

B. H. 102/98
SECRET.
DE
PÓS-GRAD
I. E.

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

Departamento de Biologia Celular

Carlos Augusto Borba Meyer Normann

A Espermio gênese em *Boophilus microplus*
(Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): aspectos
estruturais e ultra-estruturais.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida em 08/06/98, candidato a)
Carlos Augusto
Borba Meyer Normann
e aprovada pela Comissão Julgadora.

08/06/98 H. Dolder

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de Biologia
Celular.

Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Campinas - SP, junho de 1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
CHAMADA:	Unicamp
Nº	781e
Ex	
NUMERO BO/	34734
DOC.	395/98
C	☐
D	☒
RECO	R\$ 11,00
DATA	11/08/98
CPD	

CM-00115308-9

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA-UNICAMP**

Normann, Carlos Borba Meyer

N781e A espermiogênese em boophilus microplus
(Canestrini, 1987) (Acari: ixodidae): aspectos
estruturais e ultra-estruturais/Carlos Borba Meyer
Normann.--Campinas, SP.[s.n], 1998.

79f: illus.

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
de Campinas, Instituto de Biologia.

1.Carrapato-boi. 2. Espermatogênese. 3.Histoquímica.
I.Dolder, Mary Anne Heidi. II. \universidade Estadual de
Campinas. III. Título.

Local e data: Campinas, 08 de junho de 1998.

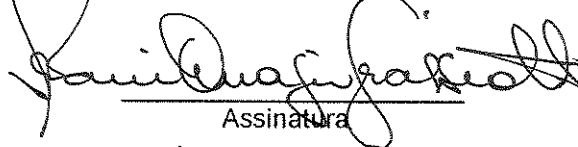
Banca Examinadora:

Titulares:

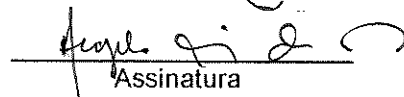
Profa. Dra. MARY ANNE HEIDI DOLDER
(orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. IRANI QUAGGIO-GRASSIROTTO


Assinatura

Prof. Dr. ÂNGELO PIRES DO PRADO


Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. MARIA LÚCIA FURLAN WADA.....

Assinatura

Índice:

1. Resumo.....	03
2. Introdução.....	05
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Microscopia de luz: histologia e citoquímica (MO).....	11
3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	12
3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	12
4. Resultados.....	14
4.1. Aspectos histológicos e citoquímicos do testículo.....	14
4.2. Fases iniciais da espermiogênese: ultra-estrutura.....	22
4.3. Fases finais da espermiogênese: ultra-estrutura.....	32
4.4. O espermatozóide: morfologia e ultra-estrutura.....	42
5. Discussão e Conclusões.....	50
6. Agradecimentos.....	70
7. Referências bibliográficas.....	71

Resumo:

O presente trabalho objetiva descrever a espermiogênese do carrapato do boi (*Boophilus microplus*) (Canestrini, 1887), sob aspectos histológicos, histoquímicos, morfológicos e ultra-estruturais. A espermatogênese ocorre no testículo de carrapatos que iniciaram o repasto com sangue. As células da linhagem gamética encontram-se isoladas em cistos. A espermiogênese inicia-se no organismo masculino, sendo concluída no aparelho reprodutor feminino, em fêmeas jovens. Espermatócitos encistados, após uma fase de crescimento, sofrem meiose e iniciam a diferenciação em espermátides redondas e, posteriormente, em alongadas. No organismo feminino dá-se a transformação das espermátides alongadas em espermatozóides.

A espermiogênese envolve a fusão de uma série de vesículas, situadas logo abaixo da membrana plasmática -as cisternas sub-superficiais-, em uma única área limitada por membranas, a cavidade cistérnica. A formação da cavidade se dá a partir do deslocamento das cisternas para o pólo oposto ao que se encontra o núcleo. Esse processo é denominado polarização, sendo, portanto, originadas espermátides polarizadas. As cisternas, aparentemente, são formadas por túbulos do retículo endoplasmático; esses túbulos apresentam uma membrana notadamente elétron-densa. Apresentam conteúdo glicoprotéico, demonstrando uma reação argirófila que aumenta gradualmente durante a diferenciação. No citoplasma de espermátides redondas e polarizadas, observam-se abundantes figuras de retículo endoplasmático rugoso, polissomos, complexos de Golgi, mitocôndrias, túbulos de retículo liso e, em espermátides com a cavidade cistérnica em formação, corpos multivesiculares. Também se observa a formação de uma vesícula fortemente PAS-positiva em posição supra-nuclear, a qual a literatura sugere tratar-se do acrossomo.

As espermátides redondas passam por um alongamento, o qual é concomitante com a formação da cavidade cistérnica e com o deslocamento pôsterolateral do núcleo na célula. As espermátides alongadas, com a invaginação da cavidade, passam a dividir-se em três regiões cilíndricas concêntricas. A primeira é o tubo externo, para onde se desloca o núcleo. A segunda é a cavidade, que apresenta uma matriz mais elétron-densa que o citoplasma da espermátide, de caráter glicoprotéico. No terceiro compartimento, o cilindro interno, encontram-se muitas mitocôndrias; o cilindro interno constitui-se no centro de invaginação da espermátide em alongamento.

Na membrana da cavidade cistérnica encontram-se projeções formadas durante a fusão das cisternas. Essas projeções são bastante complexas, sendo formadas por um eixo protéico fibroso, envolvido por membrana da cavidade.

No organismo feminino, observa-se a eversão da espermatíde. Nesse processo, observa-se a invaginação da membrana plasmática, formando o denominada canal acrossômico. Este canal encontra-se revestido por uma vesícula que se alonga, como uma cisterna, a qual é aparentemente derivada da vesícula supra-nuclear glicoprotéica presente em espermatídes redondas polarizadas. Esta vesícula, a qual encontra-se abaixo da membrana plasmática da espermatíde alongada, encontra-se abaixo da membrana do canal. Paralelo a este evento, ocorre a eversão da membrana da cavidade cistérnica, a qual passa a recobrir a superfície externa do espermatozóide. Observam-se as projeções da membrana da cavidade cistérnica recobrindo o espermatozóide, excetuando-se em dois pontos: a porção posterior, desprovida de projeções, e a extremidade anterior, na qual as projeções apresentam morfologia bastante diversa da visualizada no restante da célula. Estas projeções são ultra-estruturalmente mais simples, tendo um pedúnculo largo e bastante conspícuo. As projeções do espermatozóide aparentemente estão ligadas à geração de movimento, uma vez que estas estão ligadas a elementos do citoesqueleto.

Observa-se que o citoplasma dos espermatozoides apresenta uma clara divisão em uma área central de filamentos mais espessos, tipo intermediários, e outra cortical, rica em microfilamentos. O núcleo dessas células encontra-se na porção posterior, lateralmente ao canal acrossômico. As mitocôndrias encontram-se dispersas no citoplasma das porções anterior e médio-anterior; nas áreas médio-posterior e posterior do espermatozóide, elas situam-se entre a região cortical e central do citoplasma. O movimento dos espermatozoides, observado *in vivo*, é de avanço por torção.

1. Introdução

Desde a Antigüidade registram-se os transtornos causados ao homem pela presença de carrapatos. Sabe-se de registros feitos por autores clássicos como Catão, Aristóteles e Homero. Além da hematofagia e do mal-estar causado, são vetores de uma série de doenças, tanto de humanos quanto de animais, o que também faz com que interfiram na vida econômica.

Entre os Arthropoda, somente mosquitos superam aos carrapatos na variedade de patógenos transmitidos. A ampla lista de parasitas veiculados por carrapatos inclui fungos, vírus, riquetsias, bactérias, protozoários e nematóides (SAUER *et al.*, 1995; CRAMPTON, 1996).

Em 1985, a FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura –, estimou os prejuízos diretos e indiretos causados por carrapatos em sete bilhões de dólares ao ano. O relatório anual desse organismo estima o prejuízo em US\$ 7,5 bilhões em 1995 (BOWMANN *et al.*, 1996).

Ectoparasitos hematófagos obrigatórios, os carrapatos têm como hospedeiros mamíferos, aves, répteis e (pelo menos) um anfíbio. Comparando-os a outros parasitas, seu modo de associar-se a hospedeiros é único, pois alimentam-se durante períodos longos; eles ficam ligados vários dias ao hospedeiro através de suas peças bucais (FORTES, 1993). Essa estratégia de hematofagia difere bastante daquela desenvolvida por mosquitos, sanguessugas, percevejos, morcegos vampiros e pulgas (SAUER *et al.*, 1995).

Justamente por isso, carrapatos tornam-se um elo importante na cadeia alimentar. Além da óbvia pressão seletiva que exercem como parasitas, carrapatos são alimento para um certo número de predadores, sendo mais conhecido o exemplo de aves, como garças, anas e pequenos falcões. Em projetos de manejo de fauna no continente africano, é comum que grandes animais transferidos para reservas sejam banhados com carrapaticidas. O ato de eliminar o carrapato, ao invés de beneficiar o animal, causa-lhe prejuízos. As aves que alertam contra alterações no meio (como chegada de predadores, por exemplo) ficam sem alimento – o próprio carrapato –, o que afasta-as dos herbívoros. Também cabe lembrar que muitos hospedeiros de carrapatos são espécies ameaçadas de extinção; pela especificidade da relação parasito-hospedeiro, alguns carrapatos acabam, portanto, engrossando listas de espécies ameaçadas (DURDEN & KEIRANS, 1996).

Os carrapatos são agrupados na subordem Ixodides, a qual compreende três famílias: Nutalliellidae (com apenas uma espécie, o *Nutalliella namaqua* (Bedford) das regiões sul e oriental do continente africano); e os cosmopolitas Argasidae (carrapatos moles) e Ixodidae (carrapatos duros). Ixodidae são divididos em duas sub-famílias: Prostriata, com um único gênero -*Ixodes*- (L.) e cerca de 250 espécies; e Metastriata, com 12 gêneros e cerca de 426 espécies (SONENSHINE, 1991; CRAMPTON *et al.*, 1996). A ordem Acarina, como as demais da classe Arachnida, são agrupados no subfilo Chelicerata. Este táxon evoluiu separadamente de outros Arthropoda desde o Cambriano inicial, originando peculiaridades e convergências em relação aos demais artrópodes (ALBERTI, 1995; RUPPERT & BARNES, 1996).

Entre os muitos Metastriata, *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) é um carrapato que pertence ao gênero de Ixodida menos estudados a respeito da espermatogênese, sobretudo em aspectos histoquímicos e ultra-estruturais. *B. microplus* é originário das áreas tropicais da Ásia, espalhando-se pelo mundo em distribuição circum-tropical, a partir da importação de gado zebuino e bubalino oriundos daquele continente (WHARTON, 1974, *apud* GARCIA, R., 1993; FUDALEWICZ-NIEMCZYLA, 1993). O gênero *Boophilus* compreende apenas cinco espécies, as quais somente surgiram nas Américas e Austrália nos últimos 200 anos. A distribuição original de *B. microplus* era restrita a regiões tropicais e subtropicais da Ásia; *B. kohlsi* e *B. annulatus* (Say, 1821) são originários da região mediterrânea, e *B. decoloratus* (Koch, 1844) e *B. geigy*, da África ao sul do Saara (BALASHOV, 1994).

Além da questão econômica, também para estudos de filogenia podem ser empregados conhecimentos vindos do estudo da formação de gametas. No gênero *Boophilus*, aspectos citogenéticos ligados à gametogênese são descritos por LONDT & SPICKETT (1976), OSBURN *et al.* (1980) e por GARCIA *et al.* (1993) e GARCIA (1993).

O trabalho de LONDT & SPICKETT (1976) descreve o desenvolvimento das gônadas e a gametogênese de *Boophilus decoloratus*, o qual apresenta um cariótipo de 20 autossomos e um cromossomo masculino ímpar X para a espécie (macho 20 + X, fêmea 20). OSBURN *et al.* (1980) esquematizam, em *B. microplus* e *B. annulatus*, regionalizações baseadas nos tipos celulares encontrados ao longo do testículo; estes, por sua vez, apóiam-se nas regionalizações descritas por OLIVER & BRINTON (1972).

Esses autores dividiram os testículos de carrapatos Metastriata arbitrariamente em seis áreas de igual tamanho. Em machos plenamente alimentados, pode-se ter uma visão bem clara dessa zonação. Na área 1, contígua com o vaso eferente, ocorrem gônias e espermátócitos iniciais. Na área 2, notam-se alguns espermátócitos iniciais e predomínio de espermátócitos em crescimento. Na área 3, também ocorre uma prevalência dos espermátócitos em desenvolvimento, sendo encontradas figuras de meiose.

Na área 4, além das figuras de meiose, ocorrem espermátides iniciais, que predominam na área 5. Finalmente, na porção terminal do testículo, encontram-se espermátides alongadas, as quais são evacuadas do testículo, dirigindo-se para a vesícula seminal. No momento da cópula, essas espermátides alongadas são introduzidas no organismo feminino. A partir desse estudo, foi determinada, para *Boophilus annulatus* e *B. microplus*, um $n=10$ ou 11; nos machos, o número de cromossomos é 21, e em fêmeas, 20 (OLIVER & BRINTON, 1972; OSBURN *et al.*, 1980).

GARCIA *et al.* (1993) e GARCIA (1993) analisa o cariótipo de *B. microplus*, a partir de técnicas de bandeamento C e Ag-NOR. Pelo bandeamento C, foi encontrada pouca heterocromatina, a qual predomina em áreas centroméricas e teloméricas. O bandeamento Ag-NOR detectou duas regiões NOR (organizadores nucleolares), uma no cromossomo X e outra em cromossomo de par autossômico.

Estudos sobre aspectos da anatomia e histologia do aparelho reprodutor de carrapatos datam de mais de cem anos atrás, como os trabalhos de HELLER (1858) e PAGENSTECHER (1861). Artigos sobre espermatogênese nesse grupo começam a surgir a partir do início do século XX (CHRISTOPHERS, 1906; BONNET, 1907; CASTEEL, 1917; NORDENSKIÖLD, 1920; TUZET & MILLOT, 1937; SHARMA, 1944; BALASHOV, 1972).

CHRISTOPHERS (1906), analisando detalhes de anatomia e histologia de *Ornithodoros sauvigni* (Audouin, 1826), *Rhipicephalus annulatus* e *Hyalomma aegyptum*, descreve o que chamou de "degenerações anormais" nos bordos de espermatócitos crescidos. BONNET (1907), ao analisar a mesma estrutura, credita-lhe a função de ser a fonte de "futuros espermatozóides".

CASTEEL (1917), em *Argas miniatus* (L.) cita a presença de "inclusões citoplasmáticas", em espermatócitos e em estágios mais adiantados. Essas inclusões foram reconhecidas pelo autor como "mitocôndrias verdadeiras, corpos extra-nucleares e corpos vesiculares". Na superfície externa do citoplasma, notou uma diferenciação de forma similar a uma colmeia, marcada por estriações perpendiculares à superfície celular. Esse autor descreve ainda a espermiogênese, iniciando com a migração do núcleo para um dos lados da célula (polarização), seguindo-se a formação de um anel mitocondrial, movimento dos corpos vesiculares em direção ao núcleo (com posterior desintegração dos corpos) e, finalmente, desaparecendo a camada estriada superficial próximo ao núcleo. As estriações são descritas como sendo formadoras de "processos cilióides". Mais adiante, ocorre a formação de um "cilindro interno", que se desenvolve a partir do processo digitiforme formado no pólo oposto ao que o núcleo se encontra, migrando o núcleo pela base desse processo, ao mesmo tempo em que modifica sua forma.

NORDENSKIÖLD (1920), ao descrever a espermatogênese em *Ixodes ricinus* (L.) compara a região periférica dos espermátócitos, descrita anteriormente por CASTEEL (*op. cit.*) a uma *zona pellucida*; este autor também analisa a polarização do núcleo na espermiogênese, diferenciando o citoplasma em endoplasma e ectoplasma.

TUZET & MILLOT (1937), estudando várias espécies de carrapatos do gênero *Ixodes*, denominam como lipoplasma à zona que SHARMA (1944), em *Hyalomma aegyptum*, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e *Argas persicus* (Oken, 1818), chamou de estriações periféricas encontradas nos espermátócitos e em espermátides jovens. SHARMA ainda tentou deduzir a presença de mecanismos de movimentação a partir das estruturas observadas, identificando um provável "centrossoma" na extremidade anterior do gameta.

BALASHOV (1972), ao discorrer sobre vários aspectos da biologia de carrapatos, descreve a espermatogênese nesses animais. Para tanto, ele comparou o Ixodidae *Hyalomma asiaticum* a alguns Argasidae. BALASHOV cita a presença de duas linhagens de gônias, primárias e secundárias, as quais estariam presentes nos primórdios de testículos de larvas. O mesmo também é citado, para *Argas miniatus* (L.) por JÚLIO (1978).

Em ninfas, espermatogônias secundárias são mencionadas como que se formando continuamente, desenvolvendo e sofrendo de 5 a 6 divisões sucessivas, dentro dos cistos, com 32 a 64 espermátócitos primários; estágios seguintes de espermatogênese são observados apenas em indivíduos adultos. Espermátócitos primários sofrem um notável desenvolvimento; estes crescem de quatro a cinco vezes em relação às espermatogônias, apresentando um grande aumento de volume de citoplasma e núcleo (BALASHOV, 1972).

Na gametogênese masculina de carrapatos, OLIVER (1974) enumera uma série de características bastante peculiares nesses organismos. São elas: espermátócitos de grandes dimensões; a presença de pontes citoplasmáticas na espermatogênese, que persistem na espermiogênese inicial; a presença de uma zona terminal de espermátides alongadas; posicionamento retrógrado do núcleo nos espermatozóides; a ausência de axonema; tamanho excepcionalmente grande, tanto de espermátócitos quanto de espermatozóides. Muitas dessas características são também encontradas em outros Arachnida (ALBERTI, 1980), mas poucos são os taxa que englobam tantos caracteres tão exóticos na espermatogênese quanto Ixodida.

Com o advento da microscopia eletrônica de transmissão, houve uma certa profusão de estudos ultra-estruturais da espermatogênese desses organismos (BREUCKER & HORSTMANN, 1972; EL SAID & SWIDERSKI, 1980; EL SHOURA, 1986, 1987; FELDMAN-MUHSAM & FILSHIE, 1976; OLIVER, 1991; PINKERTON *et al.*, 1982; REGER, 1961, 1962, 1963; SAHLI *et al.*, 1985; SULEIMAN & BROWN, 1978; WÜEST *et al.*, 1978).

Os trabalhos de ultra-estrutura da gametogênese masculina de carrapatos têm demonstrado vários aspectos em comum. SULEIMAN & BROWN (1978), estudando o desenvolvimento dos gametas de *Dermacentor variabilis*, descrevem as etapas da espermiogênese. Esta consiste de quatro transformações morfológicas: polarização, formação de cavidade cistérnica e invaginação, estas ocorrendo no organismo masculino, e eversão, a qual ocorre no organismo feminino.

A polarização envolve o movimento do núcleo em direção a um dos pólos da espermatíde e acúmulo de cisternas logo abaixo da superfície, no pólo oposto. A formação da cavidade cistérnica envolve a formação de uma membrana contínua, originada das cisternas sub-superficiais.

REGER (1961) denomina como "cisternas sub-superficiais" as vesículas abundantemente encontradas na região cortical de espermátócitos e espermátides iniciais. A origem dessas estruturas tem diferentes interpretações. REGER atribui ao retículo endoplasmático liso; mais tarde, esse autor reinterpreta a origem dessas vesículas, afirmando que a sua formação seria a partir do complexo de Golgi (REGER, 1974). BREUCKER & HORSTMANN (1972), OLIVER & BRINTON (1972), SULEIMAN & BROWN (1978) e SONENSHINE (1991) propõem que as cisternas sejam originadas a partir de dobras da membrana plasmática.

No processo de invaginação, a membrana da cavidade cistérnica na região adjacente ao núcleo, como o nome já indica, invagina-se; isto cria uma divisão da espermatíde em três regiões: o tubo interno, a própria cavidade cistérnica e o tubo externo, compartimentos esses limitados pela membrana periférica da cavidade cistérnica. Durante esta transformação, a espermatíde gradualmente sofre alongamento. O núcleo, condensado e alongado, aloja-se entre o tubo externo e a membrana celular, permanecendo na parte anterior da espermatíde alongada. Nesta forma, a espermatíde passa através do ducto testicular e atinge, pelo canal eferente, a vesícula seminal (SULEIMAN & BROWN, 1978).

A quarta transformação da espermiogênese, a eversão, ocorre na fêmea. Essa fase consiste na ruptura da membrana celular da espermatíde, com conseqüente projeção do tubo interno através desta zona rompida. Como conseqüência, ocorre a eversão também do tubo externo, com a exposição dos processos celulares e início da movimentação dos espermatozóides (BRINTON *et al.*, 1974; BORUT ; FELDMAN-MUHSAM, 1976; EL-SHOURA, 1986; FELDMAN-MUHSAM & FILSHIE, 1976; KHALIL, 1969; PINKERTON *et al.*, 1982; REGER, 1963; ROTHSCCHILD, 1961; SAHLI *et al.*, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1982; WÜEST *et al.*, 1978).

OLIVER (1991), ao revisar a gametogênese masculina de carrapatos, divide em três fases a espermiogênese. A pré-capacitação engloba os estágios de polarização, formação da cavidade cistérnica e alongamento. A capacitação,

que inicia no espermatóforo, durante a transferência para a fêmea; finalmente, a maturação dá-se no trato genital feminino. Os períodos de capacitação e maturação correspondem à eversão descrita por SULEIMAN & BROWN (1978).

O presente trabalho visa explorar características topográficas, citoquímicas e ultra-estruturais da espermiogênese em *Boophilus microplus*. Tais aspectos não foram muito explorados para este gênero, e pretendemos, a partir da comparação com outros organismos filogeneticamente relacionados, descrever o processo de formação de espermatozóides em *B. microplus*. Devido à grande riqueza dos eventos observados, dividiremos a descrição da espermiogênese em duas fases. Assim, após a análise da histologia e histoquímica da espermatogênese e espermiogênese, analisamos a formação de espermátides redondas e sua modificação em espermátides alongadas. Finalmente, este trabalho descreve aspectos estruturais e ultra-estruturais do espermatozóide de *B. microplus*.

3. Material & Métodos:

3.1. Microscopia de luz: histologia e citoquímica (MO).

Para microscopia de luz, empregaram-se apenas os testículos de carrapatos. Machos adultos alimentados e capacitados à cópula (ístar gonandro) foram coletados, diretamente de bovinos naturalmente infestados, em propriedades rurais situadas em Viamão-RS e Campinas-SP. A classificação dos carrapatos foi feita de acordo com as chaves dicotômicas de FORTES (1993). A coleta foi feita manualmente, a fim de não ferir o parasito.

Os testículos foram removidos sob microscópio estereoscópico, em placa de Petri parafinada; foi rebatida a porção dorsal do exoesqueleto, permitindo visualização do aparelho reprodutor e sua remoção inteiro. Durante a dissecação, o material foi mantido irrigado com os fixadores. O material foi fixado com etanol-ácido acético, 3:1 (v/v), durante uma hora, para as técnicas do PAS e reação de Feulgen. Para demais técnicas, empregou-se material fixado com paraformaldeído 4%-glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1 molar, pH 7,2, com 0,5 molar de sacarose para garantir isotonicidade e traços de CaCl_2 para manter a integridade das membranas (KARNOVSKY, 1965). O material foi fixado nesta solução de duas formas: a 4°C durante duas horas, ou em forno de microondas (JOAZEIRO, com.pes.). Nesta fixação, empregaram-se vinte pulsos de um segundo, em forno Sharp, na potência máxima.

Testículos inteiros foram desidratados em série alcoólica crescente (2 x etanol 70°, 2 x etanol 95° e 2 x etanol absoluto, 20' cada banho), pré-infiltrados em solução de resina/etanol absoluto, 1:1 (1 hora), infiltrado em resina (1 hora) e emblocado em moldes de borracha de silicone, polimerizando em estufa a 60°C. Empregaram-se as resinas Historesin (glicol-metacrilato) e Technovit 7100 (hidróxi-etil-metacrilato); cortes foram obtidos em ultra-micrótomo LKB Reichert (espessura de 2-2,5 μm). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (H/E) e Mallory-Azán, para análise histológica; ácido periódico/reativo de Schiff (PAS), para polissacarídeos neutros (contra-corado com hematoxilina); xylidine ponceau, pH 2,5 (XP), para proteínas totais; reação de Feulgen, DNA nuclear (contra-corada com fast-green ácido); e impregnação argêntica, para proteínas argirófilas (HOWELL & BLACK, 1980).

As medições foram feitas em fotografias, com régua convencional de desenho. Foi calculada a média aritmética (e desvio padrão) do comprimento e diâmetro de pelo menos vinte células de cada estágio.

3.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Carrapatos adultos machos, alimentados e aptos à cópula (ístar gonandro, pela classificação de FORTES, 1993), e fêmeas também alimentadas e aptas à cópula (partenógenas, segundo FORTES, 1993), foram coletados, diretamente de bovinos naturalmente infestados, em propriedades rurais situadas em Campinas-SP. A coleta e dissecação procederam-se da mesma forma que para microscopia de luz.

O material foi fixado durante duas horas, a 4°C, em glutaraldeído 3% adicionado ou não de ácido pícrico 1%, ou fixador de KARNOVSKY (1965) (glutaraldeído 2,5%-paraformaldeído 4%), em tampão fosfato 0,1 molar, pH 7,2, adicionado de 0,5 molar de sacarose e traços de CaCl_2 . Após fixação, o material foi lavado em tampão fosfato (1 hora), pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, (1 hora) e desidratado em acetona. Os testículos foram pré-embebidos em acetona/epon, 1:1 *overnight* e incluído em Epon 812, polimerizando em estufa a 60°C (GLAUERT, 1975). Espermatecas e ovidutos, destinados à observação de espermatozóides, foram embebidos em acetona/Spurr, 1:1 *overnight* e incluídos em Spurr.

Cortes semifinos e ultrafinos foram obtidos em ultra-micrótomo Ultratome LKB, com navalhas de vidro. Cortes semifinos foram corados com azul de toluidina 1%, em Na_2CO_3 0,5%, para escolha de campo para cortes ultra-finos. Os cortes ultrafinos, de 40 a 60 nm, foram contrastados com acetato de uranila a 2% (WATSON, 1952) e citrato de chumbo a 0,1% (VENABLE & COGGESHALL, 1965), sendo observados em microscópios eletrônicos de transmissão Zeiss EM 900 (ddp 50 KV) e Leo 900 (ddp 80 KV), no centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. As medidas citadas (comprimento de cisternas, núcleos, corpos esféricos, etc) foram tomadas a partir de negativos e ampliações, calculando-se como a média aritmética de, pelo menos, dez amostras.

3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Fêmeas imaginais de *Boophilus microplus*, recém-emergidas (ístar neógina), em início de alimentação (partenóginas) e engorgitadas, prontas para oviposição (teleóginas) foram coletados nas mesmas condições já descritas, sendo removidas a espermateca e ovidutos. As espermatecas de fêmeas engorgitadas foram maceradas e suspensas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. A suspensão, também examinada *in vivo*, em microscópio óptico; foi colocada em lamínulas cobertas com poli-L-lisina (Sigma), sendo a seguir fixadas em glutaraldeído 3% tamponado, por duas horas. Ovidutos de fêmeas plenamente engorgitadas foram fixados por sete dias em glutaraldeído, a 4°C. Ambos os materiais foram pós-fixados em OsO_4 1% *overnight*, e desidratados em etanol,

sendo dessecados em aparelho de ponto crítico Balzers CPD030. Antes de metalizar os ovidutos, foi feita leve pressão com a pinça, no momento da montagem dos ovidutos nos suportes, partindo-os; o objetivo deste procedimento foi revelar espermatozóides no interior do oviduto. Após a montagem, em suportes de latão com fita dupla-face, as lamínulas com suspensão e ovidutos fraturados foram metalizados com ouro em aparelho de "sputtering" Balzers SCD050, por 100", a 40 A. A análise do material foi efetuada em microscópio eletrônico de varredura CSM Zeiss 900. As medidas foram tomadas a partir de negativos e ampliações, calculando-se como a média aritmética de, pelo menos, dez amostras.

4. Resultados:

4.1. Aspectos histológicos e citoquímicos do testículo:

O testículo de *B. microplus* é recoberto por uma camada de células pavimentosas, e tem as células da linhagem gamética internamente organizadas em cistos (**fig. A-03 e A-04**). As células císticas encontram-se associadas à linhagem gamética até o final da fase de polarização das espermatídes. Os cistos têm limites PAS-positivos, definidos pela lâmina basal das células císticas. Nas células císticas, podem ser observadas algumas granulações PAS-positivas (**fig. A-03**). O testículo é percorrido por um ducto interno, a qual continua-se com o ducto eferente. Neste ponto, observa-se a delimitação do ducto por uma população de células somáticas (**fig. A-02**). A seguir, encontram-se os cistos que contêm espermatócitos primários jovens (**fig. A-04 e A-05**). Espermatócitos primários jovens apresentam-se pouco maiores que as gônias secundárias, com maior condensação da cromatina. Essas células medem cerca de $11,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de diâmetro. Pode-se perceber que a região cortical começa a apresentar uma faixa mais intensamente corada que o restante do citoplasma (**fig. A-05, seta**).

Em *B. microplus*, as etapas da espermatogênese ocorrem inteiramente nos testículos. A etapa final da espermiogênese, a eversão da espermatíde, dá-se no trato reprodutor feminino. O desenvolvimento das células gaméticas dá-se em sentido ântero-posterior (**fig. A-01**). As espermatogônias são encontradas na região proximal do testículo. Estas células apresentam-se em duas populações. Uma, de espermatogônias primárias desencistadas, apresenta núcleos de formato irregular, com cromatina mais densa; estas células medem aproximadamente $6,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de diâmetro (**fig. A-02**). Os cistos de espermatogônias secundárias são encontrados um pouco mais distalmente (**fig. A-03**). Estas apresentam limites melhor definidos que as precedentes, devido ao citoplasma levemente mais corado. Seus núcleos, mais arredondados, apresentam cromatina um pouco menos condensada. As gônias secundárias medem cerca de $9,6 \pm 0,06 \mu\text{m}$. O aspecto da cromatina é bem distinto de espermatócitos primários, apesar do tamanho mais ou menos próximo. Nos espermatócitos, os grumos de cromatina encontram-se mais esparsos que nas espermatogônias.

Espermatócitos primários em desenvolvimento diferenciam-se bastante de gônias e de espermatócitos mais jovens pelo tamanho (aproximadamente

21±0,03 µm de diâmetro), pela presença de um ou dois grandes nucléolos e pelo núcleo volumoso, com cromatina descondensada (**fig. A-06, A-07 e A-12**). Os nucléolos demonstram aspecto anular, mais evidente em material impregnado com prata (**fig. A-06**). Estas células permanecem conectadas através de pontes citoplasmáticas (**fig. 07**). A visualização da área correspondente às pontes deve-se ao fato de que, neste tipo de célula, bem como em pró-espermátides e em espermátides polarizadas, pode-se notar, ao microscópio de luz, uma borda mais corada na periferia, de aspecto estriado (**fig. A-07, 08, A-09, A-10 e A-11**). Na área estriada, obteve-se resposta positiva para coloração com prata (**fig. A-06**) e testes citoquímicos para localização de polissacarídeos neutros (**fig. A-07**) e proteínas totais (**fig. A-11**).

Após uma faixa com abundantes figuras de células em divisão (**fig. A-08**), observa-se a região de espermátides jovens ou redondas (**fig. A-09**). Em testículos de carrapatos, não foi possível individualizar os espermatócitos secundários. Espermátides redondas e alongadas, nos diferentes estágios de espermiogênese, são visualizados nos dois quintos distais do testículo de machos gonandros. As espermátides arredondadas são encontradas logo após a zona de divisões; apresentam núcleo central mais compacto que o de espermatócitos em crescimento (**fig. A-09**). Logo a seguir, encontram-se espermátides com núcleo deslocado para o pólo da célula voltado para o interior do cisto; estas espermátides apresentam o bordo estriado PAS-positivo localizado no pólo oposto ao núcleo (**fig. A-10**). Também é visível uma vesícula, próxima ao núcleo, intensamente PAS-positiva (**fig. A-10**). O citoplasma nas espermátides redondas polarizadas apresenta-se bastante granuloso, sendo mais corado na área próxima ao bordo estriado (**fig. A-10 e A-11**).

Mais posteriormente, percebem-se cistos com espermátides, nas quais o bordo estriado do pólo oposto ao núcleo se transforma numa cavidade bem delimitada. Esta cavidade ocupa cerca de dois terços do espaço da célula; o conteúdo manteve a resposta positiva aos testes citoquímicos realizados, em maior ou menor grau (**fig. A-12 e A-13**). Observa-se que o interior da cavidade cistérnica apresenta-se mais ou menos homogêneo, à medida que se alonga (**fig. A-12, A-13 e A-14**).

Uma vez formada a cavidade cistérnica, ela sofre uma invaginação a partir do pólo nuclear. Esta invaginação pode ser acompanhada pela deformação da cavidade, visível aos testes citoquímicos (**fig. A-13, A-14, e A-15**). Durante a invaginação, observa-se que o núcleo é deslocado para a lateral da célula. Primeiramente, observa-se que uma porção em forma de ponta afilada entra pelo espaço entre a cavidade cistérnica e o limite da célula. A seguir, porções cada vez mais volumosas do núcleo são deslocadas, até a total lateralização nuclear (**fig. A-15**). Na região do testículo onde ocorrem estas espermátides alongadas, observa-se uma desagregação dos cistos, liberando-as.

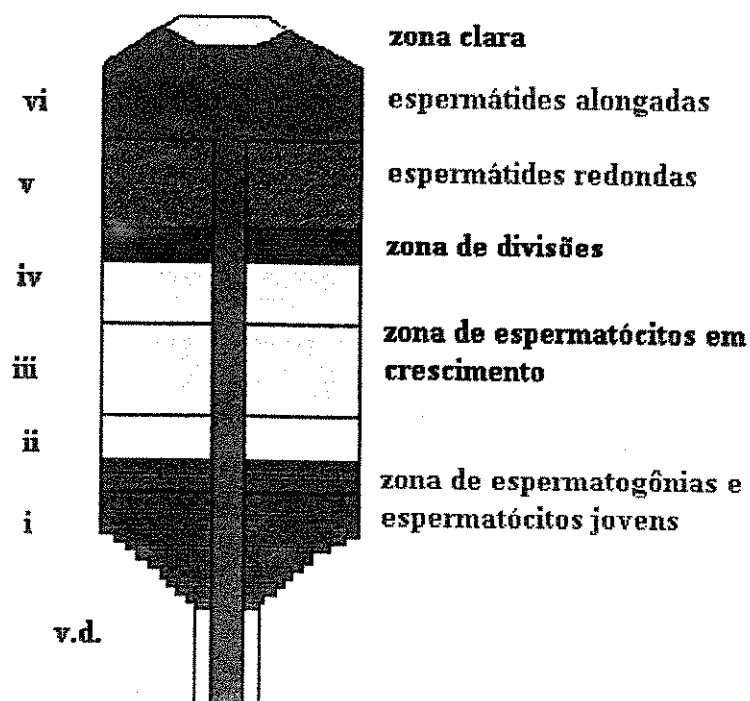
À medida que as espermatídes se alongam, nota-se que seus núcleos tornam-se mais compactos e alongados. Nos núcleos dessas espermatídes, observa-se uma crescente resposta argirófila, a qual é pouco evidente em núcleos de espermatócitos (**fig. A-06, A-09 e A-13**). A cavidade cistérnica alonga-se, à medida que avança a invaginação no sentido oposto ao qual se encontrava o núcleo. O alongamento divide a espermatíde em três sub-regiões. A primeira, bastante estreita, é o tubo externo, a qual é a área para onde o núcleo é deslocado. A segunda região é a própria cavidade cistérnica alongada; seu interior apresenta reação positiva ao PAS e à coloração com prata (**fig. A-13, A-14 e A-15**). A terceira região é o cilindro interno, limitado pela cavidade cistérnica.

Em material submetido à reação do PAS, contra-corado com hematoxilina, observa-se, em cortes transversais, que conforme a altura em que foi cortada, a espermatíde apresenta um aspecto diferente. Assim, cortes com a cavidade cistérnica em halo, ao redor do cilindro interno, nos quais se observa o núcleo, correspondem à área que, na espermatíde polarizada, denominamos como pólo nuclear. Cortes abaixo do ponto de invaginação da cavidade não apresentam sinais do núcleo ou do cilindro interno. Cortes intermediários a estes apresentarão, conforme a distância em relação ao ponto de invaginação, uma ou duas invaginações da cavidade cistérnica para dentro da região do cilindro interno, respectivamente (**fig. A-14 e A-15**). As espermatídes alongadas são células com um comprimento aproximado de $45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (**fig. A-14 e A-15**). Na região posterior do testículo, as espermatídes encaminham-se pela luz, indo à vesícula seminal (**fig. A-16 e A-17**).

A extremidade distal do testículo, ao microscópio estereoscópico, apresenta-se amarelada, afilada. Em cortes, esta região demonstra uma série de figuras de restos celulares, bem como grandes núcleos de células somáticas. Os restos celulares encontrados nessa região possivelmente são derivados do processo de espermiogênese, provavelmente espermatídes defeituosas e células císticas destruídas (**fig. A-18**).

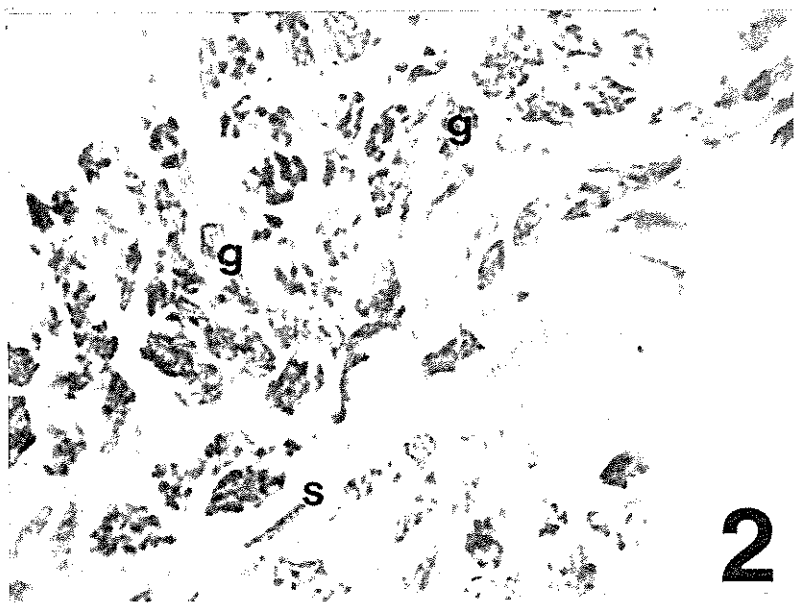
Prancha A-I:

Figura 01: representação esquemática de um testículo de *Boophilus microplus*, mostrando as diferentes populações de células da linhagem gamética. Legenda: **vd:** vaso deferente; **I-VI:** zonas testiculares, arbitrariamente divididas, de acordo com OLIVER & BRINTON, 1972.

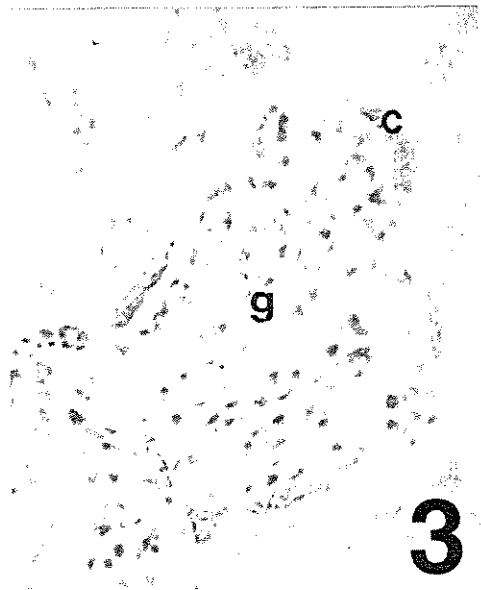


Divisão de Oliver
& Brinton, 1972

Divisão de acordo com os
tipos celulares



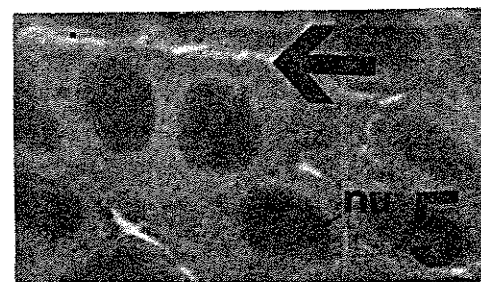
2



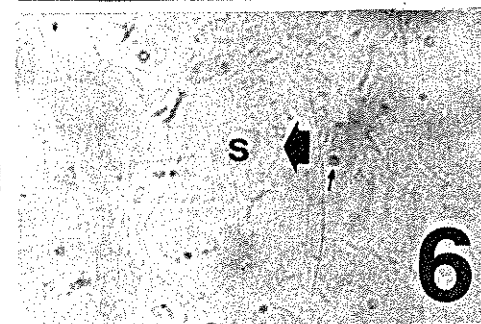
3



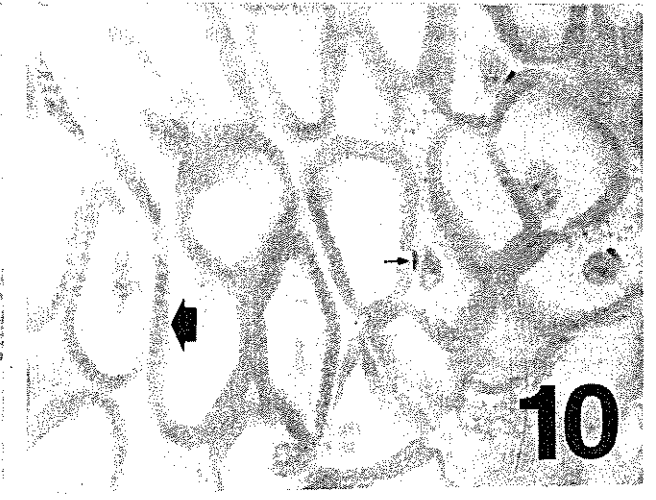
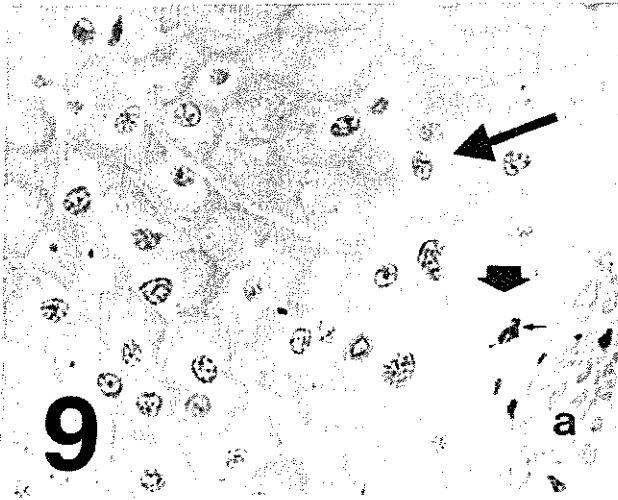
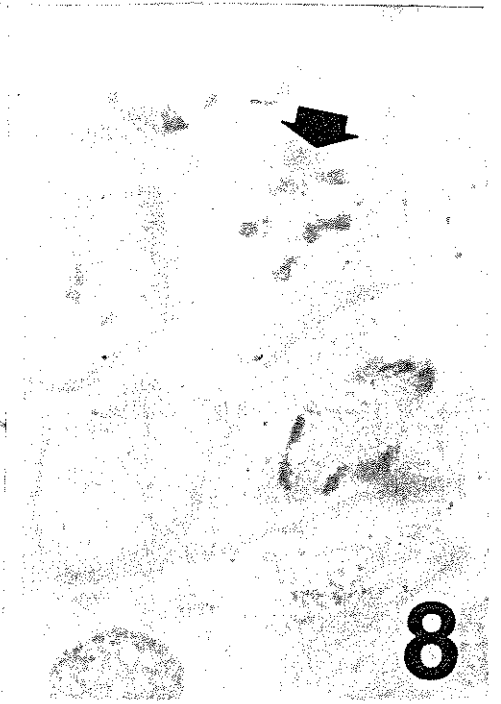
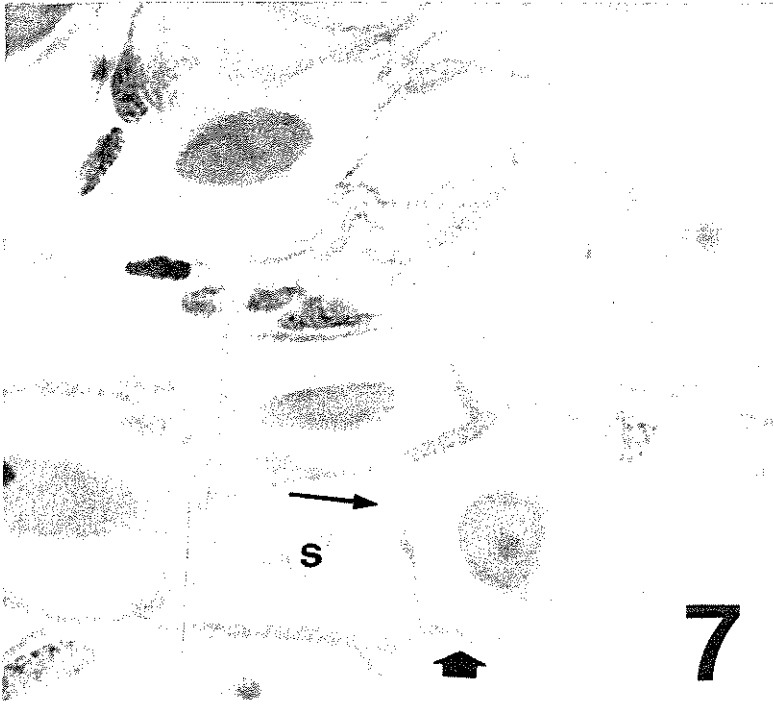
4

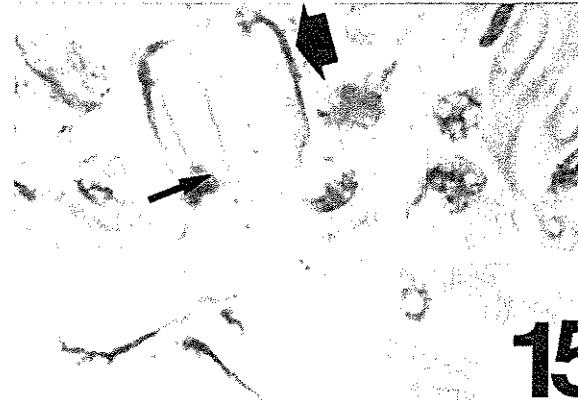
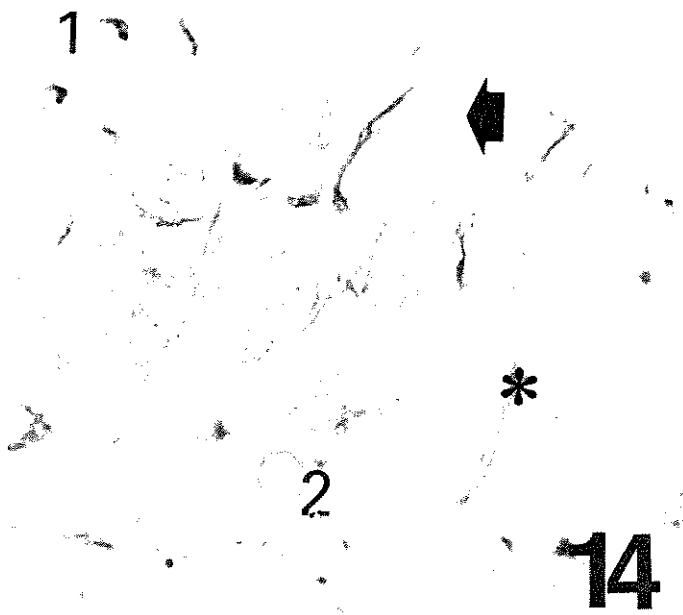
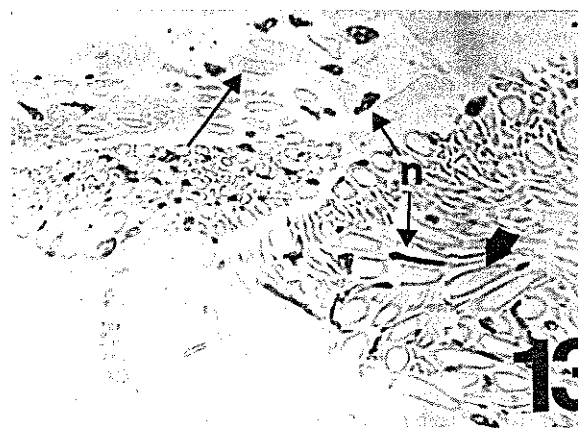
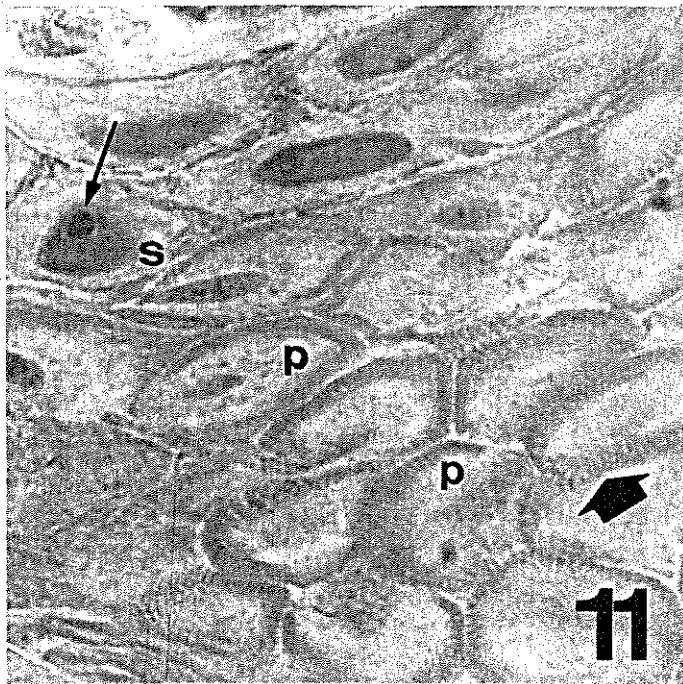


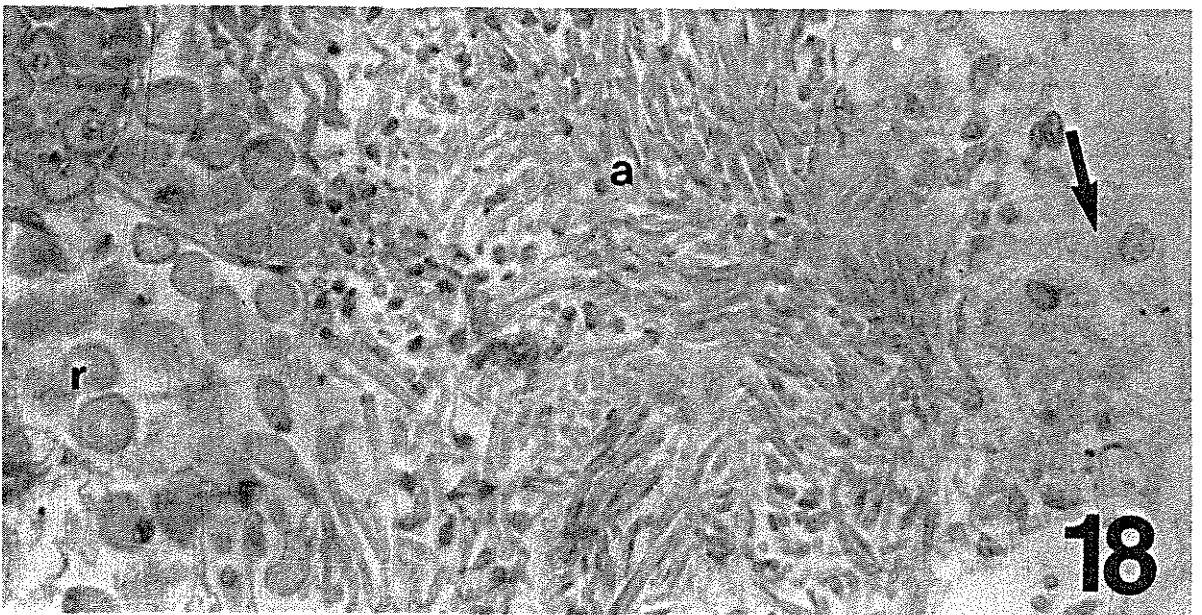
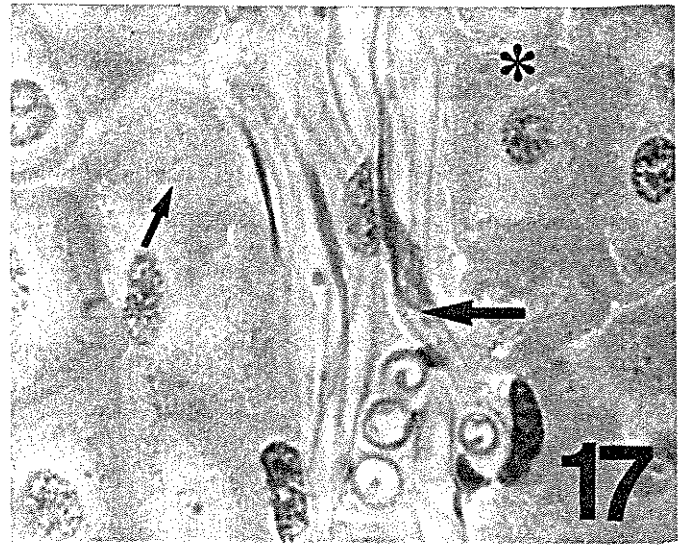
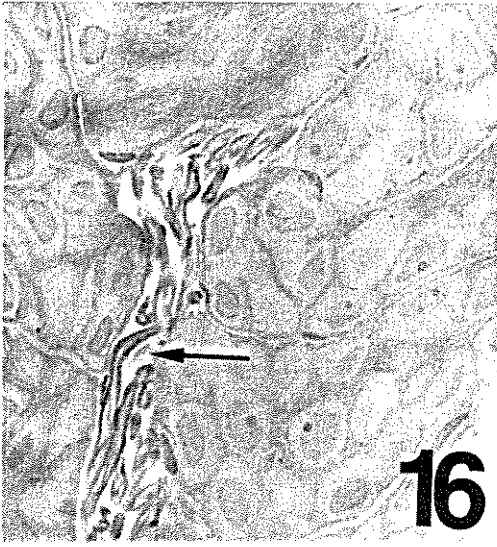
5



6







4.2. Fases iniciais da espermiogênese: ultra-estrutura.

Espermatócitos primários em crescimento medem aproximadamente $21 \pm 0,03$ de diâmetro. São células com núcleo volumoso, de cromatina bastante frouxa. Conforme descrito no capítulo I, observa-se, ao microscópio de luz uma série de pequenas estriações, perpendiculares ao limite da célula, PAS-positivas. Estas estrias, ao microscópio eletrônico de transmissão, revelam-se como cisternas, situando-se logo abaixo da membrana plasmática (**fig. B-01**). As cisternas subsuperficiais são bolsas compostas por membrana dupla, sendo que, na membrana interna, notam-se partículas elétron-densas aderidas na superfície interna (**fig. B-02**). Próximos às cisternas, encontram-se complexos de Golgi e pequenas vesículas secretórias, além de retículo endoplasmático rugoso, polissomos e túbulos de retículo liso, os quais apresentam membranas de aspecto mais elétron-denso que as demais. Estes túbulos de retículo apresentam espessura e densidade eletrônica semelhantes às das cisternas (**fig. B-01 e B-02**).

O núcleo de espermatócitos apresenta envelope com muitos poros dispersos. O interior do núcleo apresenta-se preenchido por uma matriz de aspecto granuloso. Este aspecto da matriz nuclear é mais conspícuo na proximidade do envelope (**fig. B-01 e B-03**). Imersos nessa matriz, no interior do núcleo, encontram-se o nucléolo e corpos esféricos (**fig. B-01 e B-03**). Estes últimos são estruturas esféricas elétron-densas, medindo entre $0,6 \pm 0,01$ e $1,5 \pm 0,02$ μm de diâmetro. Uma observação mais detalhada revela a ausência das subdivisões encontradas em nucléolos (região fibrilar, região granular e região fibrilar densa), embora possam ser visualizadas áreas com diferentes densidades eletrônicas. Em alguns cortes, observa-se que os corpos esféricos apresentam-se na forma de anéis fibrosos. Isso lhes confere aspecto de uma esfera com a região interna de elétron-densidade igual à da matriz nuclear; esta densidade faz com que aparente ser uma esfera vazia (**fig. B-03**).

Os espermatócitos de um mesmo cisto mantêm-se conectados por pontes citoplasmáticas (**fig. B-04**). Pontes citoplasmáticas também são visualizadas em espermatídes na fase de polarização (**fig. B-05**). Entre espermatócitos conectados por pontes citoplasmáticas, nota-se, no ponto de estrangulamento, áreas onde a membrana é reforçada. O aspecto da membrana plasmática, nessas áreas, lembra bastante o de túbulos do retículo liso, comuns em espermatócitos (**fig. B-04**) e espermatídes polarizadas (**fig. B-05**). Nessas regiões, podem ser observadas cisternas sub-superficiais em aparente formação (**fig. B-05**).

Os estágios de espermiogênese são visualizados no terço distal do testículo. Logo que o processo divisional se completa, as espermatídes apresentam-se arredondadas e com núcleo central (**fig. B-06**). Ao microscópio

eletrônico de transmissão, nota-se que o conteúdo das cisternas sub-superficiais apresenta pouca diferença de densidade em relação às de espermatócitos, embora estejam mais alongadas (**fig. B-06 e B-07**). Devido ao seu maior comprimento, as cisternas cortadas obliquamente podem parecer fechadas, dispondo-se em várias camadas (**fig. B-08**). O núcleo das espermátides redondas encontra-se em posição centralizada. Esse núcleo apresenta formato ovóide, com cromatina frouxa. Os corpos esféricos destas células são bastante diferentes daqueles visualizados em espermatócitos. Eles assumem a forma de um agregado de grânulos, unidos por uma matriz elétrondensa, diferindo, portanto, do formato mais esférico dos anteriores (**fig. B-06, inserção**). O citoplasma é particularmente rico em figuras de retículo endoplasmático rugoso, complexos de Golgi e polissomos (**fig. B-06**).

Durante a fase de polarização, observa-se o deslocamento do núcleo para a área das pontes citoplasmáticas (**fig. B-07 e B-09**). Concomitante ao crescimento e deslocamento da faixa de cisternas periféricas para o pólo oposto ao do núcleo. Estas associam-se, formando o que chamamos de agregado primário. O agregado primário, portanto, caracteriza-se pela ausência de contato físico entre as cisternas que encontram-se em arranjo regular, individualizadas. Em cortes tangenciais dessas células, observa-se que as cisternas dispõem-se como um “favo de colméia”, de forma bastante característica.

O envelope nuclear de espermátides polarizadas apresenta contornos irregulares, enquanto se observa uma compactação inicial da cromatina, com aspecto filamentoso (**fig. B-07 e B-09**). Os corpos esféricos nucleares, nesta fase, tornam-se menos conspícuos, embora ainda possam ser visualizados (**fig. B-07**). Nota-se a formação de uma vesícula achatada, nas proximidades do núcleo (**fig. B-07**). Em células na qual a polarização encontra-se mais adiantada, esta vesícula está mais achatada ainda, apresentando densidade eletrônica maior e mais granular em relação à vesícula anteriormente visualizada. Nessas espermátides, esta vesícula apresenta-se como um sulco interno, bem elétrondenso (**fig. B-09**).

À medida que se adianta a fase de polarização, observa-se aumento no tamanho e número das cisternas sub-superficiais. Estas variam de, aproximadamente $2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de perímetro, nos espermatócitos em crescimento, aos $6,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ das espermátides polarizadas. Ocorre a presença de muitas mitocôndrias, que se situam principalmente ao centro da espermátide (**fig. B-07**). Também observam-se corpos multi-vesiculares no citoplasma dessas células (**fig. B-07 e B-09**). O núcleo, nesta etapa, apresenta compactação de cromatina maior, sendo o nucléolo e os corpos esféricos muito pouco evidentes. Durante a polarização, observa-se que espermátides mantêm-se unidas por pontes citoplasmáticas, situadas nos pólos nucleares das células conectadas (**fig. B-09**).

O aspecto das cisternas modifica-se à medida que também ocorre a agregação dessas estruturas; elas agregam-se no pólo oposto ao do núcleo, tornando-se bastante próximas da membrana plasmática da espermatíde (**fig. B-07, B-09 e B-10**). As cisternas situadas próximas à membrana plasmática aglutinam-se, fusionando suas membranas (**fig. B-11**). Esses grupos de cisternas agregam-se em blocos com duas a cinco, formando figuras que denominamos de agregado secundário. Os agregados secundários diferem dos primários, portanto, pela evidenciação de contato físico entre as cisternas (**fig. B-11**).

Por sua vez, os blocos de agregados secundários aglutinam-se. Nessa agregação, observa-se que as membranas internas das cisternas mantêm-se na face interna do compartimento em formação. Este tipo de contato caracteriza-se como agregado terciário (**fig. B-12**). Como na formação dos agregados secundários, a formação dos agregados inicia-se a partir da fusão de grupos de cisternas situados em posição mais distante do núcleo. Na formação dos agregados terciários, observa-se a fusão das membranas externas dos agregados secundários. Com isso, as membranas internas dos agregados em processo de fusão passa a encontrar-se no interior da cavidade cistérnica em formação. A membrana formada pelas membranas externas das cisternas funde-se com a membrana plasmática da espermatíde na região onde iniciou-se a agregação das cisternas (**fig. B-12 e B-14**).

A membrana do agregado terciário começa a delimitar a cavidade cistérnica, caracterizando assim a formação de agregados quaternários (**fig. B-13, B-15, B-17 e B-18**). Logo que define-se o agregado quaternário, observa-se a formação de projeções na membrana da cavidade cistérnica nascente (**fig. B-15 e B-18**). Nessa área da membrana, observa-se a formação de pontos de maior densidade eletrônica, com aspecto filamentosos, dando uma idéia de pontos de ancoragem (**fig. B-13 e B-17**). O citoplasma, nas proximidades dessa área, também apresenta-se filamentosos. Esse material filamentosos também passa a ser visualizado atravessando a membrana do agregado quaternário e das cisternas modificadas, as quais não apresentam mais a membrana dupla (**fig. B-17**).

Durante a formação da cavidade cistérnica, não se observam mais pontes citoplasmáticas entre células do mesmo cisto. Isto é peculiar a esses cistos, onde podemos visualizar tanto espermatídes em que ainda ocorrem agregados primários e secundários, quanto espermatídes com a cavidade cistérnica plenamente formada (**fig. B-16**). É interessante observar que as cisternas que se agregam mais tardiamente apresentam uma pequena invaginação interna, na forma do que denominamos vesícula intra-cistérnica (**fig. B-16**). Esta vesícula apresenta um pedúnculo que a mantém ligada à cisterna (**fig. B-16**).

O citoplasma das espermatídes em formação da cavidade cistérnica apresenta, além de muitas mitocôndrias, corpos multi-vesiculares, polissomos e

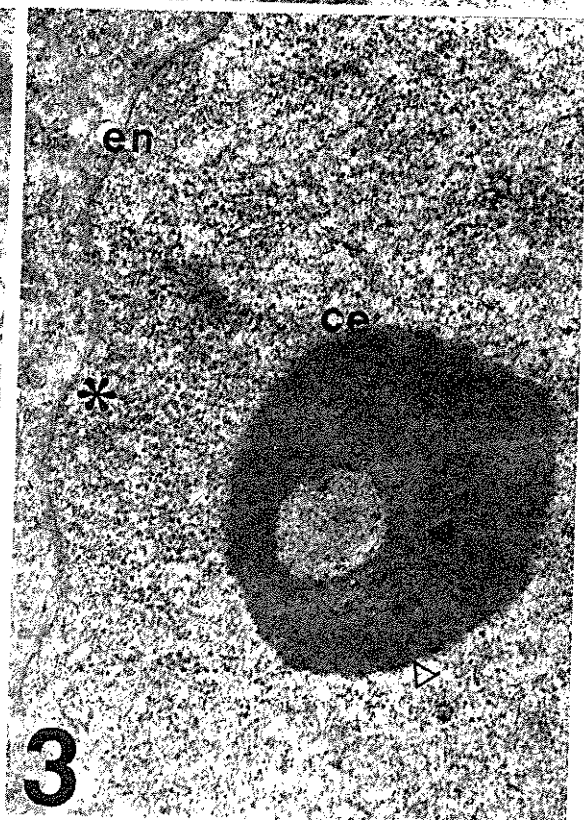
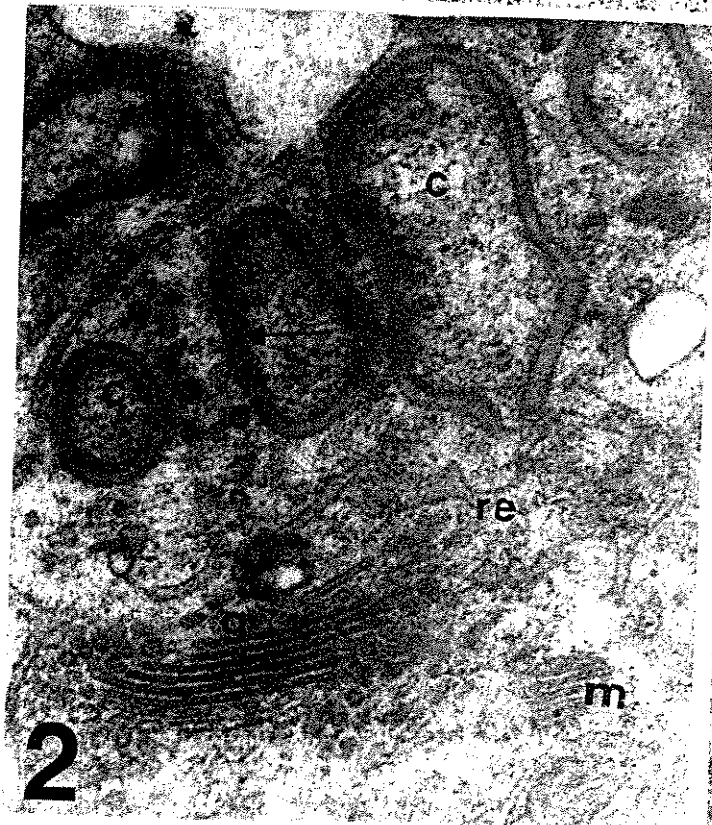
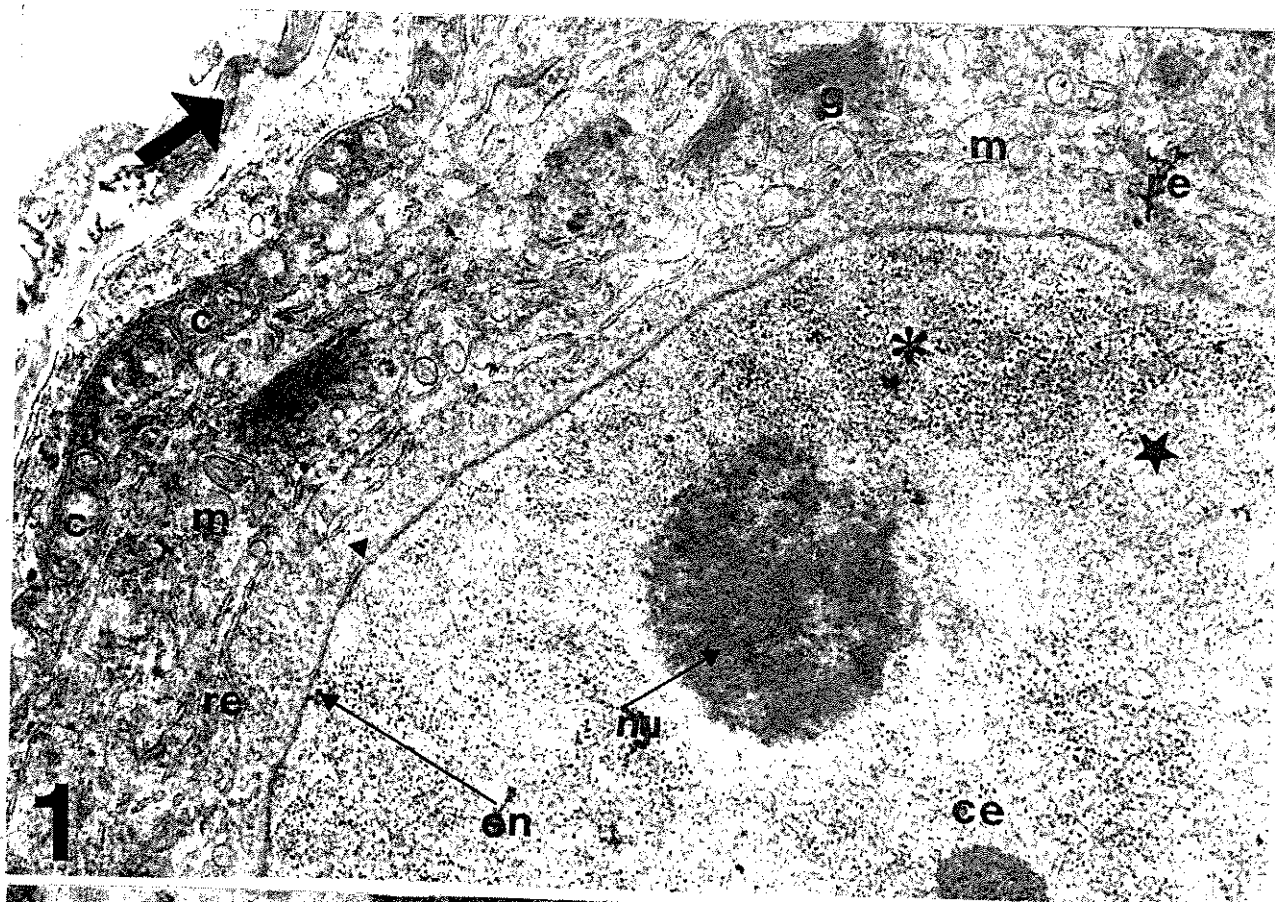
retículo endoplasmático liso (**fig. B-15**). Os corpos multi-vesiculares tem diferença de elétron-densidades em relação aos apresentados por espermátides polarizadas com agregados primários ou secundários, os quais se encontram mais densos (**fig. B-16**). O retículo endoplasmático liso, nas espermátides com cavidade cistérnica em plena formação, apresenta-se bem diferente daquele apresentado por espermatócitos e por espermátides recém-polarizadas. Em espermatócitos, o retículo liso apresenta aspecto regular, mais elétron-denso, com membranas paralelas regulares, de aspecto felpudo (**fig. B-05**). Em espermátides redondas com a cavidade cistérnica bem formada, o retículo liso apresenta um aspecto irregular e pouco denso, sem reforço nas membranas (**fig. B-15**). Na área supra-nuclear, visualizamos a vesícula achatada densa (**fig. B-15 e B-16**). No núcleo dessas espermátides, o envelope apresenta-se bastante irregular; a cromatina adquire aspecto filamentoso, com muitas áreas de condensação (**fig. B-15 e B-16**).

Prancha B-I: Testículo de *B. microplus*, espermátócitos primários. Microscopia eletrônica de transmissão, fixação em Karnovsky, observação a 50 KV.

Figura 01: A figura mostra um espermátócito primário jovem, no qual pode-se perceber as cisternas subsuperficiais (**c**), bastante precoces. O núcleo apresenta envelope (**en**) com poros (**ponta de seta**); pode ser observado o nucléolo (**nu**) e um corpo esférico (**ce**). A matriz nuclear apresenta aspecto bastante granuloso, principalmente nas proximidades do envelope (**asterisco**), diferindo da matriz de outras áreas (**estrela**). Nesta fase da espermiogênese, são bastante visíveis complexos de Golgi (**g**) e figuras de retículo endoplasmático (**re**), além de mitocôndrias (**m**). Nesta micrografia, observa-se também um prolongamento de célula somática testicular (**seta larga**). 17500x.

Figura 02: A micrografia apresenta um detalhe da região sub-plasmalêmica de um espermátócito primário em crescimento; notam-se cisternas subsuperficiais (**c**), mitocôndrias (**m**), complexo de Golgi (**g**) e retículo endoplasmático rugoso (**re**). A face interna das cisternas subsuperficiais apresenta-se granulosa, com partículas elétron-densas aderidas (**seta fina**). 44000x.

Figura 03: Neste detalhe do núcleo de um espermátócito em crescimento bastante adiantado, observa-se o aspecto anelado do corpo esférico em destaque (**ce**). Como pode se notar, a matriz nuclear deste espermátócito apresenta-se bastante granulosa próxima ao envelope nuclear (**asterisco**). Ainda pode-se ver, no corpo esférico, a presença de áreas de menor (**cabeça de seta branca**) ou maior densidade eletrônica (**cabeça de seta**). 22400x.

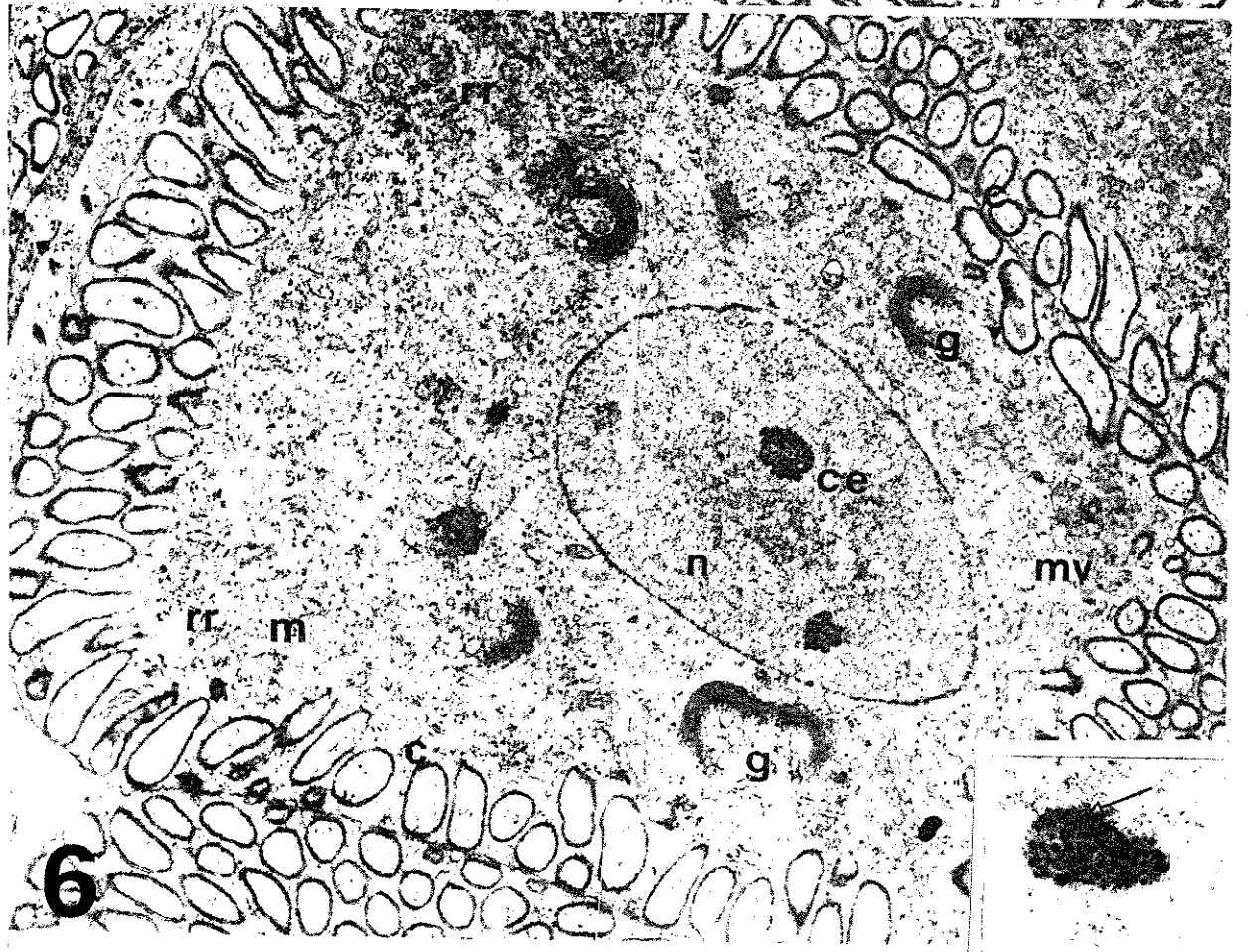
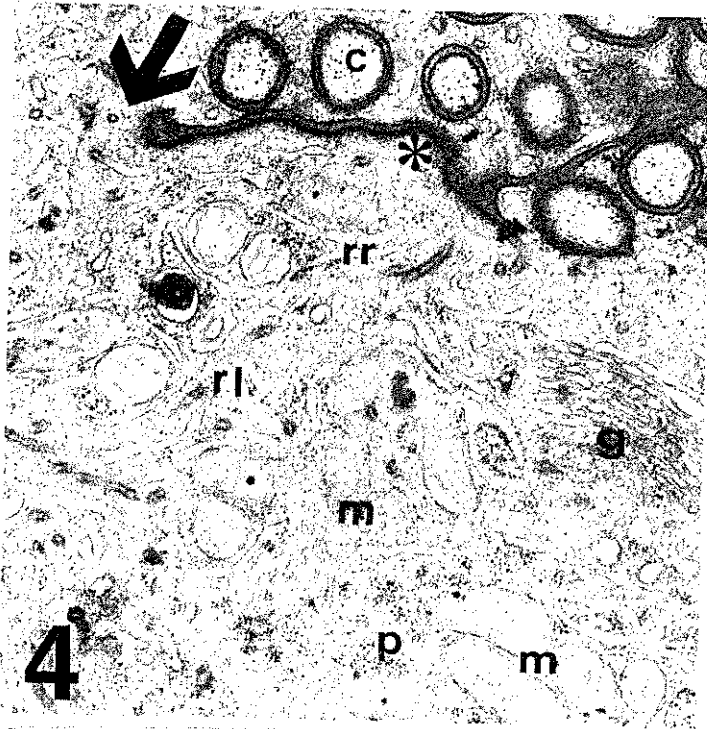


Prancha B-II: Pontes citoplasmáticas e espermátides redondas. Fixação em Karnovsky (04) e glutaraldeído-ácido pícrico (05-06).

Figura 04: Detalhe da região de ponte citoplasmática que está conectando espermátócitos em crescimento (seta). São abundantes as figuras de retículo endoplasmático liso, com membranas com aspecto bastante elétron-denso (rl). Nessa área, a membrana plasmática dos espermátócitos apresenta-se bastante elétron-densa (**asterisco**), assemelhando-se à das cisternas (c). Mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (rr), complexo de Golgi (g) e polissomos (p). 12600x.

Figura 05: A micrografia apresenta uma ponte citoplasmática entre espermátides polarizadas. Nota-se a membrana plasmática espessada na área da ponte (**asterisco**). Podem ser observadas reentrâncias da membrana na área da ponte, sugerindo a formação de cisternas (**seta larga**). Podemos notar também a presença de túbulos de retículo liso (rl) e complexo de Golgi (g), além de cisternas subsuperficiais. 28000x.

Figura 06: Nesta espermátide redonda, com núcleo ainda centralizado, pode-se perceber que as cisternas subsuperficiais (c) apresentam-se mais alongadas que as apresentadas por espermátócitos nas figuras anteriores. O citoplasma apresenta um grande número de estruturas, como complexos de Golgi (g), retículo endoplasmático rugoso (rr), mitocôndrias (m), além de corpos multi-vesiculares (mv). No núcleo, os corpos esféricos (ce) apresentam o aspecto de agregados de granulações elétron-densas. A matriz nuclear apresenta-se com aspecto granuloso. 10560x. Na inserção, observa-se um detalhe do corpo esférico de uma espermátide redonda, com aspecto bastante granuloso. Nota-se que as granulações deste corpo esférico apresentam-se unidas por matriz, de aspecto um pouco menos elétron-denso (**seta**). 24500x.

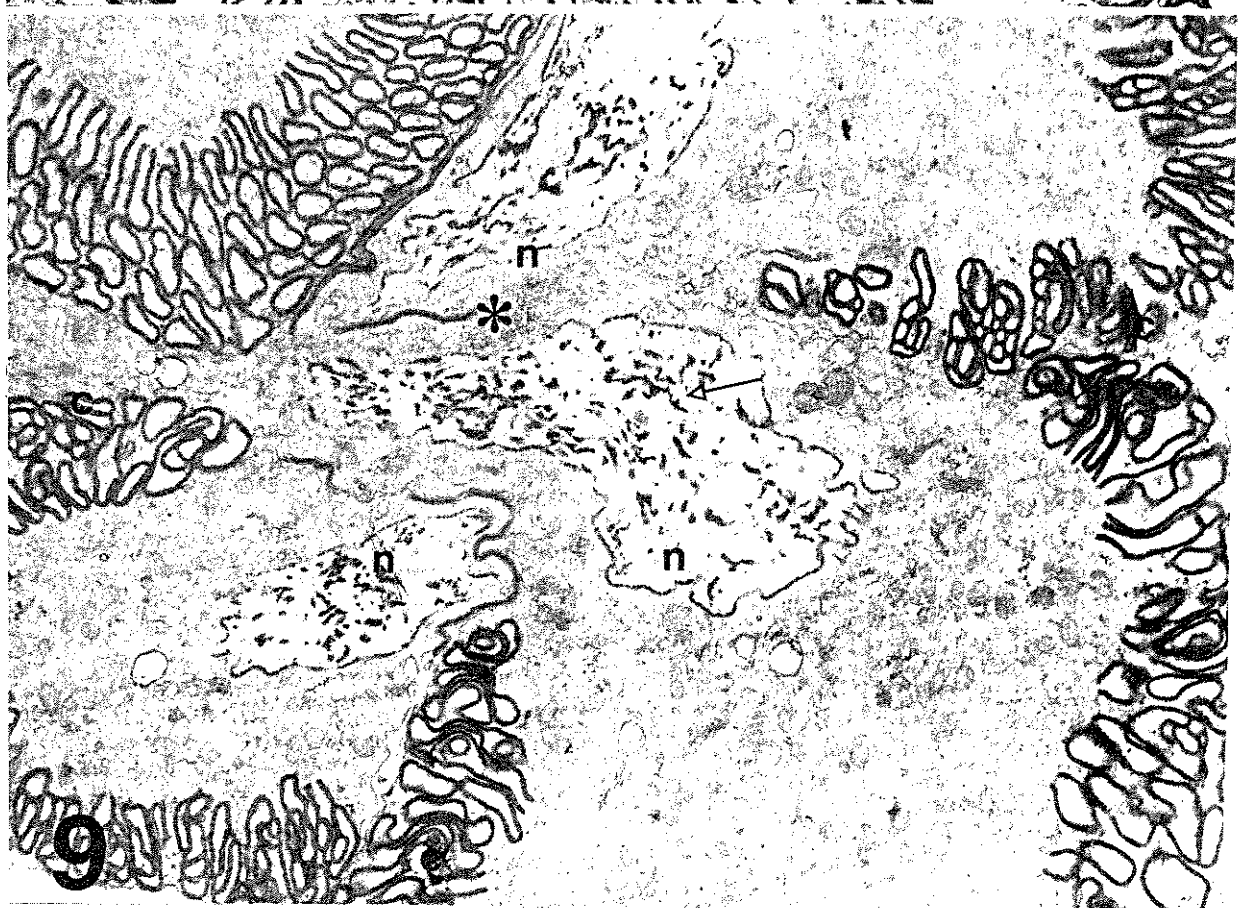
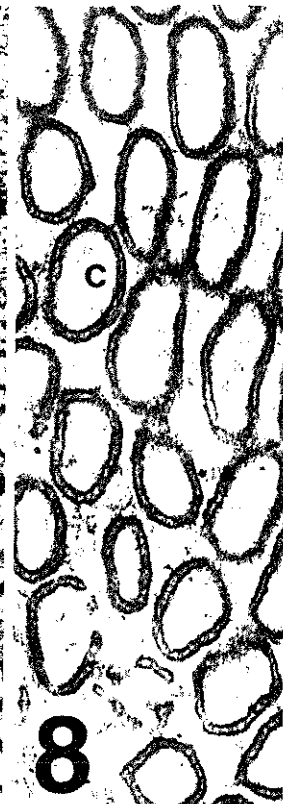
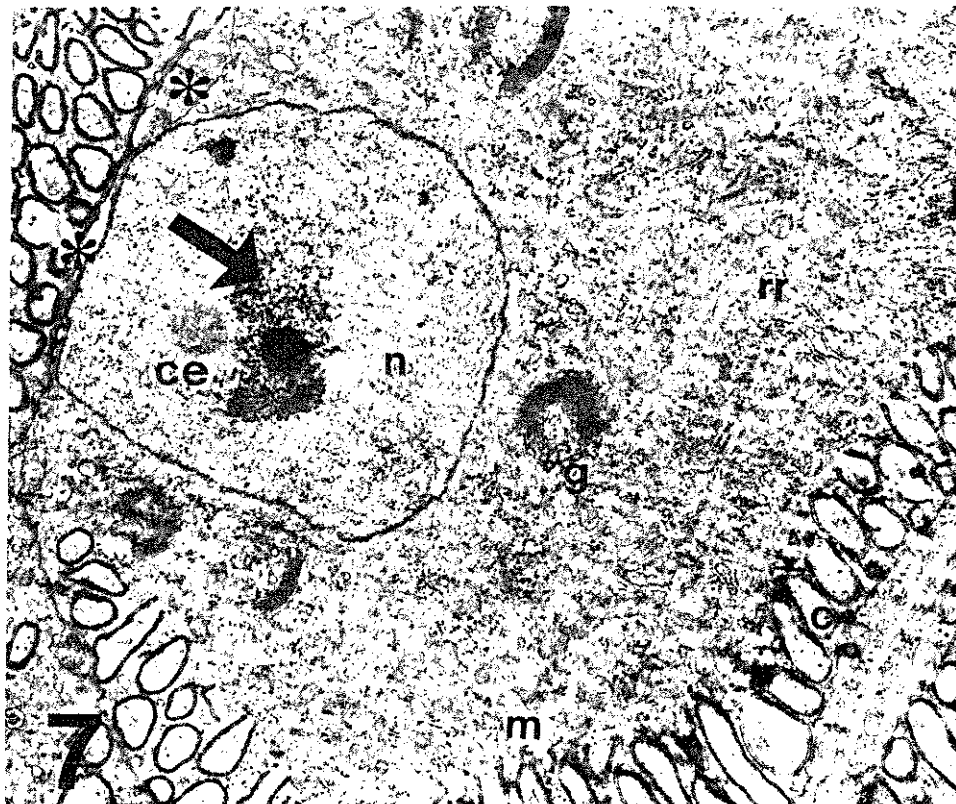


Prancha B-III: Espermátides polarizadas; fixação em glutaraldeído-ácido pícrico.

Figura 07: Nessa espermátide polarizada, o núcleo ainda apresenta traços da presença do corpo esférico (**ce**), que vai descaracterizando à medida que a cromatina compacta-se (**seta larga**). No citoplasma, observa-se complexos de Golgi (**g**), retículo rugoso (**rr**) e mitocôndrias (**m**), além de uma vesícula supra-nuclear, achatada, com conteúdo granuloso (**asterisco**). As cisternas subsuperficiais (**c**) encontram-se no pólo oposto ao que está o núcleo. 8800x.

Figura 08: Este corte tangencial em espermátide polarizada permite visualizar a organização das cisternas subsuperficiais (**c**), dispondo-se em forma semelhante a favos de colméia. 15400x.

Figura 09: Espermátides polarizadas, em um mesmo cisto. Essas espermátides mantêm-se unidas através de pontes citoplasmáticas. O núcleo (**n**) apresenta a cromatina em compactação, formando agregados filamentosos bastante elétron-densos (**seta fina**). As cisternas subsuperficiais ocupam posição oposta ao dos núcleos (**c**), os quais situam-se próximos ao ponto onde permanecem as pontes. Chama a atenção a presença de uma vesícula achatada, de interior elétron-denso, nas proximidades do núcleo (**asterisco**). 9000x.



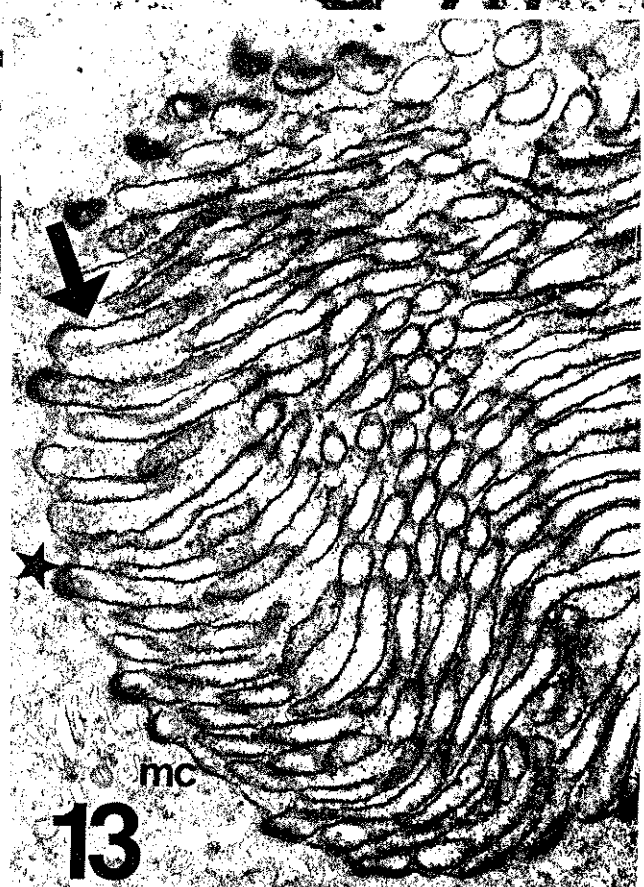
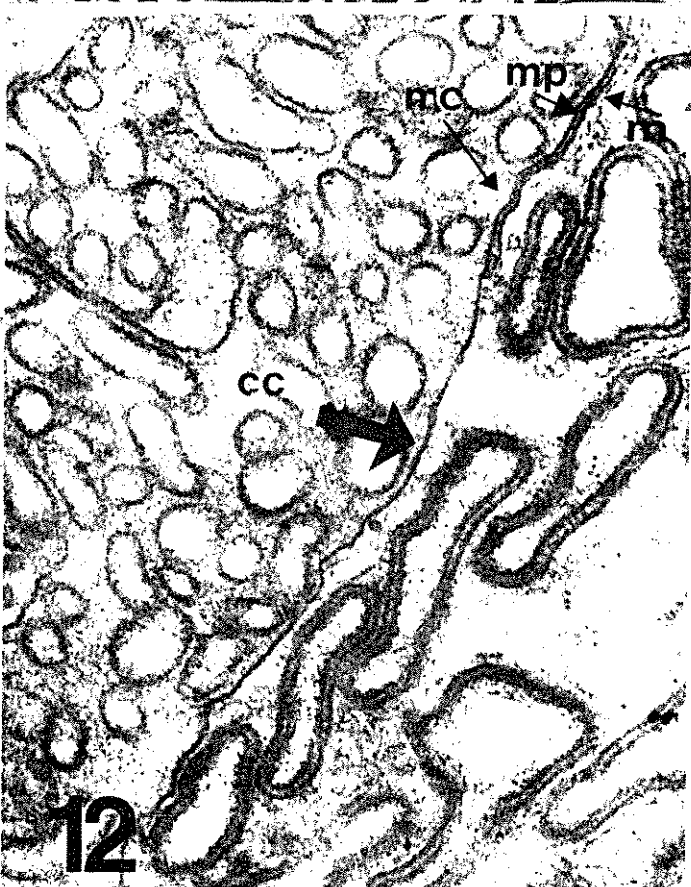
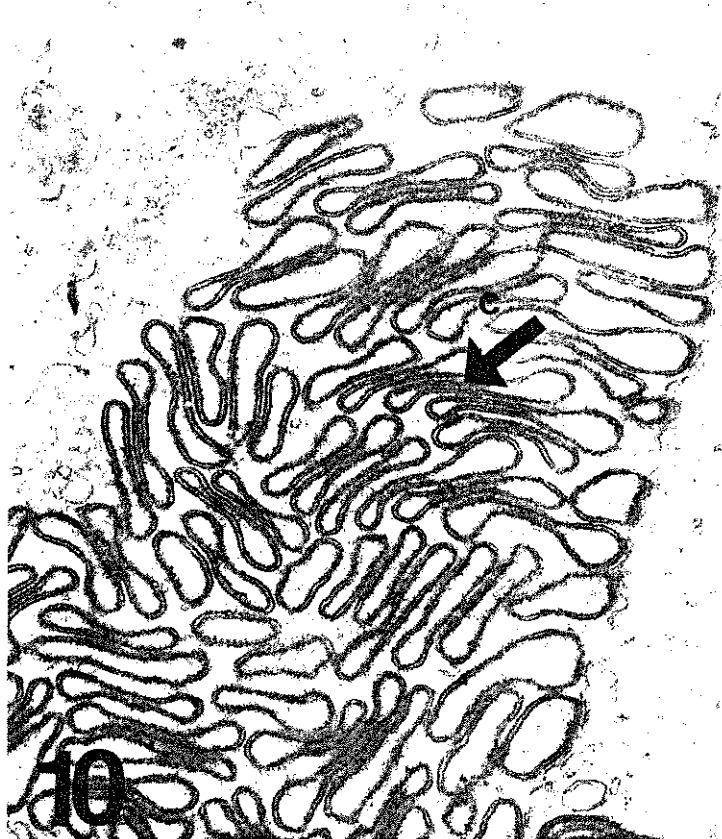
Prancha B-IV: Formação dos agregados de cisternas, em diferentes etapas. Fixação em Karnovsky.

Figura 10: Após a polarização, as cisternas subsuperficiais (**c**) deslocam-se para o pólo oposto ao do núcleo. Na região mais próxima à membrana plasmática, observa-se uma maior agregação das cisternas, as quais ficam mais próximas umas das outras, formando o agregado primário (**seta larga**). 18200x.

Figura 11: As cisternas agregadas passam a fundir-se, originando agregados secundários (**seta larga**). Nesses agregados, que se formam próximos à membrana plasmática, podemos observar os pontos de fusão das membranas das cisternas (**seta fina**). 35700x.

Figura 12: Em agregados terciários, é evidente a delimitação da cavidade cistérnica (**cc**). Os agregados mais periféricos aparentam associar com a membrana plasmática. Pode-se observar a membrana da cavidade cistérnica (**mc**), a membrana da espermátide polarizada (**mp**) e a membrana plasmática de uma espermátide vizinha (**m**). Nota-se que, em um determinado ponto, a membrana plasmática da espermátide e a membrana das cisternas agregadas parecem fundir-se, originando uma membrana única (**seta larga**). 38400x.

Figura 13: A figura mostra um agregado quaternário em início de formação. Ainda podemos individualizar, em parte, algumas cisternas (**seta larga**), sendo bastante conspícua a membrana da cavidade cistérnica recém-formada (**mc**). Na base das cisternas, observa-se a formação de um espessamento, de aspecto filamentoso (**asterisco**). 15400x.



Prancha B-V: Espermátides em processo de formação de cavidade cistérnica. Observação em 80 KV (14) e 50 KV (15). Fixação em Karnovsky (14) e glutaraldeído-ácido pícrico (15).

Figura 14: A figura mostra uma visão geral de uma espermátide com agregado terciário (**seta larga**). Observam-se, no citoplasma, mitocôndrias (**m**), figuras de retículo endoplasmático liso (**rl**), além de corpos multi-vesiculares (**mv**). É interessante notar que, associadas a esta espermátide, em grau adiantado de diferenciação, encontram-se espermátides bem mais precoces, nas quais não observamos sequer agregados secundários (**asterisco**). 13900x.

Figura 15: Nesta espermátide, além do agregado quaternário de cisternas (ou seja, a cavidade cistérnica está bem definida), nota-se a presença da vesícula achatada elétron-densa, em posição supra-nuclear (**asterisco**). Observam-se também corpos multi-vesiculares (**mv**), polissomos (**p**) e mitocôndrias (**m**), além de agregados secundários de cisternas subsuperficiais (**c**), na célula vizinha. O núcleo da espermátide apresenta-se com cromatina em compactação, formando filamentos grosseiros (**seta larga**). Não há mais traços do nucléolo ou do corpo esférico no núcleo. 16500x.

Prancha B-VI: Espermátides em processo de formação de cavidade cistérnica. Observação em 50 KV. Fixação em glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio.

Figura 16: É interessante observar que estas espermátides, em um mesmo cisto, encontram-se em estágios de diferenciação bastante diversos, com diferentes graus de agregação de cisternas. Nessa espermátide iniciando agregação secundária (1), pode-se observar a vesícula achatada supra-nuclear (v). Em espermátides com a formação de agregados secundários adiantados (2), podem ser observadas cisternas com a formação de vesículas cistérnicas (**seta larga**), bem como um corpo multi-vesicular (mv). Além dessas espermátides, a micrografia apresenta uma na qual a cavidade cistérnica acha-se bastante adiantada, caracterizando um agregado quaternário (3). 3900x.

Figura 17: A figura mostra um detalhe de uma espermátide com a cavidade cistérnica plenamente formada. Na membrana da cavidade, observa-se um espessamento, de aspecto filamentososo (**asterisco**). O citoplasma apresenta polissomos (p), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático liso (rl), além de corpos multi-vesiculares (mv). 27600x.

Figura 18: Esta espermátide com a cavidade cistérnica plenamente formada (cc) permite observar a ausência de projeções e espessamentos filamentosos (**asterisco**) na área em que não houve contato com o citoplasma (**seta larga**). As projeções internas da cavidade situam-se no ponto onde ocorre contato com o citoplasma. A matriz da cavidade apresenta aspecto homogêneo na região onde não ocorrem projeções (**estrela**). 4200x.

4.3. Fases finais da espermiogênese: ultra-estrutura.

As espermátides em alongamento localizam-se no quinto final testículo de *B. microplus*. O alongamento inicia-se logo após a formação da cavidade cistérnica (**fig. C-01**). A parte interna da cavidade apresenta-se com conteúdo floculento, de aspecto irregular (**fig. C-02**). Nota-se que as projeções internas da cavidade ainda encontram-se com o formato de dedo de luva, mais ou menos similar ao que apresentavam na fase anterior (ou seja, na formação da cavidade). Essas projeções apresentam conteúdo fibroso, bastante denso (**fig. 03**). As projeções situadas no pólo nuclear da cavidade encontram-se mais próximas, mantendo ainda um arranjo tipo "favo de colméia" (**fig. C-02, C-03 e C-08**). Neste ponto, pode ser observado o início da invaginação da cavidade, processo que ocorre concomitante com o alongamento da espermátide (**fig. 03**).

Após o início da invaginação da cavidade, nota-se uma alteração na elétrondensidade do interior da cavidade cistérnica, o qual torna-se mais homogêneo (**fig. C-04**). As projeções internas da cavidade adquirem aspecto mais bem definido. Forma-se, na área onde observamos uma agregação de material elétron-denso, um eixo de densidade eletrônica similar, no centro da projeção (**fig. C-04**). Na base das projeções, observa-se a presença de material fibroso, que parece estar ligando umas projeções às outras. As projeções, nesta fase, apresentam prolongamentos de membrana que dirigem-se para o interior da cavidade (**fig. C-04**).

Em espermátides com as projeções bem formadas (**fig. C-05**), observamos que se inicia a invaginação da cavidade cistérnica e o alongamento da célula (**fig. C-05, C-06 e C-07**). Podemos observar, em cortes transversais e tangenciais de espermátides alongadas, que elas são divididas em três regiões cilíndricas e concêntricas (**fig. C-06**). A primeira região é o tubo externo, para onde migra o núcleo. A terceira é o cilindro interno, o qual é formado a partir da invaginação da segunda região, a cavidade cistérnica.

Em cortes transversais, conforme o ponto onde cortamos, podemos ver imagens de espermátides cortadas mais distantemente, ou mais próximas do ponto de formação do cilindro interno (**fig. C-06 e C-09**). Para diferenciar, observa-se o aspecto do núcleo e da cavidade cistérnica. O núcleo, no pólo da célula em que se encontra nas espermátides redondas, apresenta um envelope de aspecto bastante irregular (**fig. C-08**). Cortes feitos no pólo de invaginação no ponto em que se encontra o núcleo, revelam que este apresenta cromatina mais densa, de aspecto mais condensado, além de um envelope mais complexo (**fig. C-12 e C-14**). Na região central do núcleo, observa-se uma porção espiralizada, formando um tipo de eixo interno (**fig. C-09, C-11 e C-14**).

A cavidade cistérnica expande-se em dobras da membrana delimitante interna (**fig. C-06, C-09 e C-10**). Conforme essas dobras, podemos avaliar, em um corte, em que ponto da espermatíde incidiu a navalha. Cortes mais distais ao pólo nuclear apresentam duas dobras da membrana da cavidade. Mais próximo ao pólo nuclear, observamos a presença de uma ou nenhuma dobra na membrana da cavidade cistérnica. A ausência do cilindro interno também é indicativo de que o corte incidiu anteriormente ao ponto em que a cavidade está invaginando (**fig. C-05, C-06, C-07 e C-09**).

Em cortes transversais de espermatídes alongadas, notamos que o citoplasma regionalizado, sendo conspícuas duas áreas (**fig. C-10**). Uma é aquela mais próxima à membrana da cavidade cistérnica e à membrana da espermatíde, contendo filamentos bastante delgados. A outra regionalização do citoplasma é definida pela presença de filamentos tipo intermediário, presentes no cilindro interno e no tubo externo. Entre esses filamentos tipo intermediário, observa-se a presença de muitas mitocôndrias (**fig. C-10**).

Abaixo da membrana plasmática, pode-se observar a presença de uma vesícula tipo cisterna, bastante achatada e densa. Esta cisterna inicialmente aparece forrando a membrana do pólo nuclear da célula (**fig. C-11**). Em espermatídes em que o alongamento encontre-se mais adiantado, esta cisterna recobrirá uma maior área da membrana, terminando por colocar-se sob toda a membrana plasmática da célula (**fig. C-14 e C-15**).

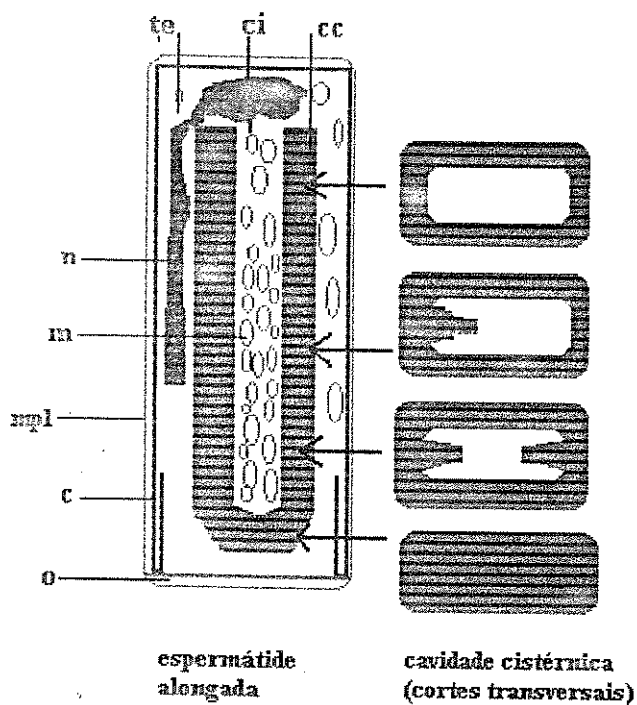
As projeções da membrana da cavidade cistérnica são estruturas bastante complexas (**fig. C-12 e C-13**). Podem ser observadas três regiões distintas, nessas estruturas. A primeira apresenta-se em forma de bolha, correspondendo à porção de membrana mais interna. Ao centro da projeção, observa-se um eixo fibroso central, que se constitui no corpo da projeção. Na base da projeção, observa-se um ponto da membrana desta em que verifica-se um espessamento. Este espessamento constitui-se na base da projeção. O citoplasma na área adjacente à membrana da cavidade cistérnica apresenta-se bastante filamentososo (**fig. C-12 e C-13**).

Em espermatídes plenamente alongadas, observa-se que o núcleo encontra-se totalmente lateralizado. Na extremidade oposta àquela que se encontrava o núcleo, observa-se a presença de uma estrutura, o opérculo (**fig. C-15**). Logo abaixo desta estrutura, verifica-se a presença de uma área amorfa, bastante densa, situada entre o opérculo e a membrana da cavidade cistérnica (**fig. C-15**). Na região de invaginação da espermatíde, observa-se que a extremidade do cilindro apresenta projeções conspícuamente diferentes daquelas apresentadas no restante da membrana da cavidade cistérnica (**fig. C-15**). Nessa porção, observamos a presença de filamentos espessos, tipo intermediários, no citoplasma logo abaixo das projeções. Um pouco abaixo, notam-se muitas mitocôndrias (**fig. C-15**). Paralelo à extremidade do cilindro interno, verificamos que a cisterna que acompanha a membrana plasmática

sofre uma dobra, no ponto de contato entre o opérculo e o restante da membrana da espermatíde (**fig. C-15**).

Prancha C-I:

Figura 01: representação esquemática de espermátide alongada, em corte longitudinal. Os cortes transversais representados ao lado mostram o aspecto da cavidade cistérnica da espermátide nas diferentes seções. N: núcleo; te: tubo externo; cc: cavidade cistérnica; ci: cilindro interno; m: mitocôndrias; mpl: membrana plasmática; o: opérculo; c: cisterna periférica.



Prancha C-II: Espermátides em início de alongamento; fixação em glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio.

Figura 02: A cavidade cistérnica desta espermátide encontra-se plenamente formada (**cc**). Na região do pólo nuclear, há uma maior agregação de projeções na forma de favo de colméia (**seta larga**). As projeções estão com aspecto de dedo de luva, sendo envolvidas por material fibroso, bastante denso (**seta fina**). Podemos notar que a matriz da cavidade apresenta aspecto floculento, bastante heterogêneo, principalmente no pólo oposto ao núcleo (**asterisco**). 13300x.

Figura 03: No início da invaginação da cavidade cistérnica (**seta larga**), ocorre uma agregação de cisternas, semelhantemente ao demonstrado na figura anterior, com suas projeções (**p**) para o interior da cavidade. Ainda podemos observar mitocôndrias (**m**) e projeções paralelas aderidas à membrana da cavidade (**seta fina**). 20300x.

Figura 04: Nessa espermátide, podemos verificar que as projeções internas da membrana da cavidade cistérnica encontram-se mais bem definidas (**pi**). As projeções apresentam uma expansão que dirige-se na direção do centro da cavidade (**seta larga**). A matriz da cavidade tem aspecto mais uniforme, um pouco mais elétron-denso que na figura anterior (**asterisco**). No citoplasma da espermátide, podem ser observadas algumas mitocôndrias (**m**). 38410x.

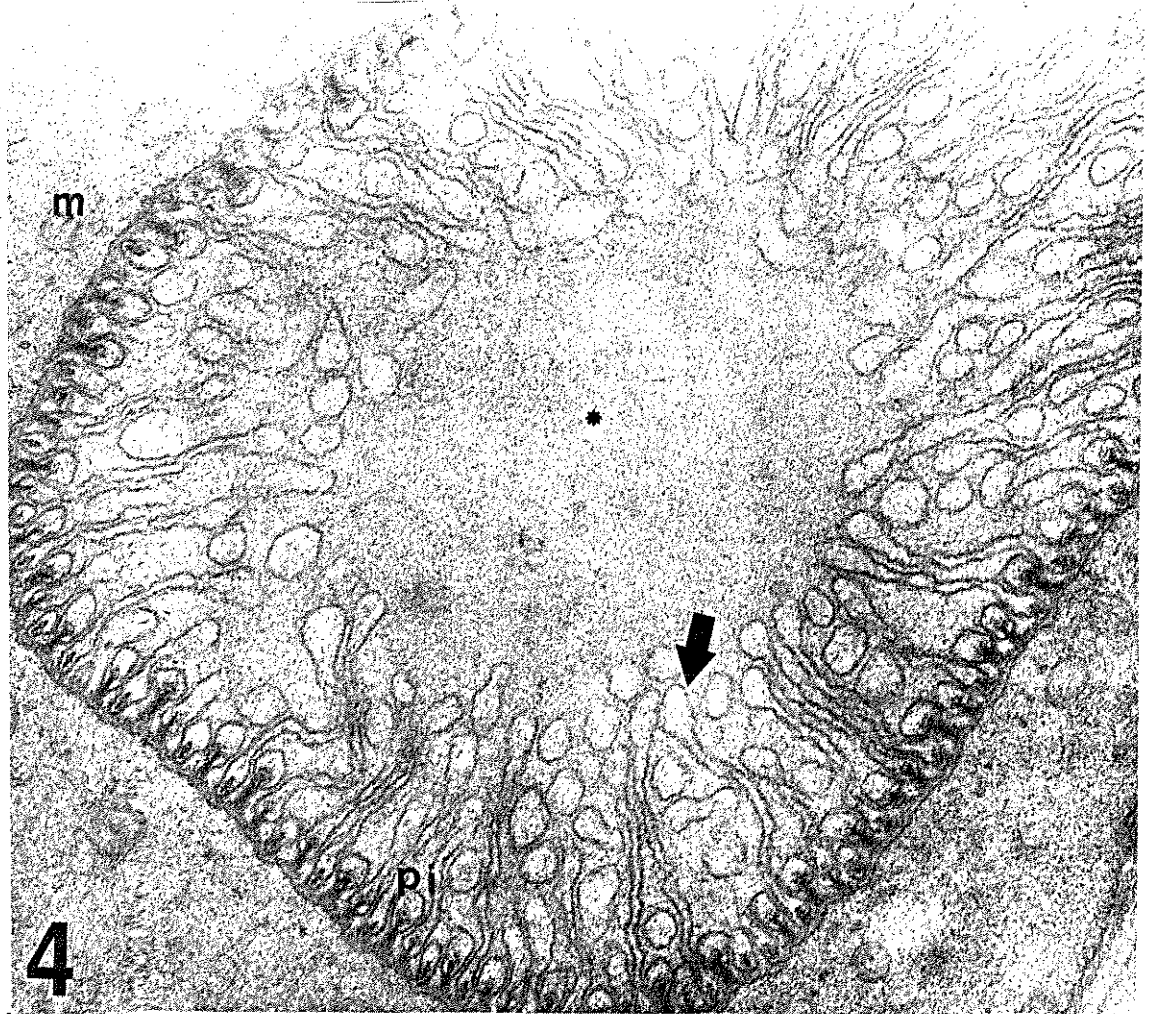
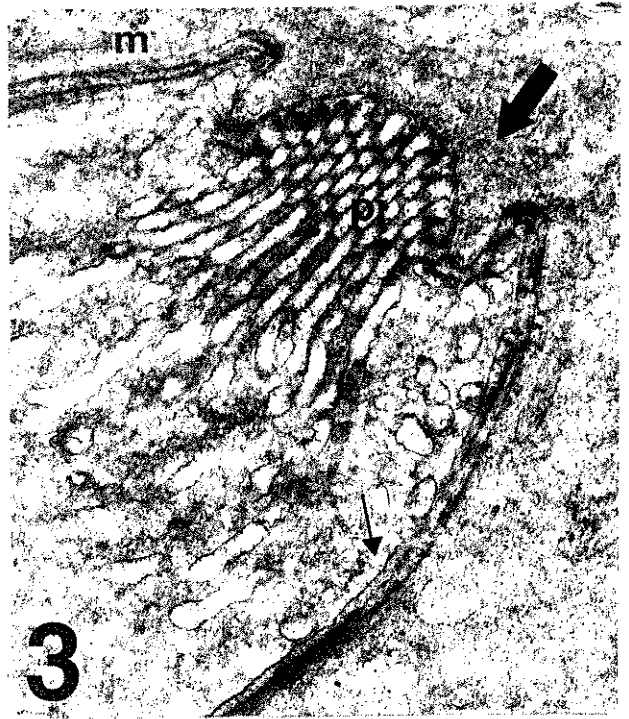
Prancha C-III. Espermátides em processo de alongamento, aspectos iniciais, fixação em glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio:

Figura 05: Neste corte, pode-se observar que as projeções da face interna da cavidade encontram-se plenamente formadas, não sendo visualizadas as grandes dobras de membrana encontradas na figura anterior (**seta larga**). Na matriz da cavidade, observam-se cortes transversais de expansões de projeções situadas em outro plano da cavidade (**seta fina**). 24600x.

Figura 06: Podemos observar aqui algumas espermátides em cortes transversais e tangenciais. Nessas espermátides alongadas, podemos notar que elas são divididas em três regiões. A primeira é o tubo externo (**te**), para onde migra o núcleo (**n**). O cilindro interno (**ci**), o qual é formado a partir da invaginação da terceira região, a cavidade cistérnica (**cc**). Conforme o ponto em que foi cortado, podemos ver imagens de espermátides seccionadas mais distantemente (**1**), ou mais próximas do ponto de formação do cilindro interno (**2**). Em células cortadas mais medianamente, o núcleo apresenta aspecto mais cilíndrico (**n/ seta fina**), enquanto que em secções mais próximas ao pólo nuclear o núcleo apresenta-se mais irregular (**n/ seta larga**). Nesta figura, além das espermátides, podemos observar o núcleo de uma célula cística (**asterisco**). 6900x.

Figura 07: Na micrografia, a navalha incidiu logo abaixo do ponto de invaginação da cavidade cistérnica, permitindo observar o arranjo hexagonal das projeções situadas neste ponto (**asterisco**). 18200x.

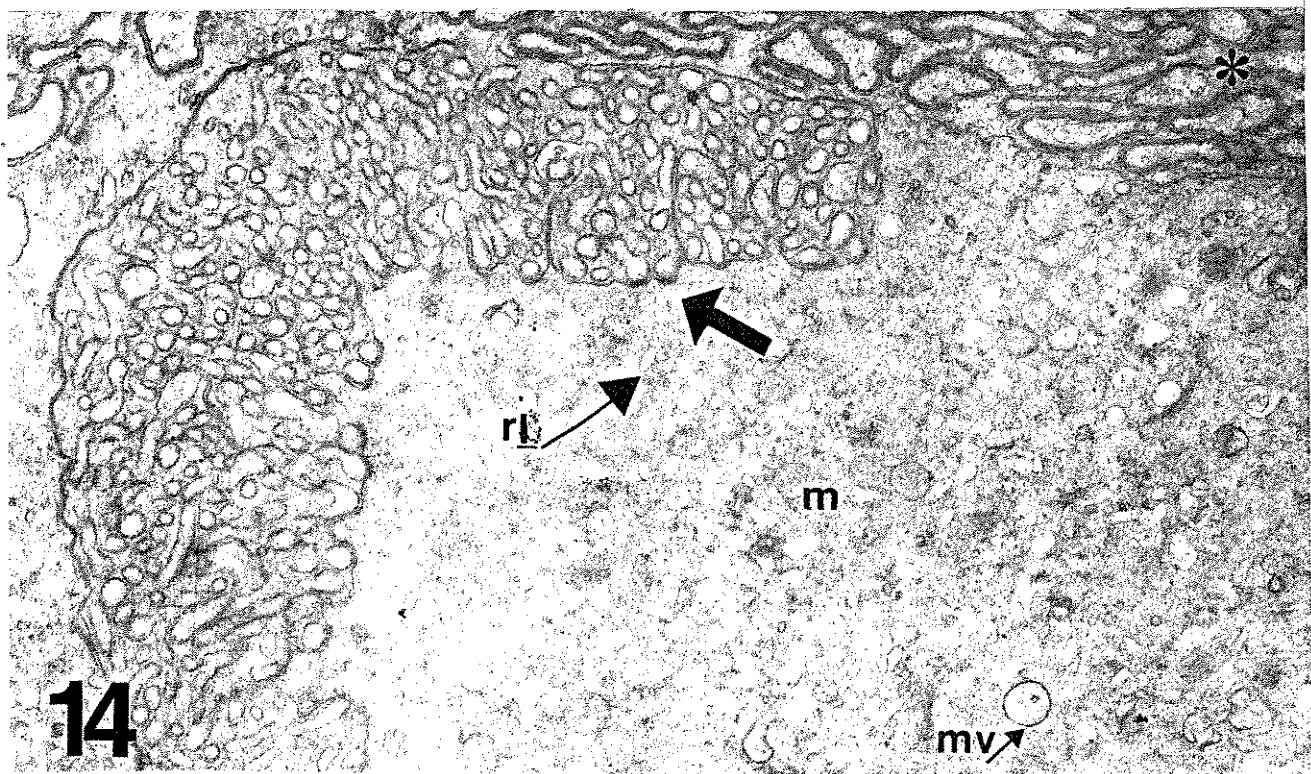
Figura 08: Esta micrografia apresenta um corte feito acima do pólo nuclear de uma espermátide em que o núcleo iniciou o processo de deslizamento para o tubo externo. Nota-se que a porção maior do núcleo, ainda polarizado, apresenta o envelope mais irregular (**seta larga**) que o lobo que iniciou a relocação no tubo externo (**seta fina**). 13300x.

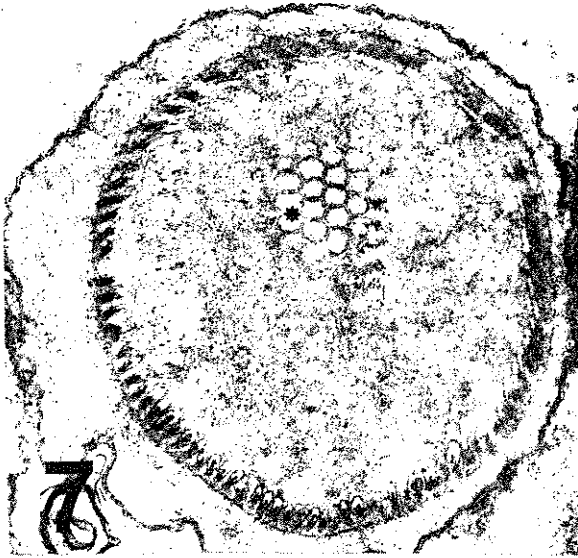
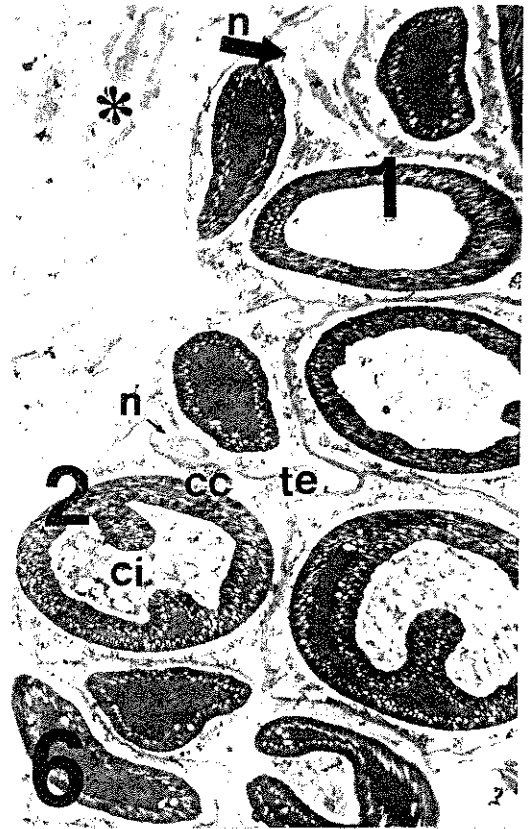
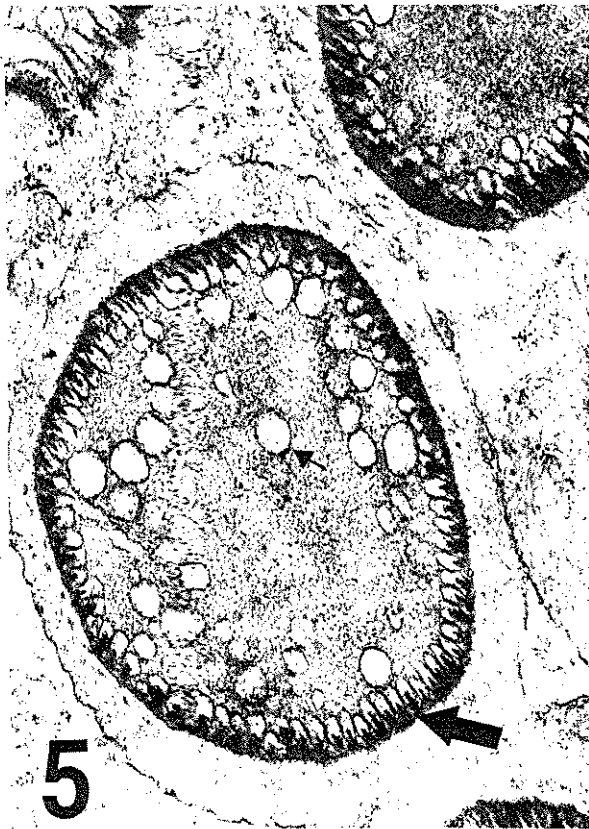


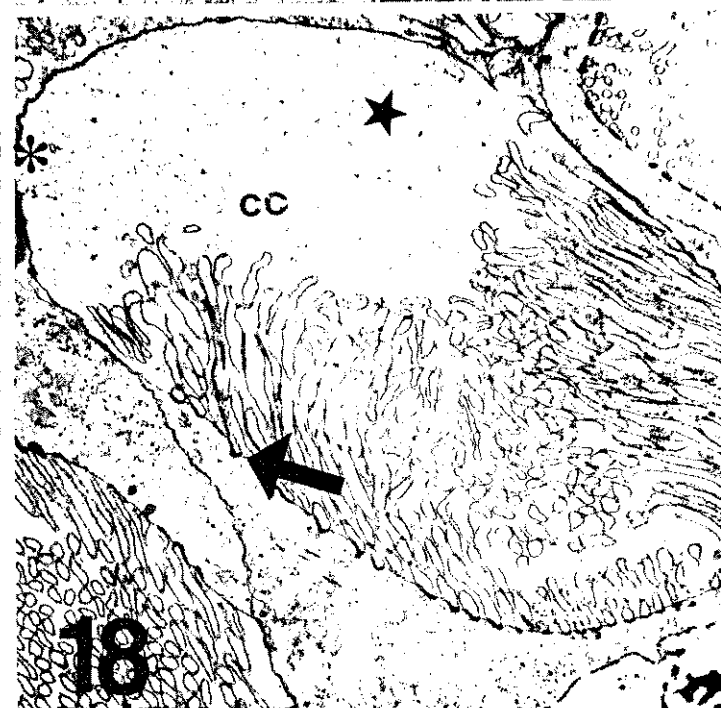
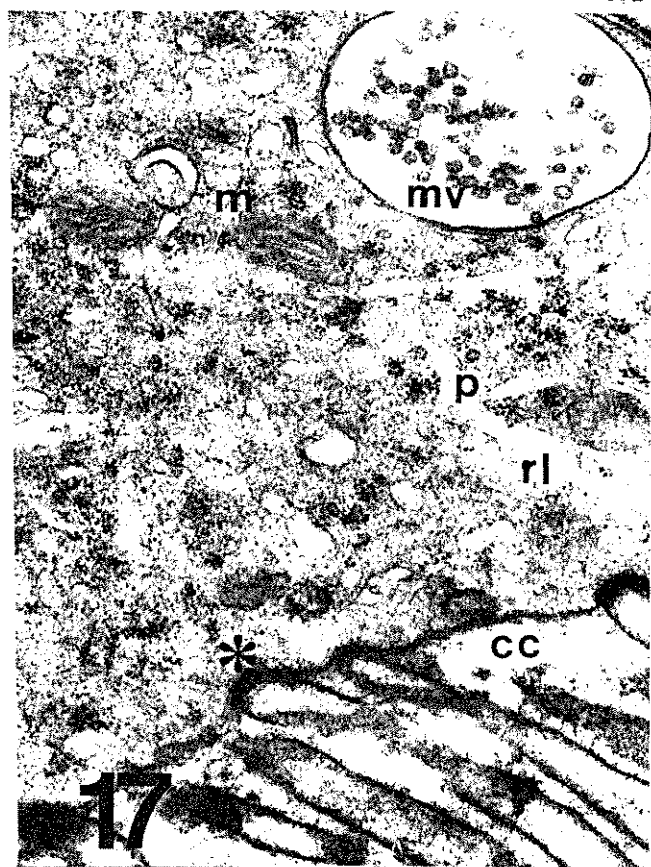
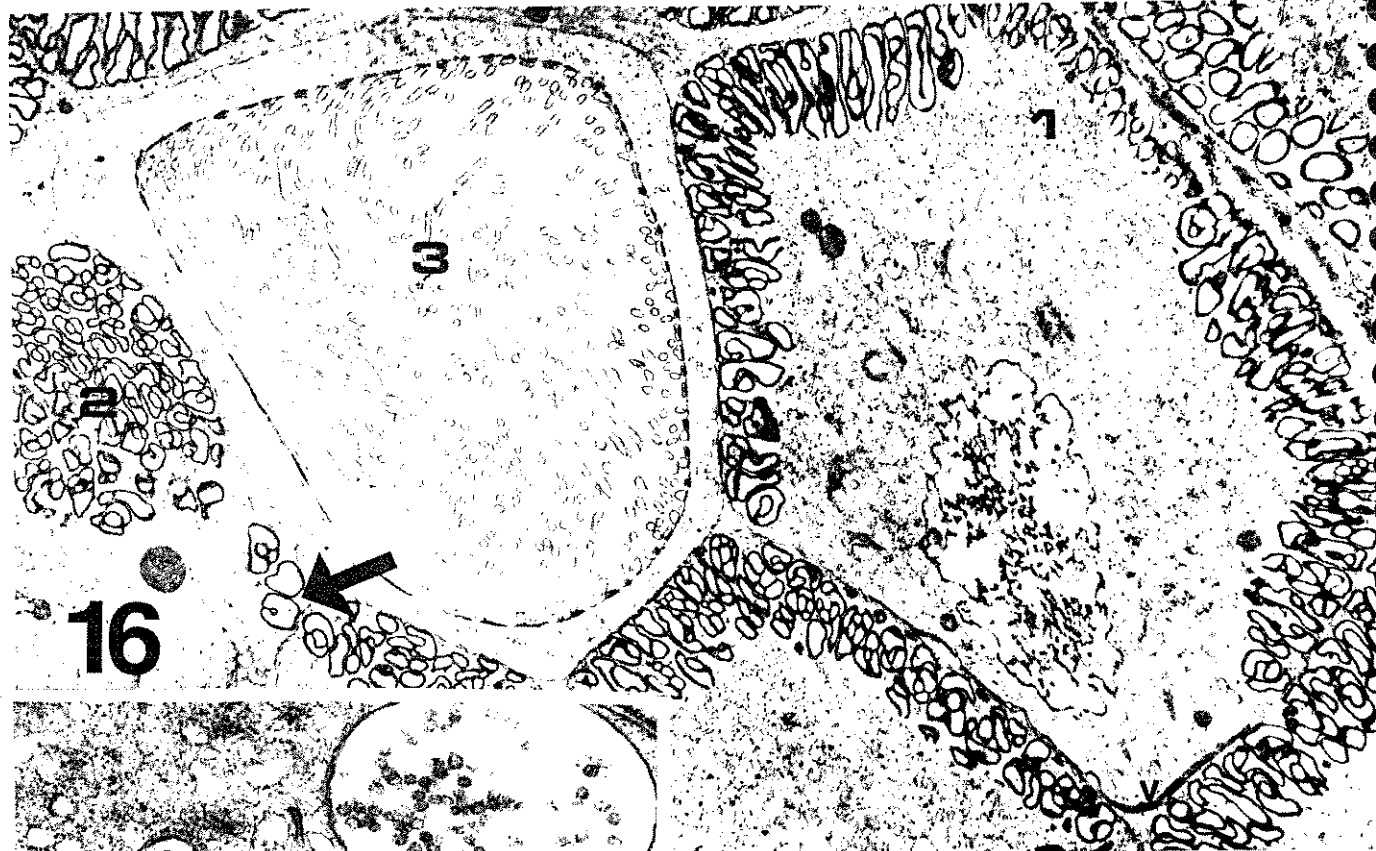
Prancha C-IV. Espermátides em processo de alongamento, cortes transversais e tangenciais, fixação glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio:

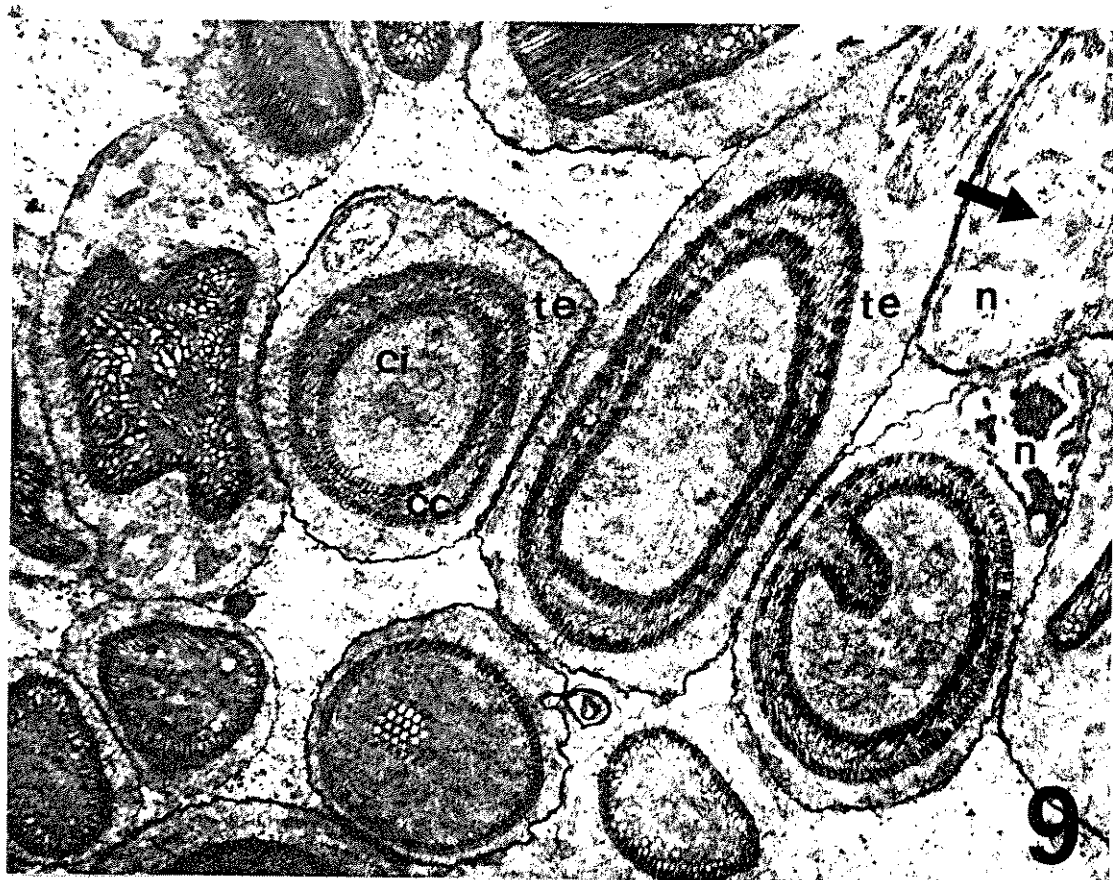
Figura 09: Pode ser observada a subdivisão das espermátides, em tubo externo (**te**), cavidade cistérnica (**cc**) e cilindro interno (**ci**) em muitas das células do corte. Os núcleos apresentam condensação cromatínica bastante conspícua, nos padrões mais ou menos similares ao que é apresentado na figura 08. Neste núcleo (**n**), observa-se a presença de uma área de cromatina que se compacta de forma bastante diferente do restante, adquirindo aspecto espiralado (**seta larga**). 7500x.

Figura 10: Neste detalhe da figura 06, o citoplasma da espermátide apresenta-se dividido em duas áreas. Na área em contato com a cavidade cistérnica, o conteúdo do citoplasma é finamente fibrilar (**seta fina**), enquanto que no meio do cilindro interno (**ci**) e no córtex do tubo externo (**te**), encontram-se filamentos mais espessos (**seta larga**) e mitocôndrias (**m**). Nesta espermátide, podemos perceber ainda que a membrana plasmática apresenta aspecto reforçado, pela presença de uma cisterna achatada, acolada a ela (**asterisco**). 23100x.









Prancha C-V: Cortes transversais e tangenciais através de espermatídes alongadas; fixação glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio.

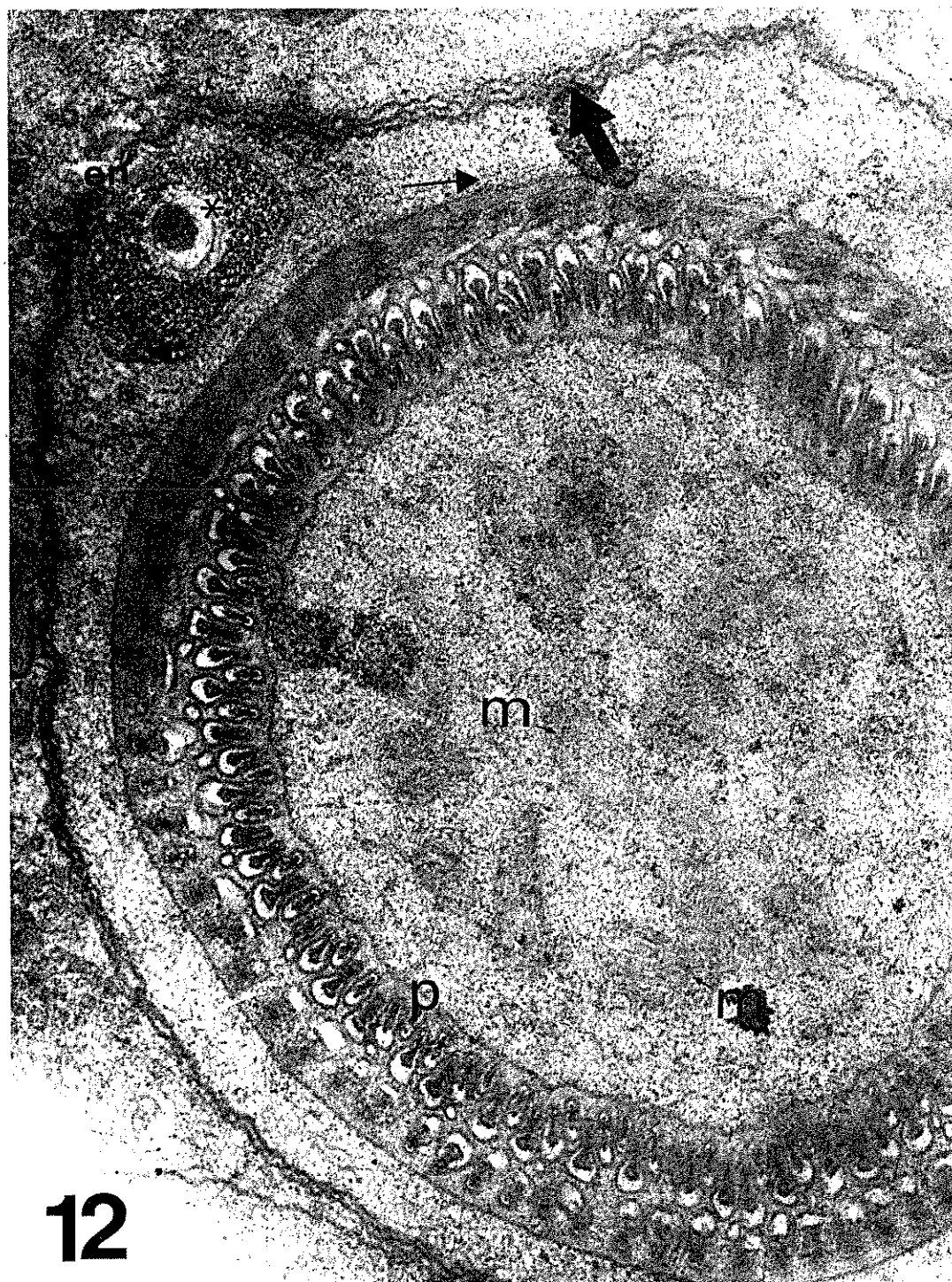
Figura 11: Este corte apresenta uma série de espermatídes em cortes longitudinais e tangenciais, nos quais podemos observar diferentes aspectos e fases do alongamento. Nas espermatídes 1 e 2, pode-se observar uma vesícula bastante achatada, tipo cisterna, que coloca-se logo abaixo da membrana plasmática (**seta larga**), conferindo à membrana das espermatídes um aspecto bastante denso. Na espermatíde 1, notamos o ponto de invaginação da cavidade cistérnica (i). O núcleo apresenta-se com contornos irregulares (n). Na espermatíde 2, observamos uma área de cromatina em espiral (**seta fina**). Na mesma espermatíde, podemos observar, no corte tangencial, o aspecto das projeções no ponto de invaginação (**ponta de seta**). Em outra espermatíde (3), notamos, graças ao corte tangencial, que já iniciou-se o deslocamento do núcleo para o tubo externo, devido ao contorno irregular do envelope deste lobo do núcleo (**asterisco**). 9000x.



Prancha C-VI: Cortes transversais através de espermatíde alongada, fixação glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio.

Figura 12: O aspecto regular do envelope nuclear sugere este corte foi feito mais distalmente em relação ao pólo nuclear. O envelope nuclear modifica-se durante a migração, tornando-se mais complexo à medida que se localiza no tubo externo (**en**). Nota-se que, nessa área, a cromatina encontra-se mais compacta que em núcleos em posição polarizada. A cromatina desses núcleos compacta-se nas proximidades do envelope nuclear, apresentando aspecto fibroso (**ponta de seta**), com um bastão mais compacto ao centro (**asterisco**). A membrana plasmática da espermatíde apresenta-se reforçada por uma cisterna achatada, elétron-densa (**seta larga**). O citoplasma, próximo à cavidade cistérnica, tem aspecto filamentoso (**seta fina**). Associadas à membrana interna da cavidade, podemos ver projeções bastante complexas (**p**). No cilindro interno, há, ainda, mitocôndrias (**m**). 48400x.

Figura 13: Em um detalhe da figura anterior, notamos que as projeções são bastante complexas. Elas podem ser divididas em porções. A primeira é uma região em forma de bolha (**1**), a qual corresponde à projeção da membrana da cavidade. A segunda porção (**2**) é um eixo fibroso central, chamado de "corpo" da projeção. A terceira porção (**3**) corresponde a uma pequena área, mais elétron-densa, na base da projeção, acolada à membrana da mesma. Pode-se notar que o citoplasma adjacente à membrana da cavidade cistérnica possui aspecto fibroso (**asterisco**). 95200x.



Prancha C-VII. Espermátides alongadas, fixação glutaraldeído-ácido pícrico-tetróxido de ósmio.

Figura 14: Podemos comparar, nesta figura, o aspecto do núcleo de uma espermátide, em um corte feito anterior ao ponto de invaginação da cavidade cistérnica (**n'**) e outro em que o núcleo apresenta-se em posição mais polarizada (**n''**). Nota-se o aspecto bastante diferente, tanto da cromatina quanto do envelope nuclear desses núcleos. Na figura, também podemos ver o aspecto reforçado da membrana plasmática da espermátide, com uma cisterna elétron-densa acolada a ela (**seta larga**). 38500x.

Figura 15: Neste corte longitudinal do pólo de invaginação desta espermátide, notamos a presença de uma estrutura em forma de escudo, o opérculo (**op**), na extremidade da célula. Abaixo do opérculo, podemos verificar a presença de uma área amorfa, bastante densa (**asterisco**). Observa-se que a cisterna que acompanha a membrana plasmática (**seta larga**) sofre uma dobra, no ponto entre o opérculo e a membrana da espermátide (**estrelas**). O citoplasma do cilindro interno (**ci**), no ponto de invaginação da cavidade, possui aspecto filamentoso e um pouco abaixo, muitas mitocôndrias (**m**). Na área de invaginação, podemos ainda comparar as projeções da membrana da cavidade (**pr**) com as projeções encontradas no restante da espermátide (**p**). 30000x.



4.4. O espermatozóide: morfologia e ultra-estrutura.

Os espermatozóides de *B. microplus* apresentam formato de remo, medindo cerca de $80 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento. Seu aspecto externo é aveludado, apresentando sulcos e projeções externas (**fig. D-01, D-02 e D-03**). Os espermatozóides muitas vezes encontram-se em posições torcidas, o que corresponde ao movimento que observamos *in vivo*. A extremidade da porção anterior tem formato arredondado, destacado por um pequeno estreitamento (**fig. D-04**).

Na luz da porção inicial do oviduto, podem ser observados tanto espermatozóides quanto espermátides em transformação (**fig. D-06 e D-07**). Nestas, as projeções internas da cavidade cistérnica podem ser observadas tanto na cavidade cistérnica em processo de abertura para o meio externo, quanto na superfície externa do espermatozóide (**fig. D-07 e D-08**).

Na porção anterior do espermatozóide e de espermátides em fase final de alongamento observa-se que as projeções externas possuem morfologia bastante diferenciada daquela apresentada pelo restante do espermatozóide (**fig. D-09**). As projeções da porção anterior apresentam-se como pequenos "tijolos" retangulares, dotados de pedúnculos, pelos quais ligam-se à célula, tendo interior homogêneo, ao contrário das observadas ao longo da superfície externa do espermatozóide (**fig. D-11**). Estas projeções são idênticas às descritas no interior da cavidade cistérnica de espermátides alongadas, já descritas no capítulo anterior.

No citoplasma do espermatozóide observa-se a presença de dois tipos de filamentos. Os mais delgados são encontrados ao longo da região cortical e na extremidade posterior. Outros filamentos, mais espessos, possuem aspecto mais tortuoso e irregular. Estes medem cerca de $10 \pm 0,04 \text{ nm}$ de espessura, sendo encontrados na região central do espermatozóide. Com esta distribuição, o citoplasma da região cortical demonstra aspecto mais homogêneo que o da região central do espermatozóide; na região posterior, observa-se a formação de camadas concêntricas uniformes de elementos de citoplasma (filamentos tipo intermediário, mitocôndrias, microfilamentos), diferindo do resto do espermatozóide onde os elementos do citoplasma se misturam, sem organização aparente (**fig. D-12**).

Ocorrem muitas mitocôndrias ao longo do espermatozóide (**fig. D-06**). Sua distribuição varia de uma região para outra. Na região anterior, até a porção média, podem ser observadas em todo o citoplasma, enquanto que, na região médio-anterior até a porção posterior do espermatozóide, elas distribuem-se no limite entre a região cortical e a interna (**fig. D-06 e D-12**). As

mitocôndrias observadas são ovaladas, isoladas, sem formar agregados ou estruturas similares. Não foi observado um axonema nesse espermatozóide.

O núcleo localiza-se na porção posterior do espermatozóide. Apresenta formato alongado, muitas vezes com uma pequena chanfradura voltada para a porção interna da célula (**fig. D-14**). Ele possui uma compactação de cromatina bem maior que a observada em núcleos de espermátides alongadas, apresentando aspecto geral bastante homogêneo, com algumas áreas pouco menos elétrôn-densas. O núcleo situa-se ao longo do eixo maior do espermatozóide, estendendo-se além do canal acrossômico. Pode-se perceber que o núcleo encontra-se limitado por um envelope bastante complexo. Este envelope é caracterizado por ser um conjunto de membranas, separadas entre si (**fig. D-10, D-13 e D-14**). Os folhetos do envelope nuclear estendem-se bastante, sugerindo uma ligação com o canal acrossômico na região posterior do espermatozóide (**fig. D-13 e D-16**).

A redistribuição de citoplasma é acompanhada pela distribuição das projeções da cavidade cistérnica, as quais passam a recobrir quase toda a superfície externa do espermatozóide, excetuando-se a extremidade anterior, recoberta pelas projeções em forma de tijolos (**fig. D-09 e D-11**), e a abertura do canal acrossômico, a qual não apresenta projeções (**fig. D-16 e D-17**). Após a conclusão desta etapa, o espermatozóide assume sua forma definitiva, semelhante a um remo (**fig. D-01**). Ele apresenta, quando visualizado ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície externa marcada por sulcos e projeções (**fig. D-03 e D-05**), os quais revelam-se, ao microscópio de transmissão, como sendo projeções da membrana do espermatozóide, com um eixo protéico interno, similares às encontradas na membrana da cavidade cistérnica de espermátides alongadas (**fig. D-14 e D-15**).

A continuidade da ligação das projeções com a membrana plasmática é bastante estreita. As projeções da superfície do espermatozóide também apresentam-se ligadas à célula por meio de filamentos bastante delgados, que formam uma camada entre a membrana do espermatozóide e as projeções. Pode-se perceber que o citoplasma na região das projeções apresenta aspecto bastante filamentososo (**fig. D-14 e D-15**). A presença de projeções externas não é homogênea em todo o espermatozóide, diferindo bastante nas extremidades. Pela ultra-estrutura, nota-se, como já citamos, a presença de projeções em forma de tijolos na extremidade anterior (**fig. D-11**), e, na extremidade posterior, ocorre ausência de projeções. Devido ao seu comprimento, é comum observar-se, em cortes da região posterior, porções de projeções cuja origem situe-se mais anterior à abertura do canal acrossômico (**fig. D-16 e D-17**).

Na extremidade posterior do espermatozóide, encontra-se uma fenda, a qual corresponde à abertura do canal acrossômico (**fig. D-16, D-17 e D-18**). O canal acrossômico é uma invaginação da extremidade posterior do espermatozóide, a qual corre paralelamente ao núcleo. A membrana que limita o

canal acrossômico mede $14 \pm 0,02$ nm de espessura, sendo recoberta com uma capa elétron-densa, que lhe dá um aspecto aveludado (**fig. D-10, D-13 e D-17**). Em cortes transversais, observa-se que o canal é delineado por uma vesícula bastante delgada, medindo $43 \pm 0,1$ nm de largura, sendo mais elétron-densa que o canal acrossômico. A membrana do canal acrossômico apresenta-se contínua com a membrana plasmática do espermatozóide (**fig. D-16 e D-17**). O interior do canal acrossômico apresenta-se bastante elétron-transparente; este canal segue até mais ou menos a quarta parte do espermatozóide, terminando em fundo de saco (**fig. D-16**).

Prancha D-I: Microscopia eletrônica de varredura. Espermatozóides de *B. microplus*. Fixação em glutaraldeído 3%.

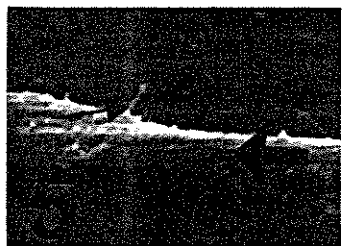
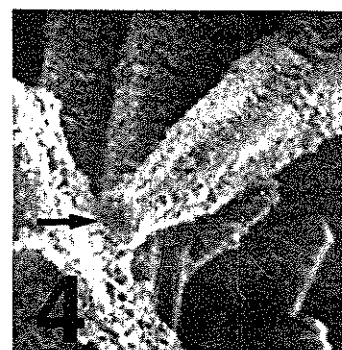
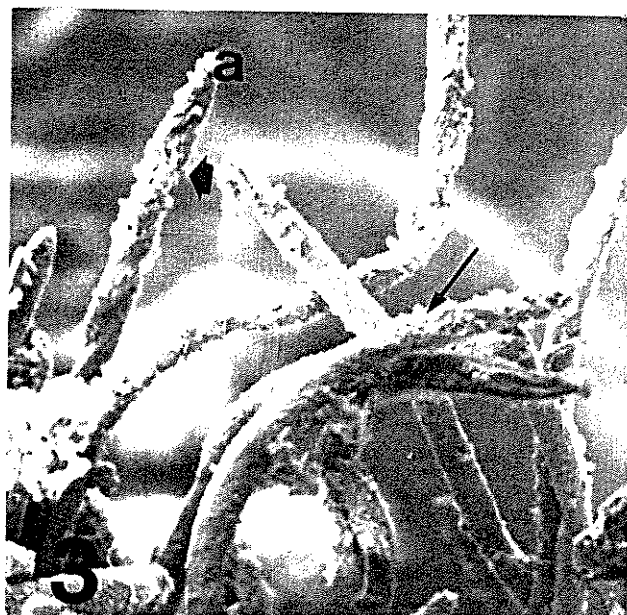
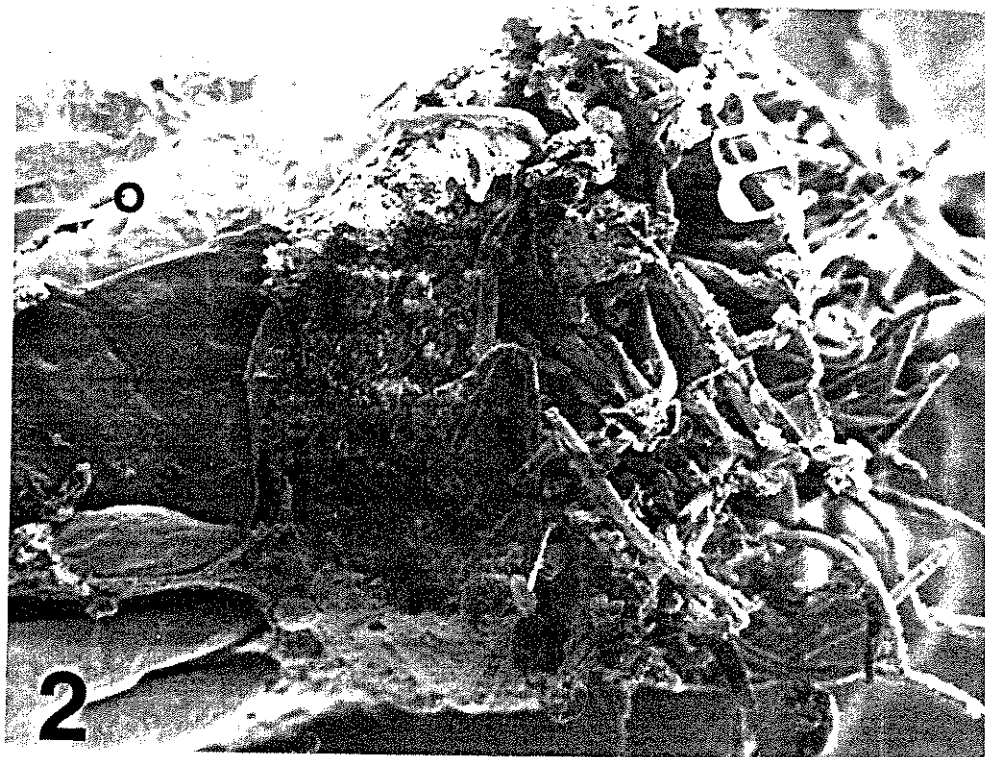
Figura 01: Espermatozóide de *B. microplus*, preparado a partir de suspensão de espermatecas. Nota-se bem o formato de remo que esses espermatozóides apresentam, sendo perceptíveis irregularidades na superfície desta célula, bem como o aspecto retorcido (**seta**). A porção anterior (a) destaca-se bastante do restante da célula. 2700x.

Figura 02: Nesta eletromicrografia, podemos observar o aspecto de um segmento da porção média do oviduto (o), o qual foi quebrado a fim de permitir a visualização de espermatozóides em seu interior. 1600x.

Figura 03: No detalhe da imagem anterior, pode-se perceber o aspecto retorcido de espermatozóides de *B. microplus*, (**seta larga**), na porção anterior (a), bem como as projeções e sulcos na superfície (**seta fina**). 4000x.

Figura 04: A micrografia permite uma visão da região anterior do espermatozóide (**seta**), de aspecto arredondado, bastante destacada do restante da célula. 6000x.

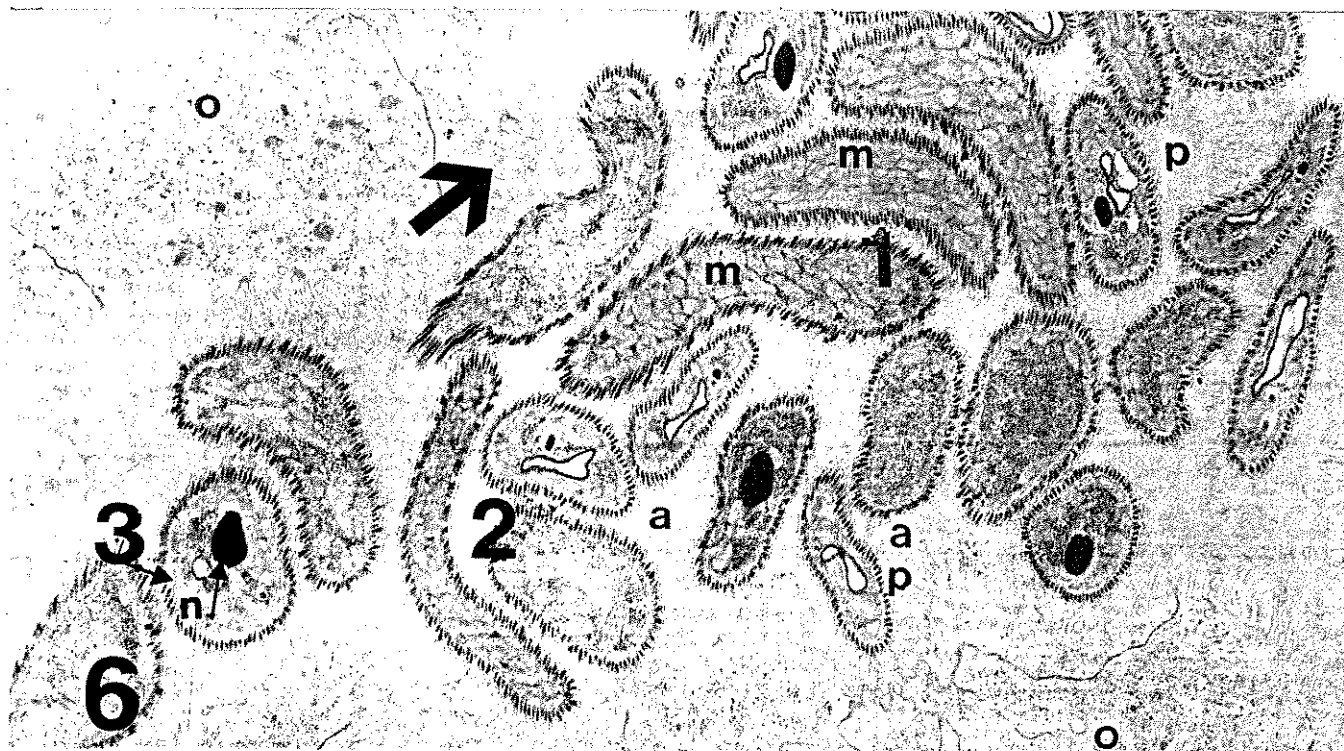
Figura 05: Esta micrografia apresenta o aspecto das estriações e sulcos da superfície externa de um espermatozóide (**seta larga**). Nota-se também o aspecto retorcido, semelhante ao apresentado por esse tipo de célula em movimento, bem como a presença de projeções bastante delgadas (**seta fina**). 9200x.



Prancha D-II. Microscopia Eletrônica de transmissão, fixação em glutaraldeído 3%, tampão fosfato de sódio. Visão geral do oviduto contendo espermátides e espermatozóides.

Figura 06: Visão geral da luz da porção inicial do oviduto. Nesta figura, podem ser observados espermatozóides em cortes transversais e tangenciais, onde são visíveis núcleos (n), mitocôndrias (m), as projeções externas (p) e o canal acrossômico (a). Compare a diferença da organização das mitocôndrias em um corte na região mais anterior (1) e outro nas regiões média (2) e média-posterior (3) do espermatozóide. Podem ser ainda observadas, na figura, células epiteliais do oviduto (o), com microvilosidades (seta). 7500x.

Figura 07: Neste corte da porção inicial do oviduto (o), pode-se perceber a presença de uma célula gamética em transformação (t) e espermatozóides (z). Nos cortes, observam-se a presença do núcleo (n) e do canal acrossômico (a), cortados em diferentes alturas do espermatozóide. Note a proporção de tamanho das células epiteliais do oviduto (o), comparadas aos espermatozóides e espermátide. A seta aponta para as microvilosidades da célula epitelial. 9700x.



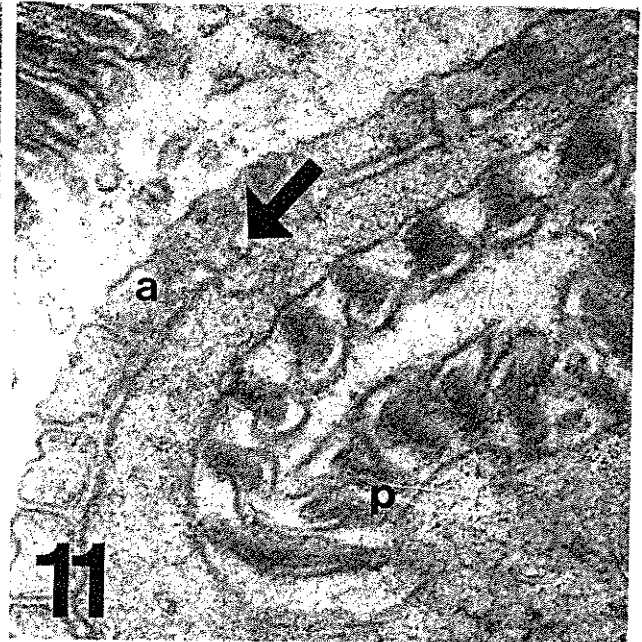
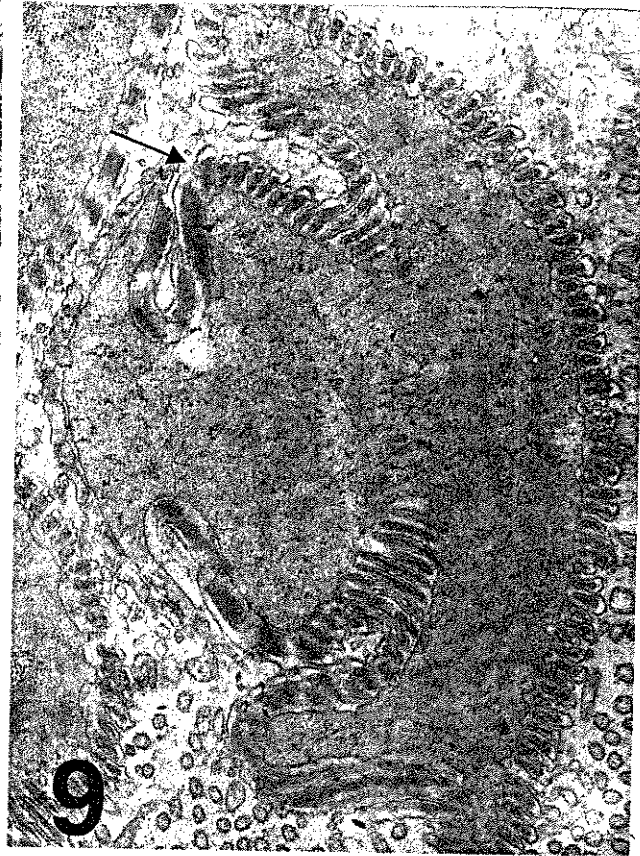
Prancha D-III. Espermátides em diferentes fases de transformação.

Figura 08: Espermátide em transformação; observe, além do peculiar formato, que podem ser encontradas projeções tanto na superfície externa (**seta larga**) quanto na porção interna, as quais ainda não foram exteriorizadas (**seta fina**). 22500x.

Figura 09: Espermátide em fase final de alongamento. Pode-se perceber que, além da morfologia geral, a porção anterior apresenta modificações nas projeções externas (**seta**). Observa-se também a remodelação da espermátide, cuja superfície externa fica totalmente recoberta com projeções que antes se encontravam no interior da cavidade cistérnica. 22000x.

Figura 10: Corte transversal na porção médio-posterior de espermatozóide plenamente formado. Pode-se perceber, além de projeções na superfície externa (**p**), o canal acrossômico (**seta larga**); este canal é rodeado com uma vesícula achatada elétron-densa (**v**). No núcleo, percebe-se a presença de um envelope bastante complexo. Este é composto por um conjunto de membranas que envolvem o núcleo (**asterisco**). 60000x.

Figura 11: Nesta figura, podemos ver, com mais detalhe, a região anterior da espermátide em fase final de alongamento. Compare as projeções da região anterior (**a**), em forma de tijolos pedunculados (**seta larga**), com as do restante do espermatozóide (**p**). 73300x.



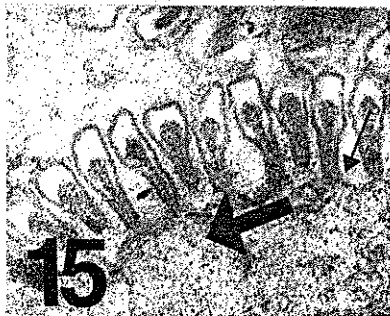
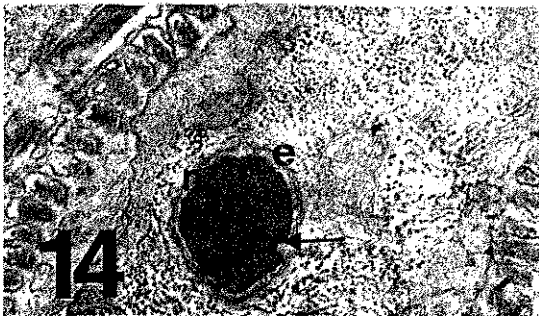
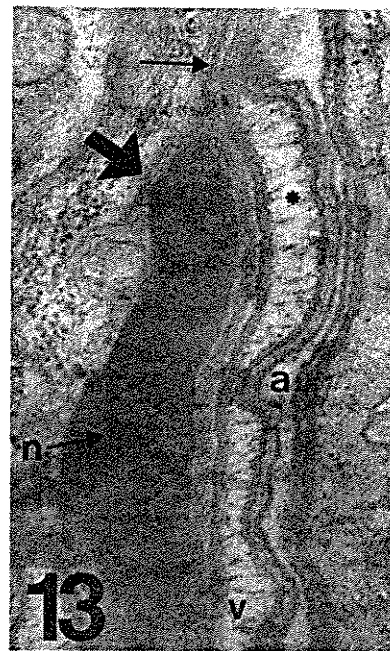
Prancha D-IV. Espermatozóide, aspectos ultra-estruturais.

Figura 12: Neste detalhe da região médio-posterior do espermatozóide, pode-se notar a diferença entre o citoplasma cortical (**c**), rico em filamentos bastante delgados (**seta fina**), e o citoplasma interno do espermatozóide (**i**), com filamentos mais espessos (**seta larga**). Na região limitante do citoplasma, nota-se uma mitocôndria, na posição típica que ocupa nessa área (**m**). 82700x.

Figura 13: A figura apresenta um corte onde pode-se notar o núcleo (**n**), em corte longitudinal, envolvido pela estrutura "envelope-like" (**seta larga**). Nota-se que o "envelope" continua-se, no sentido posterior (**seta fina**). Também percebe-se que a vesícula achatada (**v**) que acompanha o canal acrossômico (**a**) abre-se nas proximidades do núcleo, permitindo a visualização de seu conteúdo de aspecto fibroso (**asterisco**). 71900x.

Figura 14: Observe, mais uma vez, o "envelope" (**e**) que envolve o núcleo (**n**) neste espermatozóide, em corte transversal e em posição posterior; repare que o núcleo apresenta uma pequena chanfradura (**seta fina**). 49130x.

Figura 15: No corte, podem-se observar as projeções externas, sendo visíveis, em algumas, tanto a ligação destas com a membrana plasmática, dando uma idéia de continuidade (**seta fina**), quanto a riqueza em material filamentoso no citoplasma nessa região (**seta larga**). 75000x.



Prancha D-V: espermatozóide, região posterior.

Figura 16: Vista longitudinal da região posterior de espermatozóide. Pode-se perceber, além da extremidade posterior (**asterisco**), a presença do canal acrossômico (**a**), bastante longo, bem como do núcleo (**n**) e da vesícula achatada (**v**), associada ao canal acrossômico. 15330x.

Figura 17: Neste detalhe da figura anterior, percebemos a ausência de projeções externas na extremidade posterior do espermatozóide (**asterisco**). Nota-se a presença de membranas similares às que envolvem o núcleo (**seta larga**), bem como mitocôndrias (**m**) e a vesícula que reveste o canal acrossômico (**v**). A figura também permite comparar a membrana do espermatozóide (**estrela**) com a que limita o canal acrossômico (**a**). 49130x.

Figura 18: O corte tangencial permite visualizar a extremidade posterior do espermatozóide (**seta larga**). A posição do segmento do núcleo aqui mostrado sugere uma penetração do mesmo no canal acrossômico. Também vale ressaltar a ocorrência de mitocôndrias (**m**) sem posição fixa no citoplasma, na região anterior (**1**), e no limite da região cortical com a interna na porção mediana do espermatozóide (**2**). 38800x.

5. Discussão e Conclusões:

5.1. Histologia e Citoquímica:

As células gaméticas masculinas no carrapato *Boophilus microplus*, bem como em outros Ixodida, estão arrançadas na ordem reversa àquela encontrada em testículos telogônicos, de insetos (SHAROV, 1966, *apud* DUMSER & OLIVER, 1981b). Assim, as células gaméticas da região distal do testículo (área 6 pela divisão de OLIVER & BRINTON, 1972) encontram-se plenamente desenvolvidas, o que as torna aptas a serem transferidas à fêmea. Em Insecta, a mesma porção posterior do testículo seria local onde encontram-se gônias (BERLESE, 1909; SNODGRASS, 1943; SZÖLLÖZZI, 1982). Esta característica é, pois, peculiar à arquitetura testicular de carrapatos, bem como a presença de um gonóporo progoneado.

DUMSER & OLIVER (1981b) denominam como gonóporo o ponto, no testículo, por onde ocorre a passagem dos gametas a serem liberados para o meio externo. Nos testículos com gonóporo dito progoneado, o ducto pelo qual as espermatídes dirigem-se ao ducto eferente (e daí ao meio externo) situa-se internamente, na porção posterior do testículo. Em Insecta, observa-se que o gonóporo fica na extremidade do testículo que se continua com o canal deferente, denominando-se este gonóporo como opistogoniado (DUMSER & OLIVER, 1981b). As espermatídes iniciam a migração a partir da área posterior do testículo, e não como em insetos, onde observa-se uma "onda" de divisões e diferenciação, que culmina na saída de espermatozóides via gonóporo opistogoniado (DUMSER & OLIVER, 1981a; SONENSHINE, 1991). Em *B. microplus*, a região correspondente ao gonóporo situa-se no limite entre as áreas dos cistos de espermatídes redondas e das espermatídes alongadas.

O testículo de *Boophilus microplus* apresenta conjuntos de células gaméticas de estágios específicos de desenvolvimento, isoladas em cistos formados por células somáticas. A resposta PAS-positiva demonstrada pela porção limitante do cisto corrobora, também para carrapatos, com o demonstrado por BAWA & WERNER (1988), em *Diplothemnus* sp. (Pseudoscorpionida), demonstrando também a presença de carboidratos na composição da lâmina basal das células císticas.

Sobre células testiculares não gaméticas, pouco se fala na literatura a respeito de suas funções em carrapatos. Em invertebrados em geral, as relações funcionais e estruturais entre células acessórias somáticas

testiculares, ou mais simplesmente, células de Sertoli, e células gaméticas mostram ampla diversidade. GURAYA (1995), em revisão sobre tais tipos celulares, cita-as como presentes em ampla gama de organismos, como Arthropoda, Chordata, Echinodermata e Mollusca, apresentando-se altamente desenvolvidas, assemelhando-se na organização morfológica e na inter-relação com células da linhagem gamética. Em geral, a complexidade dessas células varia de forma relacionada com a complexidade da arquitetura testicular.

Em *B. microplus*, pudemos perceber, neste trabalho e em observações anteriores, quatro tipos de células somáticas testiculares: as células císticas e mióides, descritas à parte (NORMANN & DOLDER, 1997), as delimitadoras do canal deferente, na porção anterior do testículo, e as da zona clara, na extremidade posterior do órgão. Dentre elas, as formadoras de cistos são, como o nome indica, responsáveis pela formação dos espermatocistos, ou seja, do compartimento anátomo-fisiológico de isolamento das células gaméticas. O fato de serem observadas granulações PAS-positivas em células císticas, similares às descritas em células de Sertoli por CUSTÓDIO DE SOUZA (com.pes.), reforça a idéia de tráfico de nutrientes ou outras substâncias para as células da linhagem gamética. Portanto, não pode ser descartada uma analogia maior ainda entre funções de células císticas e as de Sertoli de outros organismos, como Arthropoda, Chordata e outros grupos (HINSCH, 1993).

A análise topográfica do testículo de *Boophilus microplus* deixou claro que esta espécie obedece aos padrões gerais da gametogênese de carrapatos. Como tal, apresenta conjuntos de células gaméticas de estágios específicos de desenvolvimento, isoladas em cistos, os quais se desagregam na porção final para liberação das espermátides. A formação dos cistos testiculares também tem sido descrita nas revisões de BALASHOV (1972) e OLIVER (1991), sobre gametogênese masculina de carrapatos. As fases mais precoces (espermatogônias) estão localizadas anteriormente, e as mais tardias vão-se sucedendo até a região mais posterior do testículo, onde estão as espermátides alongadas. ZHANG *et al.* (1995) descreve a presença de uma população de gônias que não encontra-se associada a células císticas, em *Ornithodoros parkeri* (Cooley). Em nossas observações, também encontramos espermatogônias desencistadas, no início do testículo, semelhante às observações registradas para *O. parkeri*.

A descrição de um testículo dividido em zonas com diferentes fases gametogênicas coincide, de certa forma, com o observado em Insecta por De WILDE (1963). Esse autor descreveu sete zonas testiculares, conforme a evolução da linhagem gamética, em Insecta: apical, de gônias, de cito I, da primeira divisão meiótica, da segunda divisão meiótica, de espermátides e de espermatozóides. Em *Boophilus microplus*, não identificamos espermatozóides maduros no interior do testículo. OLIVER & BRINTON (1972) e WYSOKI & BOLLAND (1978) dividem o testículo de carrapatos em seis áreas, de tamanho mais ou menos similar. Nessas áreas foram localizadas as diferentes

populações de células da linhagem gamética. Utilizando o mesmo tipo de mapeamento, OSBURN *et al.* (1980) descreveram seis zonas testiculares, em relação à evolução da linhagem gamética. Em seu trabalho, também não referiram-se a zonas com espermatozóides maduros no interior do testículo.

Pelo presente trabalho, pudemos dividir o testículo de *B. microplus* em seis áreas, dentro do critério de zoneamento do testículo empregado por OLIVER & BRINTON (1972). Na área I, a região anterior, encontramos as duas populações de espermatogônias e os espermátócitos primários jovens. Na área II, ou médio-anterior, espermátócitos jovens e em crescimento. Na área III ou área média, exclusivamente espermátócitos em crescimento. A zona de divisão está presente, juntamente com espermátócitos em crescimento, na área IV. A área V ou médio posterior, é composta por espermátides redondas, enquanto que as espermátides alongadas compõem, juntamente com a "zona clara" a área VI ou região posterior. A divisão que adotamos para mapear o testículo de *B. microplus* corrobora aquela empregada por OSBURN *et al.* (1980), para analisar a progressão da espermatogênese no gênero *Boophilus*.

WYSOKI & BOLLAND (1978, 1979) citam, em *Rhipicephalus appendiculatus* (Neumann, 1901), *R. evertsi* (Neumann, 1899) e *R. simus* (Koch, 1844), e em *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) e *A. lepidum* (Dönitz, 1909), a presença da "zona clara", a qual é descrita para *Dermacentor variabilis*, por DUMSER & OLIVER (1981a, 1981b) como sendo uma área, mais evidente em animais mais velhos, onde ocorre degeneração de espermátócitos que não diferenciaram. Em *B. microplus*, notou-se também a presença dessa região. Esta área corresponde ao ponto onde ocorre a fissão do testículo larval único em dois testículos. Segundo KHALIL (1969), OLIVER (1991) e SONENSHINE (1991), o testículo em formas pré-imaginais de carrapatos apresenta-se inteiro, vindo a dividir-se entre o estágio de metaninfa e neandro (imago jovem). Em *Argas miniatus*, observa-se que os dois testículos permanecem unidos por um ligamento (JULIO, 1978); isso não ocorre em *B. microplus*. Portanto, pode-se sugerir que, na zona clara, ocorra morte celular com três origens: seriam restos do processo de espermiogênese (células císticas), espermátócitos que não modificaram-se em espermátides ou também figuras derivadas da ontogênese do testículo (KHALIL, 1969; ALBERTS *et al.*, 1994; MARIA, com. pes.).

A espermatogênese em *B. microplus* ocorre nas áreas I a IV do testículo (segundo a classificação de OSBURN *et al.*, 1980). De fato, detectaram-se figuras de células pré-espermátide nos três primeiros quintos do testículo de animais plenamente maduros. Animais mais jovens (machos recém-emergidos) teriam uma proporção de espermátides menor, se levarmos em conta que, para que ocorra o processo de espermiogênese, é fundamental o repasto de sangue (OLIVER & DOTSON, 1993). O animal encontra-se plenamente apto a fertilizar, portanto, somente após a passagem para o instar de gonandro, ou macho plenamente desenvolvido (OLIVER, 1991). Como em outros trabalhos, não foi visualizada uma linhagem de espermátócitos secundários. GARCIA (1993)

havia feito referência a este fato em *B. microplus*, sobre o qual OLIVER (1991) também comentou.

O material observado no interior da cavidade cistérnica de células da linhagem gamética de *Boophilus microplus* demonstrou caráter glicoprotéico. SHEPHERD *et al.* (1982a, 1982b), observando espermátides *in vitro*, verificaram que, quando ocorre a eversão em *Ornithodoros moubata* e *Dermacentor variabilis*, dá-se a liberação de um polipeptídeo que estava contido na cavidade cistérnica. Os autores afirmaram que este polipeptídeo estimularia a vitelogênese e a motilidade do oviduto. O mesmo foi observado por SAHLI (1985). Logo, pode-se sugerir que haja papel ativo em processos de síntese e secreção em células gaméticas de *B. microplus*.

De acordo com HERMO *et al.* (1994), ocorre exportação de proteínas por parte de espermátides, em células da linhagem gamética de ratos; isso leva tais células a contribuírem ativamente para sua própria maturação, providenciando condições adequadas ao meio externo, a partir de atividades de endocitose e/ou secreção. SHEPHERD *et al.* (1982a) afirmam que o material liberado pelos espermatozóides ao alongarem desencadearia, no organismo feminino, respostas como aumento na produção de vitelo nos ovócitos. Portanto, a constatação da presença de material glicoprotéico em espermátides alongadas de *B. microplus*, e a sugestão de que este material atuaria no metabolismo feminino segue esta mesma linha de pensamento.

Comparando o material corado com prata e aquele submetido ao teste citoquímico para proteínas totais, observa-se pequena diferença na intensidade das respostas. Isso leva a sugerir que, além das proteínas argirófilas, outros tipos de proteínas devem estar presentes nessa área. A argirofilia demonstrada no bordo de espermatócitos, espermátides redondas e na cavidade cistérnica de espermátides alongadas deve-se à constituição das proteínas aí presentes. Uma das teorias em relação à resposta argirófila sugere que ela deve-se pela presença de "clusters" de aspartato. De acordo com VALDEZ *et al.* (1995), em proteínas Ag-NOR, como a numatrina, ocorrem duas regiões ricas em aminoácidos ácidos (aspartato e glutamato). Segundo observações desses autores, a região rica em aspartato demonstrou resposta positiva à coloração com nitrato de prata, o que foi constatado pela coloração de uma solução de poli-aspartato pelo mesmo método.

A presença de proteínas ácidas na constituição do arcabouço cromatínico é bem conhecida, em especial em nucléolos, o que explica a sua presença como constituinte de nucléolos de espermatócitos de *B. microplus* (ALBERTS *et al.*, 1994). Também observou-se resposta argirófila no limite e no interior da cavidade cistérnica. A argirofilia dos componentes da cavidade cistérnica não é citada em nenhuma referência. Partindo da observação de VALDEZ *et al.* (1995), poderia ser devido à presença de áreas ricas em aspartato nas proteínas do interior da cavidade. Devido à presença de grupamentos R-

ionizáveis, estas possivelmente seriam proteínas hidrofílicas, o que também serviria para reforçar a hipótese de que haveriam mediadores químicos na cavidade (SHEPHERD *et al.*, 1982a).

O aspecto dos núcleos de espermátócitos em crescimento e de espermátides polarizadas e alongadas, quando corados com a prata, também apresentou diferenças, sendo a resposta positiva mais intensa em espermátides mais adiantadas. É conhecido o fato de que, durante a espermiogênese, ocorre uma substituição das proteínas que estão complexadas com o material genético, à medida que ocorre a compactação nuclear (MELLO, 1997). Portanto, pode-se sugerir que também em *B. microplus* ocorra uma substituição de proteínas nucleares por outras, levando à compactação da cromatina em filamentos e grumos; as proteínas responsáveis por este "empacotamento", portanto, seriam realçados pelas técnicas que empreguem sais de prata.

Foram observadas, principalmente na região de espermátócitos em crescimento, pontes citoplasmáticas. Estas mantinham unidas células nos cistos de espermátócitos e nos de espermátides polarizadas. As pontes observadas em *B. microplus* são similares àquelas descritas em outros carrapatos (BREUCKER & HORSTMANN, 1972). Contudo, na maioria dos organismos, elas restringem-se a estágios mais imaturos. Em *B. microplus*, notou-se a presença de pontes citoplasmáticas até o estágio de espermátide polarizada, as quais desapareciam logo a seguir, durante a formação da cavidade cistérica e alongamento da espermátide. Pontes mais ou menos similares às de *B. microplus* são descritas por FAWCETT *et al.* (1959) para vários organismos, atribuindo-lhes a função de manter a sincronia durante o desenvolvimento das células gaméticas, o que contribui para a caracterização de células gaméticas pré-meióticas como clones (KING *et al.*, 1986). Elas originam-se após a divisão celular, na qual a cariocinese completou-se, mas não a divisão do citoplasma (WITALINSKI & DALLAI, 1993).

A análise da espermiogênese em *B. microplus* ao microscópio de luz permitiu comprovar que ocorre correspondência, no carrapato do boi, aos sub-estágios propostos por SULEIMAN & BROWN (1978) em *Dermacentor variabilis*, e OLIVER (1991) na sua revisão sobre a gametogênese de carrapatos. Na microscopia de luz, nota-se, a princípio, a migração do núcleo para o pólo da espermátide voltado para o interior do cisto e a aparente condensação citoplasmática periférica, na forma de estrias. CASTEEL (1917), em *Argas miniatus*, também citou a presença de estriações perpendiculares à superfície celular. NORDENSKIÖLD (1920), em *Ixodes ricinus*, compara a região periférica dos espermátócitos a uma zona *pellucida*, a qual corresponde, nas espermátides, ao "ectoplasma". TUZET & MILLOT (1937) sugerem que as estrias sejam formadas, em *Ixodes sp.*, por lipídios. Em *B. microplus*, percebemos, pela análise citoquímica, que essas estrias são de composição principalmente glicoprotéica. Também observou-se que, no decorrer da maturação da espermátide, essas estrias apresentam crescente afinidade pela

prata. Este aumento na argirofilia pode dever-se a substituição ou uma maior incorporação de proteínas com afinidade pelos sais de prata.

Nas espermatídes polarizadas, pôde-se localizar uma vesícula, às vezes bastante estreita, próxima ao núcleo, de caráter intensamente PAS-positivo. A posição e o conteúdo, rico em açúcares neutros, são indicativos de que se trate do acrossomo em formação. Na formação de acrossomos, é comum uma intensa resposta PAS-positiva, devido ao acúmulo de material enzimático, de natureza glico-protéica, nesse compartimento (GARCIA *et al.*, 1991). A posição desta região PAS-positiva coincide com a posição da vesícula pré-acrossômica descrita por REGER (1961; 1962; 1963) em *Amblyomma dissimili*. Isto leva a sugerir que esta vesícula pode se tratar do acrossomo em formação.

Após a fase de polarização, dá-se a formação de uma região PAS-positiva, ocupando cerca de dois terços da espermatíde. A seguir, a partir do pólo nuclear, ocorre a invaginação desta área PAS-positiva, concomitantemente com o alongamento de espermatídes e lateralização do núcleo. Este processo corresponde ao denominado por SULEIMAN & BROWN (1978) como invaginação ou alongamento. Durante este evento, dá-se a divisão da espermatíde nas três sub-regiões: uma região de citoplasma periférico, onde encontra-se o núcleo; a cavidade cistérnica invaginada, bastante fácil de observar, devido ao seu caráter PAS-positivo; e uma área de citoplasma central, que não apresentou reação PAS-positiva.

5.2. Espermio gênese: fases iniciais.

Para uma melhor compreensão dos eventos observados na espermio gênese de *B. microplus*, optamos iniciar a descrição pelos espermatócitos em crescimento. Os espermatócitos em carrapatos passam por uma fase na qual observa-se um aumento no volume celular e na quantidade de organelas, especialmente complexos de Golgi, mitocôndrias, retículo rugoso e corpos multi-vesiculares (OLIVER, 1991). Assim, nota-se uma preparação dessas células para todas as modificações pelas quais irão passar durante a espermio gênese.

O aspecto dos espermatócitos, ao MET, coincide com o apresentado por OLIVER & BRINTON (1972), em *Dermacentor occidentalis* (Marx); por BREUCKER & HORSTMANN (1972), em *Ornithodoros moubata*; e por SULEIMAN & BROWN (1978), em *Dermacentor variabilis*. Esses autores também descrevem um grande crescimento dos espermatócitos, os quais apresentam muitos complexos de Golgi, além de figuras de retículo endoplasmático rugoso. Nessas células, como também constatamos, é

necessária a presença de aparato de síntese para permitir atividades de diferenciação, que, em carrapatos, envolvem fusão de cisternas, alongamento da cavidade e, paralelamente, formação de microfilamentos. O grande crescimento dos espermátócitos em carrapatos é, portanto, explicado pela necessidade da formação de maquinaria de síntese.

No núcleo de espermátócitos em crescimento e espermátides iniciais, chamam a atenção organelas intra-nucleares parecidas com nucléolos. A literatura refere-se a essas estruturas como "corpos esféricos", "corpos redondos" ou "binnenkörpern" (MESSIAS, Jr., 1990; TSVETKOVET *et al.*, 1997). Tais estruturas, presentes em núcleos de células de linhagem gamética e somáticas, são distintas de nucléolos, em especial pela ausência de rDNA. Ao microscópio de luz, nucléolos e corpos esféricos são quase indistintos, pois ambas são estruturas basófilas, devido à presença de RNA, além de apresentarem proteínas argirófilas (VALDEZ *et al.*, 1995). A microscopia eletrônica de transmissão revelou algumas diferenças morfológicas entre essas duas estruturas. Essas diferenças são o aspecto mais esférico desses corpos em espermátócitos em crescimento, o qual modifica-se, nas espermátides redondas, para a forma de agregados elétron-densos; tanto os agregados quanto as formas esféricas que essas estruturas assumem são bastante diferentes da morfologia normalmente descrita para nucléolos (ALBERTS *et al.*, 1994).

Corpos esféricos são relacionados ao processamento, e não à síntese, de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs). BIER *et al.* (1967), por autoradiografia, estabeleceram que estas organelas nucleares não sintetizam, mas acumulam RNA na forma de ribonucleoproteínas. Essas organelas são homólogas aos "coiled bodies" (corpos espirais) de células somáticas (ANDRADE *et al.*, 1993; LAMOND & CARMO-FONSECA, 1993; NICKERSON *et al.*, 1995) e às esferas de ovócitos (GALL & CALLAN, 1989). Os corpos esféricos, segundo TSVETKOVET *et al.* (1997), apresentam snRNPs e outros fatores de pré-"splicing" do mRNA, bem como outros fatores de pré-processamento de rRNA. Além da semelhança, à primeira vista, com nucléolos, essas organelas também possuem componentes em comum, como as proteínas fibrilarina, Nopp140 e NAP57, as quais interligam-se, formando complexos protéicos (MEIER & BLOBEL, 1992). A diferença de densidade eletrônica observada em corpos esféricos de *B. microplus* deve-se, possivelmente, ao grau de interação dos complexos de RNPs e demais proteínas. À medida que ocorre o processamento de snRNPs, ocorre uma remodelagem nos corpos esféricos, que se tornam agregados irregulares de esferas elétron-densas menores e se desagregam ao final da espermiogênese, de forma similar ao que ocorre em nucléolos (ALBERTS *et al.*, 1994).

Sobre o papel das snRNPs, presentes nos corpos esféricos, cabe lembrar que esses complexos de pequenos RNAs nucleares e proteínas reconhecem determinadas seqüências de ácidos nucléicos via pareamento de bases. Sua

principal tarefa é mediar o “splicing”, do mRNA (ALBERTS *et al.*, 1994; CLARK & RUSSEL, 1997). Em se tratando de células com grande número de ribossomos e conspícua atividade de síntese, justifica-se a presença dessas estruturas de processamento.

Foram visualizados, freqüentemente, em espermátides polarizadas e espermátides com a cavidade cistérnica em formação, corpos multi-vesiculares. Essas estruturas encontram-se presentes em células em que ocorre intensa fusão e reciclagem de membranas, como na vitelogênese, por exemplo (ALBERTS *et al.*, 1994, AYBAR *et al.*, 1996; SATHANANTHAN, 1997). Durante os eventos que culminam na formação da cavidade cistérnica, ocorre a formação de uma membrana limitante, a partir da fusão das cisternas subsuperficiais. Este fato, associado ao crescimento da espermátide, explicam a presença dessas organelas no citoplasma de *B. microplus*. Conforme observamos, ocorre alteração no aspecto dos corpos multi-vesiculares; eles passam de um aspecto mais compacto, nas espermátides em polarização (**fig. B-16**), a outro mais esvaziado, como observamos em espermátides com a cavidade cistérnica plenamente formada (**fig. B-17**). A modificação no aspecto dos corpos multi-vesiculares reforça a idéia de sua participação nos processos de incorporação e reciclagem de biomembranas, nessas células. Este papel também é atribuído aos corpos multi-vesiculares por POL *et al.* (1997), ao analisar frações endossomais de fígado de rato.

Em espermatócitos e espermátides de *B. microplus*, foi observada uma série de características de células com atividade de síntese e secreção. A observação ou sugestão de que haja papel ativo em processos de síntese e secreção em células gaméticas não é exclusivo de carrapatos. HERMO *et al.* (1994), afirmam que ocorre exportação de proteínas por parte de espermátides, em células da linhagem gamética de ratos. Após a adição de extrato protéico de espermátides arredondadas, a quantidade de proteínas totais de células de Sertoli em cultura aumentou 133% acima dos níveis apresentados pelos controles. Assim, esses autores concluíram que a espermátide e o espermatozóide poderiam contribuir para sua própria maturação, providenciando condições adequadas ao meio externo, a partir de atividades de endocitose e/ou secreção (HERMO *et al.*, 1994). SHEPHERD *et al.* (1982a, 1982b), descrevendo a maturação das espermátides de *Ornithodoros moubata* e *Dermacentor variabilis* (a partir de experimentos *in vitro*) afirmam que o material liberado durante a transformação de espermátides em espermatozóides desencadearia, no organismo feminino, respostas como aumento na produção de vitelo nos ovócitos. Portanto, diante da presença de maquinaria de síntese em espermátides de *Boophilus microplus*, pode-se sugerir que o material produzido e armazenado na cavidade cistérnica por essas células seria também destinado a atuar no metabolismo feminino, além de atuar em processos de síntese já mencionados acima.

A presença de polissomos e de retículo endoplasmático rugoso foi notada em especial abundância nas espermátides polarizadas. Os polissomos também vistos em espermatócitos em crescimento e espermátides com a cavidade cistérnica formada. Essas estruturas encontram-se diretamente associadas a processos de síntese protéica, tanto na síntese de proteínas de exportação (caso do retículo rugoso) quanto de proteínas para uso da própria célula (ALBERTS *et al.*, 1994; VOET & VOET, 1995). No material estudado, observamos a formação da cavidade cistérnica, a condensação da cromatina e a formação de material provavelmente protéico, de aspecto filamentosos, no citoplasma. Esses eventos ocorrem após a polarização da espermátide, o que nos leva a sugerir que, nesta etapa, esteja ocorrendo um grande volume de síntese protéica, tanto para exportação ou renovação de membranas, quanto para uso pela própria célula. Tanto a condensação da cromatina, quanto as modificações das cisternas são dependentes de que tenha ocorrido a síntese de proteínas necessárias à expressão dessas características das espermátides. Essas características (núcleo condensado, cavidade cistérnica bem formada e citoplasma rico em filamentos) são necessárias aos processos posteriores da diferenciação dessas células.

Em espermatócitos e espermátides redondas, também notaram-se pontes citoplasmáticas ao microscópio eletrônico de transmissão. Essas pontes, já comentadas no capítulo anterior, são similares àquelas descritas em outros carrapatos (BREUCKER & HORSTMANN, 1972; OLIVER & BRINTON, 1972). Na maioria dos organismos, elas restringem-se a estágios mais imaturos. Em *B. microplus*, notou-se a presença de pontes citoplasmáticas até o estágio de espermátide polarizada, as quais aparentemente desaparecem logo a seguir, durante a formação da cavidade cistérnica e alongamento. OLIVER & BRINTON (1972) também observaram, em *Dermacentor occidentalis*, pontes em espermátides em polarização, sendo, portanto, uma característica desse grupo (OLIVER, 1974).

Estruturas que chamam bastante a atenção em elétron-micrografias de espermatócitos e espermátides de *B. microplus* são as cisternas subsuperficiais. A presença desta estruturas é um marcador citoplasmático de início de espermiogênese, posto que elas irão tornar-se mais evidentes em espermatócitos que iniciarão o processo de diferenciação celular. Em trabalhos mais antigos, já temos referência a respeito delas. CASTEEL (1917), em *Argas miniatus*, cita a presença de estriações perpendiculares à superfície celular. NORDENSKIÖLD (1920), em *Ixodes ricinus*, compara a região periférica dos espermatócitos a uma *zona pellucida*, a qual corresponde, nas espermátides, ao "ectoplasma". REGER (1961) procurou analisar as estruturas da periferia de espermatócitos em *Ornithodoros sp.*, as quais CASTEEL (1917) denominara como "estriações". REGER denominou como "cisternas sub-superficiais", devido ao aspecto das vesículas abundantemente encontradas na região cortical de espermatócitos e espermátides iniciais.

A origem dessa estrutura tem diferentes interpretações. REGER (1963) atribui ao retículo endoplasmático liso; mais tarde, ele reinterpreta a origem dessas vesículas, concluindo ser a partir do complexo de Golgi, o que justifica referindo-se à abundância de imagens dessa organela próxima às cisternas (REGER, 1974). BREUCKER & HORSTMANN (1972), OLIVER & BRINTON (1972), SULEIMAN & BROWN (1978) e SONENSHINE (1991) propõem que as cisternas sejam originadas a partir de dobras da membrana plasmática. Nessas células, ocorre uma proximidade física das cisternas com o retículo endoplasmático (liso e rugoso, em espermátocitos) e com o complexo de Golgi, sendo também notada a presença de vesículas golgianas.

A resposta positiva ao PAS e a corante aniônico, ao microscópio de luz, é indicativo, respectivamente, da presença de açúcares neutros e proteínas. Açúcares neutros são incorporados pelo retículo endoplasmático a resíduos de asparagina de proteínas, e pelo complexo de Golgi a outros resíduos de aminoácidos (ALBERTS *et al.*, 1994; VOET & VOET, 1995).

Em *B. microplus*, o retículo liso, durante o desenvolvimento dessas espermátides, apresentou modificações interessantes, observáveis ao microscópio eletrônico de transmissão. Os túbulos de retículo liso visualizados em espermátocitos e em espermátides conectadas por pontes citoplasmáticas, onde haviam cisternas em formação, apresentavam membranas paralelas com espaçamento regular, bastante densas e felpudas (**fig. B-04 e B-05**). Essas membranas assemelhavam-se às encontradas no ponto de estrangulamento das células contatadas pelas pontes nos espermátocitos e espermátides, bem como à das cisternas subsuperficiais. Já em espermátides com a cavidade cistérnica em grau mais adiantado de formação, observamos o retículo liso irregular e pouco denso. Suas membranas tinham a mesma densidade eletrônica apresentada por outras membranas deste mesmo tipo de célula. Nessas espermátides, não foram observadas figuras que sugerissem a formação de novas cisternas subsuperficiais. Isto sugere que a forma de retículo liso mais denso ("felpudo") pode estar relacionado à formação das cisternas subsuperficiais.

Em nosso trabalho, a análise inicial revela alterações ultra-estruturais nas cisternas subsuperficiais. Observa-se, a princípio, um aumento no número e nas dimensões dessas estruturas, à medida em que progridem a espermatogênese e a espermiogênese.

Os eventos de agregação e fusão de cisternas foram sistematicamente divididos, no presente trabalho, em quatro estágios diferentes. No primeiro estágio, observa-se que ocorre agregação de cisternas no pólo oposto ao do núcleo, mantendo um espaçamento regular. A seguir, passam a ser observadas figuras de aglutinação de duas a cinco cisternas, chamados agregados secundários. Estes agregados, por sua vez, unem-se em blocos maiores, os denominados agregados terciários. Nos agregados terciários, as membranas externas das cisternas fundem-se, levando à formação de uma membrana

delimitante da cavidade. O final da fusão dos agregados de cisternas, no qual observa-se interação com filamentos citoplasmáticos, caracteriza a formação do agregado quaternário, no qual a membrana da cavidade cistérnica encontra-se bem definida.

Não encontramos, na literatura consultada, registro semelhante em termos de uma classificação dos estágios de fusão das cisternas em carrapatos. Geralmente, os textos falam vagamente sobre estes eventos, nunca aprofundando-se nem tentando explicar as radicais transformações pelas quais as cisternas subsuperficiais passam. É provável que esta transformação das cisternas em uma cavidade cistérnica seja bastante rápida, o que contribui para dificultar sua descrição detalhada. Este fato pode, portanto, ter contribuído para que, até o momento, este fenômeno não tenha sido descrito com mais detalhes. A disposição das cisternas em favos de colméia é algo que também chama bastante a atenção, em cortes transversais. Essa disposição parece ser bastante lógica, pois facilita o contato e a fusão das cisternas, durante a formação posterior da cavidade.

As primeiras cisternas a fusionarem são aquelas que se encontram mais próximas à membrana plasmática da espermatíde redonda. Essas cisternas são aquelas que não apresentaram as vesículas cistérnicas e que, tampouco, apresentaram, após a formação da cavidade, a interação com filamentos citoplasmáticos, observada nas figuras B-15 e B-17. A literatura consultada não chama a atenção para esses fatos, os quais parecem ser bastante importantes para explicar a formação das projeções da parte interna da cavidade cistérnica, plenamente desenvolvidas em espermatídes alongadas de carrapatos.

Em espermatídes redondas de *B. microplus*, observou-se a formação de uma vesícula achatada, cujo aspecto modifica-se no decorrer da espermiogênese. Esta vesícula, identificada por REGER (1963) como sendo o acrossomo, origina-se acolada ao núcleo, sendo visível antes de iniciar a polarização nuclear. REGER (1963) afirma que o acrossomo forma-se somente após a polarização do núcleo, em *Amblyomma dissimili*. Resultados preliminares de estudos ultra-estruturais sobre a formação do espermatozóide em *B. microplus* mostram que esta vesícula mantém-se acolada ao canal acrossômico, associando-se também ao núcleo. A localização desta vesícula, em espermatídes polarizadas, coincide com a da vesícula PAS-positiva identificada nesta região em microscopia de luz. Isto corrobora a sugestão de REGER (1963) de que essa vesícula se trate de um possível acrossoma em formação.

Uma característica peculiar à espermiogênese em *B. microplus* é a assincronia nas modificações ocorridas em espermatídes tardias de um mesmo cisto. As figuras B-09 e B-16 ilustram bem este fato, mostrando, no mesmo cisto, diferentes estágios de agregação cistérnica. Não encontramos registros deste fato relatado em trabalhos sobre espermiogênese de carrapatos, nem em outros organismos. Via de regra, a espermatogênese cística caracteriza-se pela

sincronia nas modificações sofridas pelas células da linhagem gamética (SNODGRASS, 1935). Foram observadas pontes citoplasmáticas-que auxiliam a manter a sincronia na espermiogênese até o estágio de espermátide polarizada. Contudo, essas estruturas não foram registradas após o início da formação de agregados terciários e quaternários de cisternas, o que poderia contribuir para uma dessincronia no processo de maturação dessas espermátides. Também o fato de encontrarem-se restos celulares na porção final do testículo (DUMSER & OLIVER, 1981) poderia explicar o destino de espermátides que não encontravam-se suficientemente maduras no momento da ruptura do cisto (ou seja, no início do alongamento).

5.3. Espermiogênese: fases finais.

O alongamento de espermátides dá-se a partir da invaginação da cavidade cistérnica; é acompanhado por lateralização do núcleo, corresponde ao processo denominado por SULEIMAN & BROWN (1978) como invaginação. A presença de espermatozóides móveis evertidos também foi constatada somente no organismo feminino. OLIVER (1991) afirma que uma vantagem adaptativa na deposição de espermátides alongadas na fêmea, ao invés de espermatozóides, é o fato de que, dessa forma, ocorre a introdução de um maior número de gametas, garantindo uma maior chance de fertilização. Outra vantagem seria a possibilidade de carregar-se algum mediador químico na cavidade cistérnica, o qual teria atividade no organismo feminino (OLIVER & DOTSON, 1993). Em nosso trabalho, empregamos na fixação ácido pícrico. Esta substância aumenta o contraste do material, especialmente em áreas que, conforme citamos, ocorre a detecção de açúcares neutros. A densidade apresentada pelo material, em cortes ultra-finos, reforça as sugestões sobre o conteúdo da cavidade, bem como suas prováveis funções.

Em nosso trabalho, uma análise inicial revela alterações ultra-estruturais nas cisternas subsuperficiais. Observa-se, nas primeiras fases da espermiogênese, o crescimento progressivo dessas estruturas. O desenvolvimento do eixo fibroso elétron-denso, provavelmente protéico, no interior das vesículas cistérnicas corresponde à formação de "processos celulares". Esta denominação foi criada por REGER (1961), e adotada por SULEIMAN & BROWN (1978) e EL-SHOURA (1986), para a descrição de projeções internas da membrana da cavidade cistérnica. As projeções, nos espermatozóides, encontram-se na superfície externa. REGER (1974) e PINKERTON *et al.* (1982) sugerem que essas projeções sejam responsáveis pela geração de movimento nos espermatozóides de carrapatos. Pelo observado em espermatozóides de *B. microplus* (NORMANN & DOLDER, 1997b), ocorre a associação dessas projeções com elementos de citoesqueleto. Essas observações são coerentes com o descrito por WITALIŃSKI & DALLAI (1994), em *Argas polonicus*, onde foi constatada a presença de actina como

responsável pela movimentação desses gametas. Estes autores também descreveram, em espermátides alongadas, a presença de actina-F na proximidade da cavidade cistérnica. Em nosso trabalho, observamos uma zonação no citoplasma do tubo externo e cilindro interno, sendo constatada a presença de material filamentosso na borda dessa mesma área, em espermátides alongadas de *B. microplus*. Também se justifica a presença de actina nessa região da espermátide, uma vez que trata-se de uma área onde ocorre intensa remodelagem.

Também foram encontrados, no citoplasma de espermátides alongadas de *B. microplus*, filamentos tipo intermediários. Filamentos intermediários estão ligados à manutenção da forma de células, principalmente daquelas submetidas a estresses mecânicos (ALBERTS *et al.*, 1994; GALOU *et al.*, 1997). A presença desses filamentos nas espermátides alongadas e, posteriormente, nos espermatozóides de *B. microplus* pode ser, portanto, atribuída a essa função. Assim, enquanto os microfilamentos agiriam, nestas células, no sentido de promover a invaginação da cavidade cistérnica e o alongamento da célula e posterior movimentação do espermatozóide, os filamentos intermediários manteriam a forma alongada das espermátides.

As descrições sobre a eversão em espermátides de carrapatos geralmente citam a ruptura de um opérculo, o qual permite que haja escoamento do conteúdo da cavidade cistérnica (SONENSHINE, 1991). O opérculo foi observado em *B. microplus*. Em *Amblyomma dissimili* (REGER, 1963), *Argas arboreus* (EL-SHOURA, 1987), *Dermacentor andersoni* (BRINTON *et al.*, 1974) e *Dermacentor variabilis* (SULEIMAN & BROWN, 1978), não foi observado o opérculo. BORUT & FELDMAN-MUHSAM (1976) descrevem, contudo, o opérculo em muitos Ixodidae e Argasidae, afirmando ainda que sua forma é espécie-específica. De fato, o opérculo achatado e assimétrico de *B. microplus* é bastante diverso do opérculo aciculado, apresentado por BORUT & FELDMAN-MUHSAM (1976) para *Haemaphysalis otophila*. Em *B. microplus*, como observamos, o opérculo tem formato de escudo, com algumas semelhanças ao descrito por PINKERTON *et al.* (1982) para *O. moubata*. A formação do opérculo em espermátides de carrapatos parece ser um processo bastante rápido, sendo esta uma estrutura aparentemente de curta duração, situada em área muito restrita da espermátide alongada. Essas razões possivelmente levaram a que essa estrutura não tivesse sido bem documentada pela literatura que consultamos. Também não foi possível visualizar etapas que levassem claramente à formação desta estrutura. Contudo, pela sua morfologia, sua função dentro da espermiogênese parece seguir a descrição anterior feita por BORUT & FELDMAN-MUHSAM (1976), ou seja, de ser um ponto onde a ruptura da membrana da espermátide é facilitada, para que ocorra a eversão.

A presença do opérculo não foi citada para todos os carrapatos. Em *Amblyomma dissimili* (REGER, 1963), *Argas arboreus* (EL-SHOURA, 1987), *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1902) (BRINTON *et al.*, 1974) e *Dermacentor*

variabilis (Say) (SULEIMAN & BROWN, 1978), esta estrutura não é descrita. O fato de não ser descrito o opérculo para todas as espermátides de carrapatos leva a sugerir que podem existir dois mecanismos de eversão: um deles, desencadeado pela ruptura de um opérculo, como em *B. microplus*. O outro mecanismo de eversão, como nos carrapatos citados, pode ser desencadeado por uma fusão de membranas, a qual permite a eversão e o alongamento da espermátide, e com isso, a formação do espermatozóide. A eversão, de acordo com OLIVER & BRINTON (1973), BORUT & FELDMAN-MUHSAM (1976) e WÜEST *et al.* (1978), ocorre a partir de uma ruptura na região do tubo externo, na porção terminal da espermátide, que permite passagem do cilindro interno durante o alongamento. A extrusão da "cabeça" do espermatozóide em carrapatos possivelmente se dê a partir de um aumento de pressão sobre a célula, o que leva, em *B. microplus*, à ruptura do opérculo e alongamento da espermátide. Ao que se sugere, esta pressão seria exercida pela musculatura da espermateca, útero e oviduto, sendo ampliada pela grande quantidade de espermátides presentes na espermateca (GARCIA, C. *et al.*, 1996; KAKUDA *et al.*, 1997).

A distribuição de mitocôndrias, na espermátide alongada de *B. microplus*, parece seguir um padrão observado para todos os carrapatos estudados. SULEIMAN & BROWN (1978) afirmam que a maior parte dessas organelas encontram-se no cilindro interno, embora poucas ocorram no tubo externo. Em nosso trabalho, também observamos mitocôndrias não somente no cilindro interno, como também no tubo externo, em menor quantidade. A distribuição das mitocôndrias nas espermátides alongadas, contudo, coincide com a observada em cortes ultra-finos de espermatozóides. Foram observadas mitocôndrias mais esparsas na região de invaginação, imersas na malha de filamentos tipo intermediários. As mitocôndrias encontradas no tubo externo encontravam-se isoladas pelos filamentos, em posição similar à ocupada em espermatozóides. Essas observações sugerem que a porção posterior do espermatozóide seja originada pelo tubo externo, enquanto que o cilindro interno origina a região anterior do gameta masculino.

A morfologia do núcleo de espermátides modifica-se bastante durante a espermiogênese. Em espermátides redondas polarizadas, observa-se o mesmo contorno irregular do envelope nuclear que notamos nos núcleos de espermátides alongadas que ainda não encontram-se devidamente alocados no tubo externo. A mudança na forma do núcleo é citada por EL-SHOURA (1986, 1987), para *Ornithodoros (P.) erraticus* (Lucas) e para *A. (P.) arboreus*, e por SONENSHINE (1991), em sua revisão.

Em espermátides na qual o núcleo encontrava-se no tubo externo, observamos um padrão de compactação de cromatina bastante interessante. Esses núcleos, além da cromatina compacta e homogênea próxima ao envelope, possuem um tipo de eixo cromatínico, formado a partir de uma estrutura espiralizada central (fig. 09, 11 e 14). Este "eixo" é descrito no núcleo

de espermatozóides de *Amblyomma hebraeum*, (Koch, 1844) por EL-SAID *et al.* (1981), sendo denominado como "bastão", por esses autores. Sua função, segundo esses autores, seria de participar na ligação do núcleo ao canal acrossômico. Uma vez que não observamos essa estrutura em espermatozóides, acreditamos que a formação deste eixo cromatínico estaria mais relacionada à mudança de forma do núcleo que a outras funções.

Observamos, associada à membrana plasmática das espermátides, a presença de uma cisterna achatada, bastante elétron-densa. Pelo posicionamento inicial, esta cisterna parece derivar da vesícula achatada, densa, supra-nuclear, que observamos em espermátides redondas em *B. microplus*. Estas vesículas achatadas, ao microscópio de luz, revelaram conteúdo altamente rico em polissacarídeos neutros (ver Capítulo I). Segundo REGER (1962, 1974), EL-SAID & SWIDERSKI (1980), EL-SHOURA (1986, 1987), SONENSHINE (1991) e OLIVER (1991), esta cisterna constitui-se na vesícula pré-acrossomal dos carrapatos estudados. Contudo, os autores não apresentam justificativas maiores para denominar assim esta estrutura. Em nosso trabalho, também não empregamos técnicas de citoquímica ultra-estrutural que auxiliassem a comprovar (ou não) ser esta vesícula (que posteriormente assume a forma de uma cisterna) o precursor do acrossomo. Contudo, pode-se sugerir que essa "cisterna" auxilie na formação do futuro canal acrossômico, uma vez que ela coincide em forma e densidade com a estrutura encontrada revestindo paralelamente este canal, em espermatozóides. De acordo com EL-SAID & SWIDERSKI (1980), em *A. hebraeum*, esta vesícula auxiliaria na formação do canal acrossômico, orientando a invaginação da membrana plasmática. A posição da "cisterna" descrita abaixo da membrana plasmática de *B. microplus* corrobora a afirmativa desses autores.

Como nos demais carrapatos, em *Boophilus microplus* os espermatozóides propriamente ditos (ou espermióforos, segundo OLIVER, 1991) são encontrados somente no organismo feminino. Uma vez que a espermiogênese de carrapatos é interrompida no estágio de espermátide alongada (ou prospérnia) no organismo masculino, ela será reiniciada somente após a cópula, com a introdução do espermatóforo no receptáculo seminal (KAKUDA *et al.*, 1997). Espermatóforos com espermátides alongadas são encontrados no receptáculo seminal de fêmeas copuladas. Conforme observações preliminares, em fêmeas recém-copuladas (neóginas e partenóginas menores), a população de células gaméticas masculinas da espermateca e ovidutos apresenta-se mais homogênea, sendo a presença de espermatozóides constatada somente no oviduto. Em fêmeas que copularam há mais tempo (partenóginas e teleóginas), mantidas mais de 24 horas sem repasto sanguíneo, notou-se a presença de espermatozóides também na espermateca (GARCIA, S. *et al.*, 1987; NORMANN *et al.*, 1993). A presença de espermatozóides na espermateca é creditada ao fato de que secreções produzidas por esta estrutura desencadeiem o processo de alongamento (SULEIMAN & BROWN, 1978; KAKUDA *et al.*, 1997).

5.4. O espermatozóide:

Os espermatozóides encontrados no oviduto são de formato de remo. Eles assumem essa forma após ruptura de opérculo, extrusão do conteúdo da cavidade cistérnica e subsequente alongamento da célula, o qual se dá pela adição e acomodação de uma "reserva de membrana" na qual se constitui a membrana da cavidade (BRINTON *et al.*, 1974; BORUT & FELDMAN-MUHSAM, 1976; EL-SAID *et al.*, 1981; EL-SHOURA, 1986; FELDMAN-MUHSAM & FILSHIE, 1976; KHALIL, 1969; PINKERTON *et al.*, 1982; REGER, 1963; SAHLI *et al.*, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1982; WÜEST *et al.*, 1978).

Em *B. microplus*, a locomoção do espermatozóide se dá por movimentos de torção e avanço da célula: os movimentos de torção são auxiliados por projeções de citoplasma preenchidas por elementos de citoesqueleto. O movimento se dá em sentido oposto à posição do núcleo, uma vez que a onda de movimento é gerada no sentido do avanço da "cabeça". A locomoção auxiliada por projeções celulares, expansões protoplasmáticas ou processos celulares, contudo, não é exclusividade de espermatozóides de carrapatos. Em *whitefly* (Homoptera), observam-se projeções celulares, de natureza diferente das observadas em *B. microplus*, as quais se formam à medida em que o espermatozóide alonga (BÃO *et al.*, 1997). Em *Gregarina* (Protozoa: Sporozoa) observam-se dobramentos na superfície celular, os quais servem para contatar com o substrato, gerando um tipo de movimento que sugere ser actina-miosina dependente (PRESTON *et al.*, 1990).

Em espermatozóides de *B. microplus*, foram observados, no citoplasma, dois tipos de filamentos. Os filamentos de 10 nm, pela espessura, sugerimos que sejam filamentos tipo intermediário. Filamentos mais delgados foram localizados na região cortical e na porção anterior do espermatozóide. Em nosso trabalho, constatamos diferença entre as projeções da futura região anterior do espermatozóide (ou seja, no ponto de invaginação da cavidade cistérnica) e do restante da célula. Essas projeções são descritas como pertencendo a um "órgão motor", por REGER (1962), em *Amblyomma dissimili*. Já EL-SAID & SWIDERSKI (1980), analisando as regionalizações da membrana plasmática de espermatozóides de *A. hebraeum*, descrevem esta porção como sendo um "hemisfério tátil". As projeções da porção anterior caracterizam-se pelo tamanho maior que o apresentado pelas do restante da membrana da cavidade cistérnica (e, posteriormente, do espermatozóide). Aparentemente, essa região agiria como um "direcionador" do movimento, levando o gameta a avançar pelo oviduto. Contudo, não observamos características morfológicas ou ultra-estruturais que realmente confirmem esta hipótese.

No carrapato Argasidae *Argas polonicus*, os mesmos tipos de movimentos descritos para *B. microplus* são atribuídos à presença de filamentos de actina,

localizados em todo o espermatozóide, em especial na extremidade anterior e revestindo internamente a área das projeções citoplasmáticas (WITALIŃSKI & DALLAI, 1994). Observações preliminares em espermatozóides de *B. microplus* revelam possível reação positiva a anticorpos monoclonais anti-actina, em microscopia de luz (não documentado aqui), o que reforça as observações realizadas a nível ultra-estrutural. O aspecto filamentosso do citoplasma cortical, bem como a presença de material filamentosso junto às projeções, sugeriu a presença desta classe de filamentos nesta área do espermatozóide. Sobre os filamentos intermediários, eles estão ligados à manutenção da forma de células, principalmente daquelas submetidas a estresses mecânicos (ALBERTS *et al.*, 1994; GALOU *et al.*, 1997). A presença desse tipo de filamento nos espermatozóides de *B. microplus* pode ser, portanto, atribuída à função de manter a forma da célula.

Observamos, ao microscópio eletrônico de transmissão, a presença de dois tipos de projeções celulares; um tipo encontrado na extremidade anterior, internamente homogêneo, e outro tipo, presente ao longo de praticamente todo o espermatozóide, igual ao encontrado na face interna da cavidade cistérnica de espermátides alongadas. REGER (1963) registrou, em *Amblyomma dissimili*, um terceiro tipo de projeção, situado entre a extremidade anterior e o corpo do espermatozóide, que não foi observado em nosso trabalho. As projeções celulares de espermatozóides em carrapatos são associadas ao movimento e, no caso das encontradas na região anterior, lhes são atribuídas funções motoras, por REGER (1962), em *Amblyomma dissimili*, e táteis, por EL-SAID & SWIDERSKI (1980), analisando regionalizações da membrana de espermatozóides de *A. hebraeum*. Em nossas observações, contudo, não encontramos elementos para amparar estas afirmações. Contudo, pode-se sugerir, pelo padrão de movimento demonstrado por espermatozóides *in vivo*, e pelo registro em microscopia eletrônica de varredura, que essa área está ligada ao processo de movimento do espermatozóide. A microscopia eletrônica de varredura e as preparações a fresco demonstraram que o espermatozóide avança realizando movimentos tipo torção. Este tipo de movimento já havia sido observado por ROTHCHILD (1961), em *Ornithodoros sp.*. No caso de *B. microplus*, a estrutura do espermatozóide, com um "eixo" rico em filamentos intermediários no centro da célula, e microfilamentos ao longo da zona cortical, associando com as projeções, sugere que haja uma interação entre estes componentes, levando assim à propulsão do gameta.

As mitocôndrias observadas nos espermatozóides de *B. microplus* não encontram-se associadas de forma alguma, concentradas em um pólo da célula, nem tampouco encontravam-se fusionadas na forma de um derivado mitocondrial (BACCETTI, 1978). BRINTON *et al.* (1974) registraram, em *Dermacentor andersoni*, a presença de mitocôndrias localizadas somente na região interna do espermatozóide. EL-SAID & SWIDERSKI (1980), em *Amblyomma hebraeum*, afirmam que estas organelas encontram-se usualmente agrupadas junto à extremidade em forma de remo do espermatozóide. Em *B.*

microplus, ocorrem mitocôndrias não somente nesta porção, como também no limite entre a região cortical e a região interna, ao longo da porção média e posterior do espermatozóide. A ausência de um axonema e o fato de ocorrer movimento baseado em microfilamentos, o qual é gerado ao longo de praticamente todo o espermatozóide, levam à necessidade de uma localização mais amplamente distribuída dessas organelas ao longo do citoplasma, como, de fato, ocorre em *B. microplus*.

O núcleo encontra-se em grau de compactação consideravelmente maior que em espermátides alongadas. Devido à diferença na morfologia nuclear entre espermátides e espermatozoides em *B. microplus*, pode-se afirmar que, na maturação do espermatozóide, além da eversão da cavidade cistérnica, ocorra uma compactação maior da cromatina, como ocorre em praticamente todas as espécies (ALBERTS *et al.*, 1994). Foi observado um tipo de segundo envelope, formado por membranas mais ou menos concêntricas, externo ao envelope nuclear convencional e com aparentes ligações com o canal acrossômico. Este tipo de envoltório perinuclear seria relacionado com a dinâmica de fertilização nesses organismos (PINKERTON *et al.*, 1982; SONENSHINE, 1991; GARCIA, C., com. pes.).

Uma interessante característica de espermatozoides de *B. microplus* e de outros carrapatos é a disposição de uma vesícula achatada, de conteúdo elétron-denso, intimamente ligada ao canal acrossômico. Este canal, em *B. microplus* aparentemente deriva da invaginação da superfície externa da espermátide, sendo rodeado por uma vesícula elétron-densa supra-nuclear, que, em espermátides em polarização, apresenta reação PAS-positiva. Durante a lateralização do núcleo, alongamento da célula e invaginação da membrana plasmática da espermátide, esta vesícula assume sua forma e posicionamento, de revestimento intracitoplasmático da membrana plasmática, análogo àquele que é visualizado nos espermatozoides, revestindo o canal acrossômico. WÜEST *et al.* (1978), analisando a espermiogênese de *Amblyomma hebraeum*, descreve a formação do canal acrossômico também a partir da invaginação da membrana da espermátide. EL-SAID & SWIDERSKI (1980), em *A. hebraeum*, afirma que a vesícula supra-nuclear irá formar um acrossomo, o qual é paralelo ao canal acrossômico; esses autores também creditaram a formação do canal acrossômico à invaginação da membrana plasmática. EL-SAID (1992), observando espermatozoides em *Hyalomma marginatum*, também fez referência ao peculiar posicionamento do canal acrossômico. Esta forma do canal acrossômico em carrapatos levou-o a ser denominado por KHALIL (1969) como "flagelo", e por SULEIMAN & BROWN (1978) "filamento interno". Esta denominação deve-se ao fato de haver uma pequena evaginação do canal, de acordo com o descrito por PINKERTON *et al.* (1982) em espermatozoides de *Ornithodoros moubata* (Murray, 1877). Esta evaginação aparentemente está relacionada à exposição do acrossomo e núcleo ao gameta feminino, para que ocorra a fecundação (PINKERTON *et al.*, 1982; SONENSHINE, 1991; GARCIA, C., com. pes.). Contudo, esta modificação não havia sido observada por WÜEST

et al. (1978), em espermatozoides de *A. hebraeum*, os quais aparentemente guardam sua forma e contornos sem alterações. Pelas técnicas empregadas, não se pode afirmar ser a vesícula associada ao chamado canal acrossômico, de fato, um acrossomo. Observações posteriores deverão elucidar esta questão.

A presença de uma estrutura que possa-se sugerir tratar-se de precursor do canal acrossomal não foi constatada em todos os carrapatos estudados. EL-SHOURA (1987) também atribui a origem do canal acrossomal em *Argas (Persicargas) arboreus* (Kaiser, Hoogstraal & Kohls, 1968) à retração e invaginação da membrana plasmática da espermátide. REGER (1961, 1962, 1963) descreveu a formação deste canal em *Amblyomma dissimili*. BREUCKER & HORSTMANN (1972) também o localizaram, atribuindo sua origem aos corpos multi-vesiculares vindos do complexo de Golgi. Ocorreu identificação de uma vesícula pré-acrossomal em *B. microplus* e em *A. dissimili*; estes carrapatos pertencem a duas subfamílias distintas, respectivamente Rhipicephalinae e Amblyomominae, ambas Metastriata. Ocorre alguma identidade, comparando-se dados obtidos de análise molecular, entre estes dois grupos (CRAMPTON *et al.*, 1996). Pode-se sugerir, portanto, que esta característica é própria de Metastriata. EL-SHOURA (1986), no Argasidae *Ornithodoros (Pavlovskiella) erraticus* não identificou nenhuma estrutura pré-canal acrossomal em espermátides.

O canal acrossômico foi descrito por ALBERTI (1980) em ácaros Anachtinotrichida (= Parasitiformes). Nesses organismos, ele também aparece derivado da invaginação da superfície externa das espermátides alongadas. ALBERTI (1980) afirma que o canal encontra-se associado a um acrossomo achatado, comum a todos os Anachtinotrichida. O acrossomo descrito por esse autor é assemelhado ao descrito por EL-SAID & SWIDERSKI (1980). Contudo, a afirmativa desses autores deixa dúvidas, uma vez que não há, nos trabalhos, descrição de atividade enzimática, que comprove que essa vesícula seja, de fato, o acrossomo.

JUBERTHIE & MANIER (1978) descrevem uma estrutura similar, denominada como "bengala acrossômica", em Opiliones da sub-ordem Cyphophthami e das famílias Trogulidae e Ischyropsalidae, da sub-ordem Palpatores. Algumas filogenias aproximam Opiliones a Acarina (ALBERTI, 1995) a partir de uma série de características, entre elas critérios espermatólogicos. Na outra subordem de Opiliones (Laniatores), não observa-se este tipo de canal acrossômico, mas também não ocorre, como em Ixodida, a formação de axonema (JUBERTHIE & MANIER, *op. cit.*); neste grupo, é interessante observar que a superfície externa do espermatozoide é recoberta por inúmeras projeções citoplasmáticas, lembrando, a grosso modo, o que ocorre em Ixodida (MENEGETTI, *com. pes.*).

Durante a eversão, o canal acrossômico encontra-se associado ao núcleo, ou seja, assume uma posição posterior em relação à célula gamética.

Em geral, o acrosso ou estruturas tipo-acrosso aparecem em posição anterior, supra-nucleares (BACCETTI, 1972). Contudo, o próprio núcleo do espermatozóide de *B. microplus* apresenta posicionamento retrógrado em relação ao sentido de movimento do gameta. Segundo PINKERTON *et al.* (1982), ocorre uma extrusão de parte do canal acrossômico, permitindo contato do acrosso e núcleo com o ovócito na fertilização. Observações sobre a atividade enzimática (se houver) nessa organela se fazem, futuramente, necessárias à compreensão do exato papel desta estrutura, posto que, na bibliografia consultada, não há nada que, de fato, justifique a denominação de acrosso.

Os espermatozóides observados são similares àqueles de ácaros Anactinotrichida (ALBERTI, 1980; 1995). Como tal, não apresentam estruturas motoras do tipo flagelo ou cílios. Em outros grupos de Acarina, notadamente em Anactinotrichida, também encontramos a deposição, na fêmea, de espermátides vacuolizadas, com o aparecimento de processos motores evertidos na fêmea. Entre os ácaros que apresentam a formação de espermátide vacuolizada, encontram-se as ordens Opiliacarida e Gamasida (famílias Uropodidae, Epicriidae e Zerconidae). Nesses ácaros, também encontramos a transferência de gametas via espermatóforo, bem como a ausência de um axonema. O modelo de deposição de espermátides vacuolizadas em lugar de espermatozóides apresenta pelo menos duas vantagens: a possibilidade de estocarem-se mais gametas na espermateca e a possibilidade de transporte e liberação, na fêmea, de substâncias fisiologicamente ativas (SHEPHERD *et al.*, 1982a, 1982b; ALBERTI, 1980; 1995). A perda do axonema pode ter ocorrido, em parte, devido à aquisição da fertilização via espermatóforo. A ausência do axonema é também observada em outros Acarina (WITALIŃSKI, 1975, 1976; WITALIŃSKI *et al.*, 1986; WITALIŃSKI & DALLAI, 1993).

Espermatozóides em Chelicerata têm morfologia amplamente variada. Este táxon é muito antigo, tendo divergido dos demais Arthropoda no período Cambriano inicial. Logo, é de se esperar que, ao longo da evolução, tenham ocorrido amplas variações morfológicas, entre elas nos espermatozóides (ALBERTI, 1980; 1995). Uma ferramenta interessante para entender-se esse modelo evolutivo é, pois, a espermatologia.

6. Agradecimentos:

Esta é a parte mais delicada da Tese. E se deixo alguém de fora? Sim, pois ir ao estábulo (quase levando coices de vacas pouco colaboradoras), fazer as disseções, fixações e inclusões, cortar e/ou montar o material para varredura, fotografar, revelar e copiar, correr atrás de bibliografia, escrever, mandar resumo pra congresso, tudo isso é sua obrigação, como Mestrando. Mas sempre tem gente que aparece no caminho, e ajuda a deixar essa tarefa mais fácil, até divertida. Caso de minha orientadora, a dra. M.A. Heidi Dolder, que aceitou o desafio de orientar (mais) um gaúcho doido que aparece na sala dela com uma idéia, tão insana quanto, de estudar carrapato de bovino. Valeu, *frau* Heidi!

Aos professores Ângelo P. do Prado, Maria Lúcia Furlan Wada e Irani Quaggio-Grassiroto pela competente pré-banca, em especial pelas valiosas contribuições a esta tese (ou dissertação?). É bom incorporar à essência da obra um pouco da experiência de mãos amigas.

À CAPES, que permitiu que eu ficasse em um laboratório, graças à bolsa concedida.

Ao pessoal das Microscopias Eletrônicas, pelo uso de equipamentos e instalações: NAPI, da ESALQ, de Piracicaba (gracias, prof. Kitajima), quanto no Centro de ME da UNICAMP (obrigado, prof. Paulo Joazeiro e gurias) e o "falecido" NIDEME do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (valeu, prof. Schneider).

No início deste texto, falei nos estábulos, que desempenharam função óbvia neste trabalho. Agradeço à Fazenda Jatibaia, à Fazenda Santo Antônio, ao pessoal de Viamão e à aluna da graduação em Ciências Biológicas no IB/UNICAMP, Daniela, pela matéria-prima concedida. Não é bajulação inútil dizer que, sem eles, a Tese não saía do chão.

À UNICAMP, através do Departamento de Biologia Celular, que me forneceu a estrutura para transformar o sonho em trabalho. Ao bando de pirados que ousa fazer *Ciência em um país como o nosso*. Aos colegas e professores da Pós-Graduação, valeu a força (e eventuais cervejinhas). Também aos estagiários e funcionários deste departamento deixo meu agradecimento. Desse povo, um abraço carinhoso na Lucimara Meneghetti, que me mostrou que, um dia, vou até poder (quem sabe) orientar alguém.

A três pessoas desta cidade que quero agradecer em especial. Às "tias" Polyanna da Silva Puglia e Janice Bicudo de Faria, respectivamente pela hospedagem na época da seleção e pela preocupação maternal com este marmanjo que vos escreve, e à sempre amiga Tatiana Feijó, por me lembrar do RS e de nossos amigos em comum, em nossas conversas.

Aos profs. Sonia e Casimiro Garcia, pelo "empurrãozinho" inicial, palavras de apoio e amizade, sempre presentes.

Finalmente, tem o pessoal lá de casa (família, Rosi e amigos). Valeu o apoio, a torcida, a oração, as ligações, cartas e e-mails. E, enfim, agradeço a Deus por tudo o que há para agradecer.

Este trabalho é dedicado à memória de Édson Mottola Peralta, que me deu a honra de chamá-lo de "tio" durante sua convivência com nossa família.

7. Referências Bibliográficas:

- Alberti, G. Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiocyto-genese der Milben (Acari). I. Anactinotrichida. **Zool. Jb. Anat.** **104**: 77-138, 1980.
- _____. Spermatology in the Acari: systematic and functional implications. In: G.P. Channa Baswavanna; C.A. Viraktamath, **Progress in Acarology**. New Delhi, Oxford ; IBH Publishing. I: 197-204, 1991.
- _____. Comparative Spermatology of Chelicerata: Review and Perspective. In: Jamieson, B.G.M., Ausio, J.; Justine, J.L. (eds.), **Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy**. Paris: Mém.Mus. Natn. Hist. Nat., **166**: 203-230, 1995.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed. New York ; London: Garland. 1994
- Andrade, L.E.C.; Tan, E.M.; Chan, E.K.L. Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. **Proc.Natl.Acad. Sci.** **90**:1947-1951, 1993.
- Aybar M.J.; Genta, S.B.; Villecco, E.I.; Riera, A.N.; Sanchez, S.S. Amphibian *Bufo arenarum* vitronectin-like protein: its localization during oogenesis. **Int. J. Dev. Biol.** **40**(5):997-1008, 1996.
- Balashov, Y. A translation of Bloodsucking ticks: vectors of disease of man and animals. **Misc. Pub. Entomol. Soc. Am.** **8**:160-376, 1972.
- _____. Importance of Continental Drift in the Distribution and Evolution of Ixodid Ticks. **Entomol. Rev.** **73**(8): 42-50, 1994.
- Báo, S.N.; Kitajima, E.W.; Callaini, G.; Lupetti, P.; Dallai, R. Spermiogenesis in three species of Whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). **Acta Zoologica (Stock.)** **78** (2):163-170.
- Baccetti, B. Insect Sperm Cells. **Adv. Insect Physiol.** **9**: 315-397, 1972.
- Bawa, S.R.; Werner, G. Cyst and Flagellar Sheat Formation in *Diplotemnus* sp. Spermiogenesis. **J. Ultrastruc. Molec. Struct. Res.** **101**: 51-61, 1988.
- Berlese, A. **Gli Insetti: loro organizzazione, sviluppo, abitudini e rapporti coll'oumo**. Vol. 1: **Embriologia e Morfologia**. Milano: Soc. Editr., 1909.

- Bier, K., Kuntz, W.; Ribbert, D. Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der extra DNS während der oogenese panoistischer und meroistischer Insekten. **Chromosoma** 23: 214-254, 1967.
- Bonnet, A. Sur les organes génitaux males et la spermatogénèse chez les *Ixodes*. **Compte. Rendu De L'Association Française Pour L'Avancement Des Sciences**, 35 (Lyon, 1906): 544-549. 1907.
- Bowmann, A.S.; Dillwith, J.W.; Sauer, J.R. Tick Salivary Prostaglandins: presence, origin and significance. **Parasitol. Today** 12(10): 388 -396, 1996.
- Borut, S.; Feldman-Muhsam, B. A new observation on spermateleosis in Ticks. **J. Parasitol.** 62(2): 318-320, 1976.
- Breucker, H.; Horstmann, E. Die Spermatogenese der Zecke *Ornithodoros moubata* (Murr). **Zeitsch. Zellforsch.** 123: 18-46, 1972.
- Brinton, L.P.; Burgdofer, W.; Oliver, J.H. Jr. Histology and fine structure of Spermatozoa and egg passage in the female tract of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari, Ixodidae). **Tissue & Cell** 6: 109-125. 1974.
- Brinton, L.P.; Burgdofer, W.; Oliver, J.H.Jr. Histology and fine structure of Spermatozoa and egg passage in the female tract of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari, Ixodidae). **Tissue & Cell** 6: 109-125, 1974
- Casteel, D.B. Cytoplasmatic inclusions in the male germ cells of the fowl tick *Argas miniatus* and his histogenesis of the spermatozoon. **J. Morphol.** 28:643-666, 1917.
- Clark, D.; Russel, L.D. **Molecular Biology made simple and fun**. 1 ed. Viena, IL. Cache River. 1997. Christophers, S. R. The anatomy and histology of ticks. **Scient. Mem. Med. San., Dept. India**, 23. 1906.
- Crampton, A; McKay, I.; Barker, S.C. Phylogeny of Ticks (Ixodida) Inferred from Nuclear Ribossomol DNA. **Int. J. Parasitol.** 26(5): 511-517, 1996
- De Wilde, J. Reproduction. In: M. Rockstein, **The Physiology of Insecta, Vol. I**. New York and London, Academic Press. 1964.
- Dumser, J.B.; Oliver, Jr., J.H. Kinetics of spermatogenesis in the adult tick, *Dermacentor variabilis*. **J.Insect Physiol.** 27 (10): 681-688, 1981.
- _____. Kinetics of spermatogenesis, cell-cycle analysis and testis development in nymphs of the tick, *Dermacentor variabilis*. **J.Insect Physiol.** 27 (11): 681-688, 1981.

- Durden, L.A.; Keirans, J.E. Host-parasite coextinction and the plight of tick conservation. **Am. Entomol.** **42(2)**: 87-91, 1996.
- El Said, A.; Swiderski, Z.; Aeschlimann, A.; Diehl, P.A. Fine structure of spermiogenesis in the tick *Hyalomma hebraeum* (Acari: Ixodidae): Late stages of mature spermatozoon. **J. Med. Entomol.** **18**: 464-476, 1981.
- _____; Swiderski, Z. Regional specialization of Sperm membrane in the Tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). **Cell & Tissue Res.** **208**: 35-45, 1980.
- _____. External morphology of the sperm of *Hyalomma marginatum* (Acarina: Ixodidae). **J. Egypt Soc Parasitol.** **22(3)**: 569-573, 1992.
- El Shoura, S.M. Fine structure of the sperm of the tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea, Argasidae). **J. Morphol.** **190**: 63-71, 1986.
- _____. Spermatogenesis ultrastructure in the tick *Argas (Persicargas) arboreus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae). **J. Med. Entomol.** **24**: 532-535, 1987.
- Fawcett, D.W.; Ito, S.; Slautterback, D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. **J. Bioph. Bioch. Cytol.** **5**: 453-460, 1959.
- Feldman-Muhsam, B.; Filshie, B.K. Scanning and transmission electron microscopy of the spermiophores of *Ornithodoros* ticks: an attempt to explain their motility. **Tissue & Cell** **8(3)**: 411-419, 1976.
- Fortes, E. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1993.
- Fudalewicz-Niemczyla; W. Kleszcz. Bydleczy *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) (Acarina, Ixodidae). **Wiadomosci Parazytologiczne T.** **39 (2)** 137-148, 1993.
- Gall, J.G.; Callan, H.G. The sphere organelle contain small nuclear ribonucleoproteins. **Proc.Natl.Acad.Sci.** **86**: 6635-6639, 1989.
- Galou, M. Gao; J.; Humbert, J.; Mericskay, M.; Li, Z.; Paulin, D.; Vicart, P. The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: Evidence from gene knockout studies. **Biol. of the Cell** **89**: 85-97, 1997.
- Garcia, C.F.; Garcia, S.M.L.; Heuser, M.C.F.. Regionalizações do oviduto de *Boophilus microplus*. **XX Congresso Brasileiro de Zoologia: Resumos**. Porto Alegre, UFRGS, 1996.

- Garcia, R.N. **Estudos cromossômicos em Meiose e Mitose de *Boophilus microplus* e análise de cariótipo por técnicas de bandeamento C, G e NOR.** Porto Alegre, 1993. Dissertação (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase Genética), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- _____; Garcia, C.F.; Garcia, S.M.L.; Valente, V.L.S. Comportamento cromossômico em meiose de machos de *Boophilus microplus* e análise do cariótipo pelas técnicas de bandeamento. In: **V Salão de Iniciação Científica, vol. 2.** Porto Alegre, UFRGS, PROPESP, 1993.
- Garcia, S.M.L., Garcia, C.F.; Silva, V. M. Morfoanatomia do aparelho reprodutor feminino de *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). **Acta Biol.Par.** **16** (1, 2, 3, 4): 1-13, 1987.
- _____; Jeckel-Neto, E.A.; Garcia, C.F. **Embriologia.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1991.
- Glauert, A.M. **Practical methods in Electron Microscopy: Fixation, dehydration and embedding of biological specimens.** Amsterdam: Elsevier. 1975.
- Guraya, S.S. The comparative Cell Biology of Accessory Somatic (or Sertoli) Cells in the Animal Testis. **Int. Rev. Cytol.** **160**: 163-220, 1995.
- Heller, C. Zur Anatomie von *Argas persicus*. **Sitzungsb. Kais. Akad.Wissensch., Wien**, **30**: 297-326, 1858.
- Hermo, L. Oko, R.; Morales, C.R. Secretion and Endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **Int. Rev.Cytol.** **154**: 105-190, 1994.
- Hinsch, G.W. Comparative organization and cytology of Sertoli Cells in Invertebrates. In Russel, L.D.; Griswold, M.D. (ed.) **The Sertoli Cell.** Clearwater, FL: Cache River, 1993.
- Howell, W.M.; Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** **36**: 1014-1015, 1980.
- Juberthie, C.; Manier, J.F. Étude Ultrastructurale Comparée de la spermiogenèse des Opilions et son Intérêt Phylétique. **Symp. Zool. Soc. Lond.** **42**: 407-416, 1978.

- Julio F^o, H. **Estudo da gametogênese de *Argas miniatus* (L.)**. São Paulo, 1978. Tese. (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo.
- Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** **27**: 137A, 1965.
- Khalil, G.M. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Gonad development and gametogenesis in *Argas (Persicargas) arboreus* Kaiser, Hoogstraal and Kohls (*Argasidae*). **J. Parasitol.** **55(6)**: 1278-1297, 1969.
- King, R.C.; Cassidy, J.D.; Rousset, A. The formation of clones of interconnected cells during gametogenesis in insects. *in* King, R.C. ; Akai, H. **Insect Ultrastructure**, v. I. New York, London: Plenum. 1982.
- Lamond, A. I.; Carmo-Fonseca, M. The coiled body. **Trends in Cell Biol.** **3**: 198-204, 1993.
- Lindquist, E.E. Current theories on the evolution of major groups of Arachnida with consequent implications for their classification. *In*: D. A. Griffiths; C.E. Bowman, **Acarology VI**, vol. 1. Chichester, Ellis Horwood: 28-62, 1984.
- Londt, J.G.H.; Spickett, A.M. Gonad development and gametogenesis in *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) (Acarina: Metastriata: Ixodidae). **Onderstepoor J. Vet. Res.** **43(3)**: 79-96, 1976.
- Meier, U.T.; Blobel, G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. **Cell**, **70**:127-138, 1992.
- Mello, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Rev.Bras.Genética** **20(2)**: 257-264, 1997.
- Messias-Jr., N.S. **Aspectos Ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomia megacephala* Fab. (Diptera: Calliphoridae)**. Campinas, 1990. Tese (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Nickerson, J.A.; Blencowe, B.J.; Penman, S. The Architectural Organization of Nuclear metabolism. *in* Berezney, R.; Jeon, K.W. (1995) **Nuclear Matrix - structural and functional organization**. San Diego: Academic. 1995.
- Nordenskiöld, E. Spermatogenesis in *Ixodes ricinus*. **Parasitol.** **6**: 159-166, 1920.

- Normann, C.A.B.M., Garcia, S.M.L.; Garcia, C.F. Desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino de *Boophilus microplus* (Can., 1887) em estágios pós-ninfais. III **Salão de Iniciação Científica, PROPESP-UFRGS**, 1993.
- _____; Dolder, M.A.H. Ultrastructural and histochemical features of testicular somatic cells in *Boophilus microplus*: Myoid and Cyst Cells (Can., 1887)(Acari, Ixodidae). **Braz. J. Morph. Sci.** **14(1)**: 139, 1997.
- Oliver, J.H. Jr. Symposium on Reproduction of Arthropods of Medical and Veterinary Importance. IV. Reproduction in Ticks (Ixodoidea). **J. Med. Entomol.** **11(1)**: 26-34, 1974.
- _____. Tick reproduction: sperm development and cytogenetics. In: Obenchain, F.D.; Galun, R. (ed.) **The Physiology of Ticks**. New York, Pergamon. 245-276, 1991.
- _____. Biology and systematics of ticks. **Ann. Rev. Ecol. System.** **20**: 397-430, 1994.
- _____; Brinton, L.P. Cytogenetics of Ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast Tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). **J. Parasitol.** **58 (2)**: 365-379, 1972.
- _____; Dotson, E.M. Hormonal control of molting and reproduction in ticks. **Am. Zool.** **33**: 384-396, 1993.
- _____; Osburn, R.L. Cytogenetics of Ticks (Acari, Ixodoidea): chromosomes and timing of Spermatogenesis in *Amblyomma inornatum*. **J. Parasitol.** **71(1)**: 124-126, 1985.
- Osburn, R. Davey, R.B.; Thompson, G.D. Spermatogenesis in *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **73**: 613-616, 1980.
- Pagenstecher, H.A. **Beiträge zur Anatomie der Milben, Heft 2, Ixodes ricinus**. Leipzig, W. Engelmann, 1861.
- Pinkerton, A.M.; Hall, J.D.; Shepherd, J. Scanning electron microscopy of post-ejaculatory spermiogenesis in the Tick *Ornithodoros moubata*. **Tissue & Cell** **14(4)**: 785-797, 1982.
- Pol, A.; Ortega, D.; Enrich, C. Identification and distribution of proteins in isolated endosomal fractions of rat liver: involvement in endocytosis, recycling and transcytosis. **Biochem. J.** **15**;323(Pt 2):435-443, 1997.
- Preston, T.M.; King, C.A.; Hyams, J.S. **The Cytoskeleton and Cell Motility**. Glasgow and London: Blackie; New York: Chapman & Hall. 1990.

- Reger, J.F. The fine structure of spermatids from the tick *Amblyomma dissimili* with special reference to the motile process. **J. Ultrastruct. Res.** **5**: 584-599, 1961.
- _____. The fine structure study of spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili* with special reference to the motile process. **J. Ultrastruct. Res.** **7**: 550-565, 1962.
- _____. Spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili*, as Revealed by Electron Microscopy. **J. Ultrastruct. Res.** **8**: 607-621, 1963.
- _____. The origin and fine structure of cellular processes in Spermatozoa of the tick *Dermacentor andersoni*. **J. Ultrastruct. Res.** **48**: 420-434, 1974.
- Rothschild, L. Structure and movement of tick spermatozoa. **Quat. J. Microscop. Sci.**, **102**: 239-248, 1961.
- Ruppert, E.E.; Barnes, R.D. **Zoologia dos Vertebrados**. 6 ed. São Paulo. Roca. 1996.
- Sahli, R.; Germond, J.E.; Diehl, P.A. *Ornithodoros moubata*: Spermateleosis and secretory activity of the sperm. **Experim. Parasitol.** **60**: 383-395, 1985.
- Sathananthan, A.H. Ultrastructure of the human egg. **Hum. Cell** **10 (1)**: 21-38, 1997.
- Sauer, J.R.; McSwain, J.L.; Bowman, A.S.; Essenberg, R.C. Tick Salivary Gland Physiology. **Ann. Rev. Entomol.** **40**: 245-267, 1995.
- Sharma, G.P. Studies on spermatogenesis in ticks. **Proc. Nat. Inst. Sci. India.** **10**: 305-316, 1944.
- Shepherd, J.; Levine, S.; Hall, J.D. Maturation of tick spermatozoa in vitro. **Int. J. Invert. Reprod.** **4**: 311-321, 1982a.
- Shepherd, J.; Oliver, Jr., J.H.; Hall, J.D. A polypeptide from male accessory gland wich triggers maturation of tick spermatozoid. **Int. J. Invert. Reprod.** **5**: 129-137, 1982b.
- Snodgrass, M. **Principles of insect morphology**. New York: McGraw-Hill. 1935.
- Sonenshine, D.E. **Biology of Ticks** v.1. Oxford: University Press. 1991.
- Suleiman, A.S.; Brown, G.G. Spermiogenesis in the dog tick *Dermacentor variabilis* (Say). **Iowa St. J. Res.** **53 (2)**: 93-108, 1978.

- Szöllözzi, A. Relationships between Germ and Somatic Cells in the Testes of Locusts and Moths. In: King, R.C.; Akai, H. **Insect Ultrastructure**, vol. I. New York-London, Plenum. 1982.
- Tsvetkovet, A.; Alexandrova, O., Bogolyubov, D. ; Gruzova, M. Nuclear bodies from cricket and mealworm oocytes contain splicing factors of pre-mRNA. **Eur. J. Entomol.** **94**: 393-407, 1997.
- Tuzet, O.; Millot, J. Recherches sur la spermiogenese des *Ixodes*. **Bull. Biolog. France Belgique.** **71**:190-205, 1937.
- Valdez, B.C.; Henning, D.; Le, T.V.; Busch, H. Specific aspartic acid-rich sequences are responsible for silver staining of nucleolar proteins. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, **207(2)**: 495-491, 1995.
- Valero, A.; Hueli, L.E.; Díaz-Sáez, V. Spermatogenesis in the ixodid Tick *Haemaphysalis (Herpetobia) sulcata* (Acarina: Ixodidae). **J. Parasitol.** **83(2)**: 212-214, 1997.
- Venable, J.H.; Coggeshal, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** **25**: 407-8, 1965.
- Voet, D.; Voet, J.G. **Biochemistry**. 2 ed. New York, John Willey & Sons. 1995.
- Witaliński, W. Spermatogenesis in free living mite, *Pergamasus viator* Halaš (Parasitidae, Mesostigmata). I. Fine structure of Spermatozoa. **Zeitsch. Mikrosk. Anatom. Forsch.** **89**: 1-17, 1975.
- _____. Spermatogenesis in free living mite, *Pergamasus viator* Halaš (Parasitidae, Mesostigmata). II. Spermiogenesis. **Zeitschr. Mikroskop. Anatom. Forsch.** **90**: 657-680, 1976.
- _____; Jonczy, J.; Godula, J. Spermatogenesis and sperm structure before and after insemination in two acarid mites, *Acarus siro* L. and *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Astigmata). **Acarologia** **27**: 41-51, 1986.
- _____; Dallai, R. F-Actin and Tubulin during Spermatogenesis in Gamasid Mites (Acari: Parasitina). **Acta Zoologica (Stock.)** **74(3)**: 205-214, 1993.
- _____. Actin in spermatozoon of a soft tick, *Argas (A.) polonicus* (Ixodida, Acari). **Folia Histochem. Citochem.** **45**: 257-264, 1994.
- Watson, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** **4** (4): 475-8, 1958.

Wüest, J.; El-Said, A.; Swiderski, Z.; Aeschlimann, A. Morphology of the Spermatid and Spermatozoon of *Amblyomma hebraeum* Koch (Acarina; Ixodidae). **Zeitsch. Parasitenk.** **55**: 91-99, 1978.

Wysoki, M.; Bolland, H.R. Spermatogenesis, chromosomes and sex determination in four *Rhipicephalus* species (Acari, Ixodidae) from East Africa. **Genetica** **48(3)**: 233-238, 1978.

_____. Timing of spermatogenesis, chromosomes and sex determination of *Amblyomma variegatum* and *A. lepidum* (Acari, Ixodidae). **Genetica** **50(1)**: 73-77, 1979.

Zhang, W. Y.; Zhu, X.X.; Oliver, Jr., J.H. Ecdysteroids and spermatogenesis in the fourth nymph of the tick *Ornithodoros parkeri*. **Invert. Reprod. Develop.** **27 (1)**:1-9, 1995.

