, 1983. pp 175-190.
80. Lees K, Bowman AS. Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. *Invert Neurosci*. 2007;7:183–198.
81. Prullage JB, Pound M, Meola SM. Synganglial morphology and neurosecretory centers of adult *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 1992;29(6):1023-1034.

82. Van Wijk M, Wadman WJ, Sabelis MW. Morphology of the olfactory system in the predatory mite *Phytoseiulus Persimilis*. *Exp Appl Acarol*. 2006;40:217–229.
83. Van Wijk M, Wadman WJ, Sabelis MW. Gross morphology of the central nervous system of a phytoseiid mite. *Exp Appl Acarol*. 2006;40:205–216.
84. Ignell R, Sengul MS, Hill SR, Hansson BS. Odour coding and neural connections. In: Takken W, Knols BGJ, editors. *Ecology and control of vector-borne diseases*. Vol.2. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2010.p.63-90.
85. Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora; 2010. 264p.
86. Galizia CG, Menzel R. The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J Insect Physiol*. 2001;47:115–130.
87. Kuebler LS, Kelber C, Kleineidam CJ. Distinct Antennal Lobe Phenotypes in the Leaf Cutting Ant (*Atta vollenweideri*). *J CompNeurol*. 2010;518:352-65.
88. Zube C, Kleineidam CJ, Kirschner S, Neef J, Rössler W. Organization of the Olfactory Pathway and Odor Processing in the Antennal Lobe of the Ant *Camponotus floridanus*. *The Journal of comparative neurology*. 2008;506:425-411.
89. Das Prithwiraj D, Fadamiro HY. Species and sexual differences in antennal lobe architecture and glomerular organization in two parasitoids with diferente degree of host specificity, *Microplitis croceipes* and *Cotesia marginiventris*. *CellTissue Res*. 2013;352:227–235.
90. Josek, T. A deeper look into the morphology and receptors found in the tick(Acari: Ixodidae) chemoperception structure, the Haller's organ. [Thesis]. Illinois: University of Illinois at Urbana-Champaign; 2015.
91. Laissue PP, Reiter C, Hiesinger PR, Stocker RF, Halter S, Fischbach KF. Three-Dimensional Reconstruction of the Antennal Lobe in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*. 1999;405:543-552.
92. Kleineidam CJ, Obermayer M, Halbich W, Rössler W. Macroglomerulus in the Antennal Lobe of Leaf-cutting Ant Workers and its Possible Functional Significance. *Chem. Senses*. 2005;30:383–392.
93. Mysore K, Subramanian KA, Sarasij RC, Suresh A, Shymala BV, VijayRaghavan K, Rodrigues V. Caste and sex specific olfactory glomerular organization and brain architecture in two sympatric ant species *Camponotus sericeus* and *Camponotus compressus* (Fabricius, 1798). *Arthropod Structure & Development*. 2009;38:485-497.
94. Sachse S, Rappert A, Galizia CG. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci*. 1999;11:3970 – 3982.

95. Vosshall L, Wong AM, Axel R. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* 2000; 96:725–736.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFG) para manutenção da colônia de carrapatos em coelhos.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 05 de agosto de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 24/14

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Novas tecnologias para o controle de carrapatos e de doenças transmitidas por carrapatos
2. **Pesquisador Responsável:** Lígia Miranda Ferreira Borges
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** IPTSP/UFG
4. **Pesquisadores Participantes:**

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
Lígia Miranda Ferreira Borges http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4723297J0	IPTSP/UFG	Médica Veterinária	Doutor	Coordenadora
Adalberto A. Pérez de León http://www.ars.usda.gov/pandp/people/people.htm?personid=43579	KBUSLIRL/USDA		Doutor	Pesquisador visitante Condução dos testes com vacinas
Jaires Gomes de Oliveira Filho http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4316397Z3	EVZ/UFG	Médico Veterinário	Mestre	Condução dos testes com formulações de liberação lenta, testes de repelência e testes de liberação dupla.
Lorena Lopes Ferreira http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4401765J8	EVZ/UFG	Médica Veterinária	Mestre	Avaliação da presença de repelentes naturais no odor de asininos contra o carrapato <i>A. cajennense</i>
Rafael Cavalcante Sanguanini http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4384559Y7	EVZ/UFG		Graduando	Auxílio na manutenção da colônia de carrapatos, cuidado com os animais e execução dos testes em geral.

5. **Unidade onde será realizado:** EVZ/IPTSP
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 11/04/2014
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 11/06/2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **Aprovou** o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

III - Data da reunião: 14/07/2014

RENATA
MAZARO:12343
522812

Assinado de forma digital por RENATA
MAZARO:12343522812
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=Autoridade
Certificadora Raiz Brasileira V2, ou=AC
SOLUTI, ou=AC SOLUTI Multipla,
ou=Certificado PF A3, cn=RENATA
MAZARO:12343522812
Dados: 2014.08.05 11:52:29 -03'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG