

ESTUDO DAS GLÂNDULAS SEXUAIS ACESSÓRIAS DO

APARELHO REPRODUTOR FEMININO DE

BOOPHILUS MICROPLUS (CAN.1887)(ACARINA:IXODIDAE)

TATIANA MONTANARI

Dissertação apresentada à Comissão Examinadora do  
Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Bacharel  
em Ciências Biológicas, ênfase Zoologia.

ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup> SÔNIA MARIA LAUER DE GARCIA

## AGRADECIMENTOS

À professora Sônia Maria Lauer de Garcia pela orientação e pelo carinho;

Ao professor Casimiro Garcia Fernandez pelo auxílio com as fotografias;

Às professoras Nívia Lothhammer e Marilda da Cruz Fernandes e Antônio Generoso Severino pela ajuda com as técnicas histoquímicas;

A Victor Hugo Andrade e Lisiane Vieira da Silva pela confecção das lâminas de H/E e Xylidine de Ponceau;

A Leonardo de O. Polidori, chefe da Biblioteca Setorial do Instituto de Biociências, pelo auxílio na elaboração desta dissertação;

Ao Departamento de Ciências Morfológicas e ao Curso de Pós Graduação em Neuroanatomia pelo uso dos equipamentos e material de pesquisa;

À FAPERGS pela concessão de uma bolsa de Iniciação Científica (processo nº 1080/89).

## RESUMO

As glândulas sexuais acessórias de fêmeas completamente ingurgitadas e em processo de ingurgitamento do carrapato bovino Boophilus microplus (Can.1887) foram estudadas quanto a sua morfologia e histologia.

Tratam-se de um par de glândulas tubulares simples, cujos ductos excretores abrem-se dorso-lateralmente na vagina, no limite desta com o receptáculo seminal. As células secretoras são cuneiformes, com núcleos grandes, ovóides, de cromatina compacta e geralmente com dois nucléolos. Grânulos de secreção eosinófilos são visualizados. Núcleos pequenos e redondos próximos à luz das glândulas sugerem a interiorização dos ductos excretores. Núcleos pequenos e achatados adjacentes à superfície basal das células secretoras também foram demonstrados pela técnica de Feulgen. Uma membrana externa à membrana basal foi visualizada.

Testes histoquímicos para radicais protéicos (Xylidine de Ponceau e Fast Green) e para polissacarídeos (PAS e Alcian Blue) demonstraram a presença abundante de grânulos de proteína básica e de polissacarídeos nas glândulas. O material coloidal na luz da glândula é composto principalmente por polissacarídeos. Méto-

dos para identificação de lipídios (Sudan III) responderam negativamente.



## ABSTRACT

The tubular accessory genital glands of fully engorged and partially engorged females of the cattle tick Boophilus microplus (Can.1887) were studied concerning to its morphology and histology.

They are a pair of simple tubular glands which ducts open dorso-laterally into the vagina near the limit with the receptaculum seminis. The secretory cells are wedge-shaped, have large and ovoidal nuclei with compact chromatin and frequently two nucleoli. Eosinophilic secretory granules are seen. Small and round nuclei in the center of the gland suggest the interiorization of the ducts. Small and flattened nuclei adjacent to the basal surface of the secretory cells were demonstrated by the Feulgen technique too. A membrane external to the basal one was visualized.

Histochemical tests for proteic radicals (Ponceau Xylidine and Fast Green) and polysaccharides (PAS and Alcian Blue) showed the presence abundant basic protein and polysaccharide granules in the gland. The colloidal material in the gland lumen is mainly composed of polysaccharides. Methods to identify lipids (Su -

dan III) were negative.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	5
SUMÁRIO .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
1 - Objetivos .....	24
1.1 - Considerações sobre os ínstares utilizados .....	25
1.2 - Considerações sobre as técnicas histológicas e histoquímicas .....	25
MATERIAL E MÉTODOS .....	31
RESULTADOS .....	38
A - Morfologia .....	38
B - Histologia .....	40
C - Análise da Secreção Glandular .....	47
DISCUSSÃO .....	54
CONCLUSÕES .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## INTRODUÇÃO

Boophilus microplus (Can.1887) é um carrapato da família Ixodidae, que tem um único hospedeiro no seu ciclo de vida. O gado bovino é o principal hospedeiro, entretanto outros animais, como búfalos, jumentos, ovelhas, cabras, cães e gatos, podem ser infestados devido a um enfraquecimento de suas defesas imunológicas (PEREIRA, 1982).

A exportação do gado da Ásia, de onde B.microplus é originário, fez com que este parasita fosse introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais. Entretanto atualmente já está erradicado em vários países do mundo.

O ciclo ontogenético deste carrapato consiste de uma fase não parasitária, que começa com a queda das fêmeas ingurgitadas e fertilizadas do hospedeiro para realizar a oviposição no solo, enterradas a alguns milímetros da superfície, e termina com o acesso das larvas ao hospedeiro, em uma fase parasitária, que inicia com a fixação das larvas no hospedeiro, inclui a alimentação das larvas e muda para ninfas, a alimentação das ninfas e muda para machos ou fêmeas, o acasalamento e o ingurgitamento (ingestão rápida e volumosa de sangue do hospedeiro) da fêmea, e termi



na com a queda dos adultos do hospedeiro (COTTON, 1908 apud PE - REIRA, 1982).

Considerando os dados obtidos por CERNY & DE LA CRUZ(1971) estudando o desenvolvimento de B.microplus em Cuba, MORÁN (1976) e ALVARADO & GONZALES(1979) em Porto Alegre, RS, pode-se fazer as seguintes observações sobre o tempo das diversas etapas do ciclo de vida: o intervalo de tempo decorrido desde a queda da fêmea ingurgitada até a expulsão do primeiro ovo é denominado pré-postura e é de 2 a 4 dias; as fêmeas para realizarem a postura de todos os ovos podem levar de 16 a 20 dias; o tempo de incubação é de 21 a 27 dias e as fêmeas completamente ingurgitadas podem pôr de 3500 a 4000 ovos.

Dos ovos saem as neolarvas que levam de 4 a 7 dias para se tornarem larvas com grande mobilidade e assim capazes de subirem no pasto e se prenderem ao hospedeiro. Então inicia a fase parasitária, que dura de 19 a 37 dias (média de 22 dias) segundo ALVARADO & GONZALES(1979).

A terminologia neógina, partenógina e teleógina foi criada por LAHILLE(1904) para descrever as fêmeas em estádios posteriores à metaninfa. MORÁN(1976) fornece uma descrição do aspecto externo do animal em cada fase e um esquema do ciclo de vida de B.microplus (Fig.1), indicando a idade referente a cada ínstar, incluindo partenógina e teleógina, ínstares utilizados no presente trabalho.

A fecundação se dá nas fases teleógina, partenógina e in -

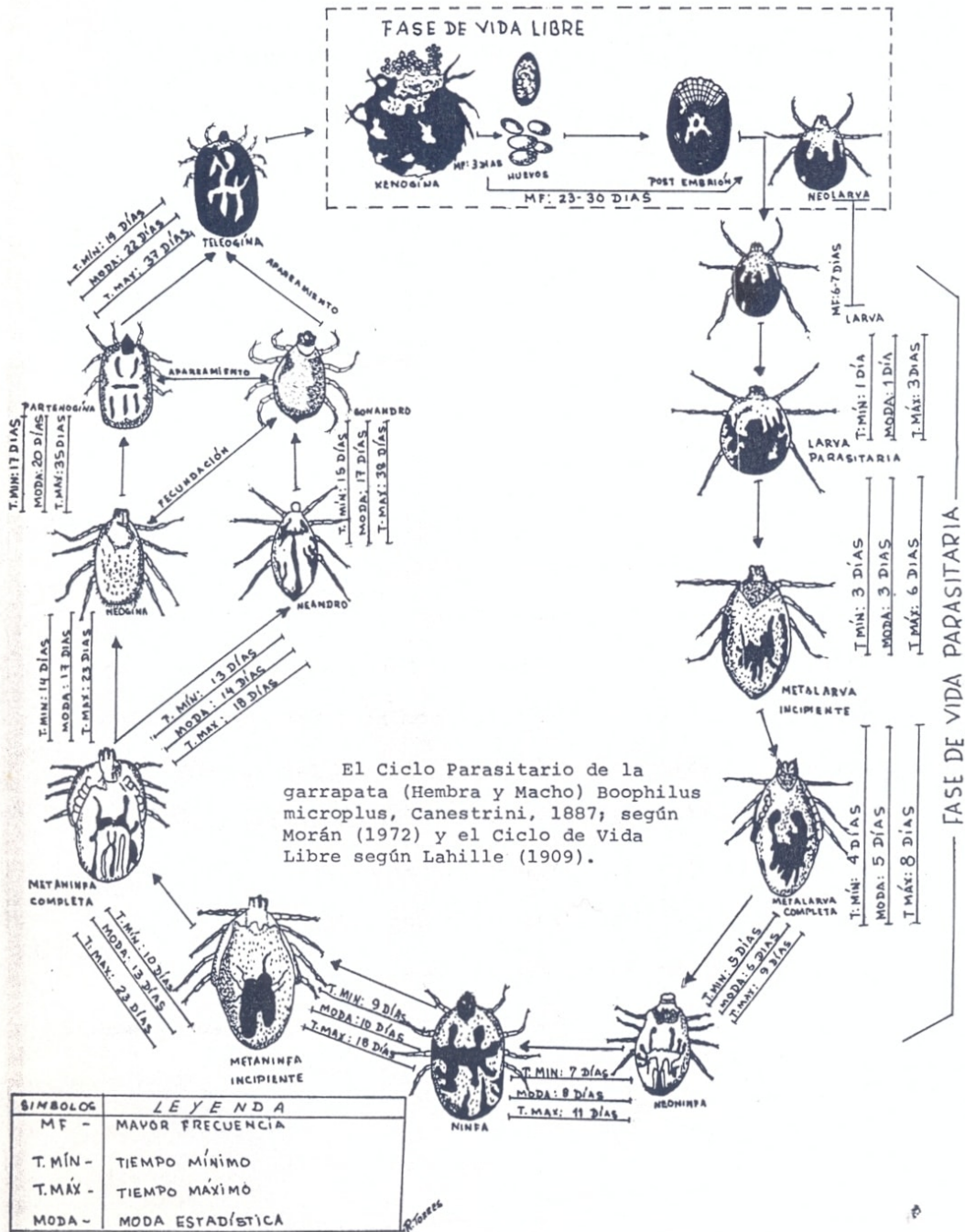


Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do carrapato *B. microplus* com a idade de cada ínstar (Reprodução de MORÁN, 1976).



clusive neógina, entretanto, nesta última, não há oviposição e, em partenógina, a quantidade de ovos dependerá da sua idade. Partenóginas jovens de 17 ou 18 dias desovam quatro a dez ovos (MORÁN, 1976). Só ocorre ingurgitamento total da fêmea se houver fertilização (FELDMAN-MUHSAM & BORUT, 1971; OLIVER et al, 1975; PEREIRA, 1982). A oviposição depende da alimentação e do acasalamento (OLIVER et al, 1975; OLIVEIRA, 1979).

O aparelho reprodutor feminino de B.microplus foi descrito por GARCIA et al(1987) em sua morfologia (Fig.2; Fig.3) e histologia. A vagina é revestida internamente por uma espessa camada de cutícula e externamente há feixes musculares que a fixa na parede do corpo. Na parte ventral da vagina, o epitélio apresenta glândulas tubulares simples, que apresentam maior atividade na fase de teleógina. O revestimento cuticular da vagina se projeta para a espermateca, onde se espessa em forma de gancho, para o útero e para as glândulas sexuais acessórias. A parte estreitada da espermateca foi denominada "gargalo" da espermateca e, na sua parte ventral, as células epiteliais apresentam estruturas apicais que se encaixam no ducto grosso do espermatóforo como um zipper. Este ducto faz conexão com a abertura do útero, enquanto o ducto fino se insere na vagina, sugerindo aos autores que os espermatozóides sejam conduzidos para a luz da cápsula através do ducto fino e que sejam levados da cápsula para o útero através do ducto grosso. O útero é um órgão sacular formado pela união dos dois ovidutos, que são ligados ao ovário em "U". A parte do

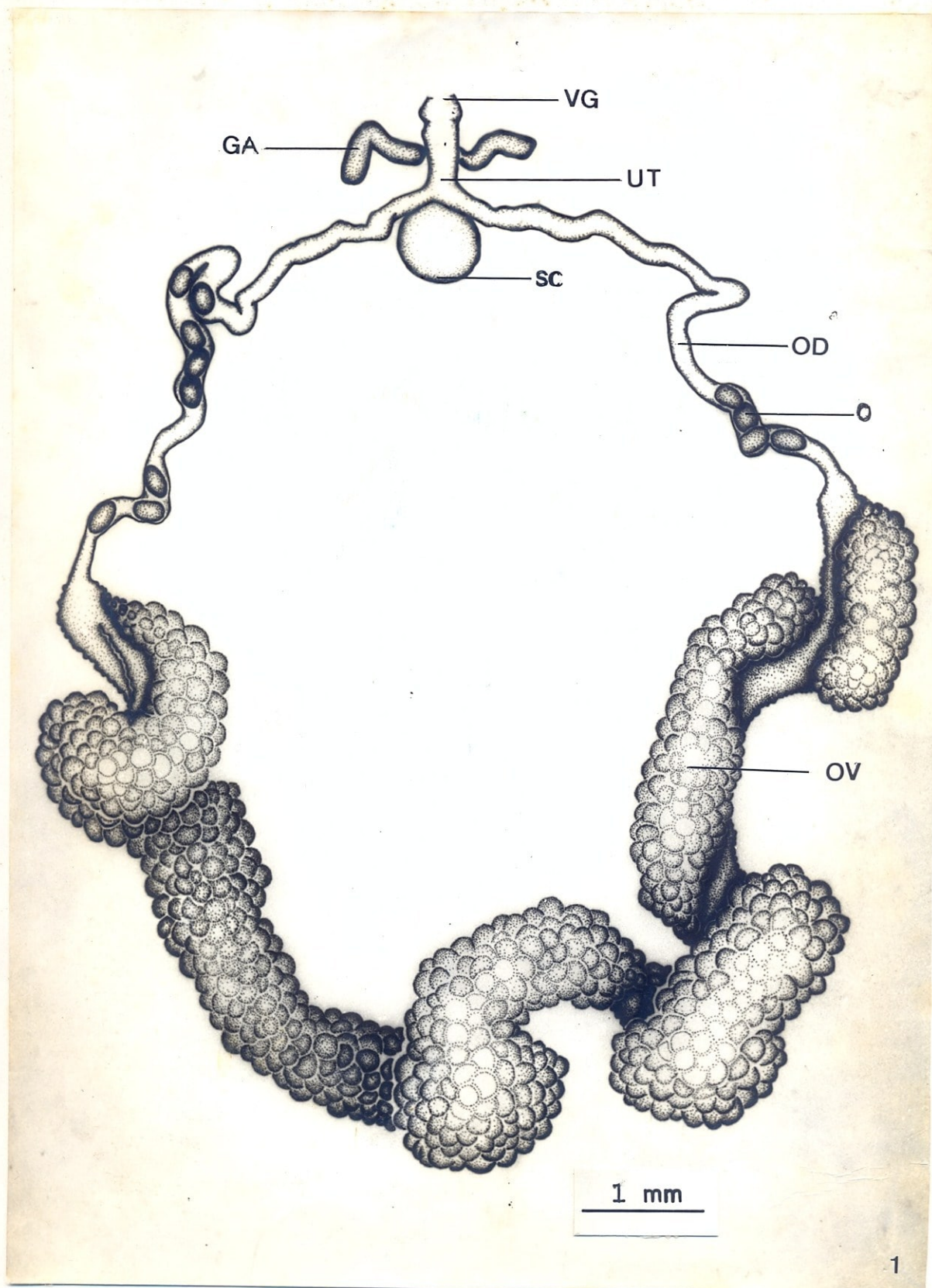


Figura 2 - Vista ventral do aparelho reprodutor de teleóquina de B. microplus. VG - vagina; GA - glândula sexual acessória; UT - útero; SC - espermateca; OD - oviduto; O - ovo; OV - ovário. (escala= 1mm)(publicado originalmente em GARCIA et al, 1987; cortesia dos autores).





Figura 3 - Corte longitudinal do aparelho reprodutor de partenógena de *B. microplus*. VG - vagina; GA - glândula sexual acessória; UT - útero; OD - ovidutos. SF - espermatóforo; SC - espermateca. (escala=500 $\mu$ m) (publicado originalmente em GARCIA et al, 1987; cortesia dos autores).

útero mais próxima ao oviduto é secretora, com núcleos globosos, de cromatina frouxa e localizados em diferentes alturas. O epitélio do oviduto próximo ao útero é semelhante ao epitélio secretor uterino. O útero se abre entre a vagina e a espermateca, ventralmente, enquanto as glândulas sexuais acessórias se abrem na vagina, neste mesmo limite, dorsalmente.

LONDT & SPICKETT(1976), ao descreverem o aparelho reprodutor feminino de Boophilus decoloratus(Koch, 1844), citaram a presença de um ovário tubular simples em forma de "W", dois ovidutos enrolados que se fundem num oviduto comum e que, por sua vez, se abre na vagina. Anteriormente ao receptáculo seminal e quase diretamente acima da abertura do oviduto comum, um par de glândulas tubulares acessórias se abre na vagina. O receptáculo seminal pode conter de uma a nove cápsulas. As cápsulas dos espermatóforos não se dissolvem, permanecendo intactas durante o tempo de oviposição das fêmeas e sugerindo que os espermatozóides sejam eliminados por um ou pelos dois tubos que cada cápsula possui. O ectoespermatóforo fica preso à abertura genital da fêmea e cai após seu conteúdo ser extruído.

Os trabalhos de GALUN & WARBURG(1967); FELDMAN-MUHSAM & BORUT(1971); OLIVER et al(1974) e FELDMAN-MUHSAM & BORUT(1978 ; 1983) esclarecem como o espermatóforo é formado e introduzido na fêmea.

Há descrições do aparelho reprodutor feminino de outros carrapatos da família Ixodidae, como Dermacentor andersoni Sti -



les (DOUGLAS, 1943), Ixodes ricinus(L.) (LEES & BEAMENT, 1948 ; ROSHDY, 1969), Haemaphysalis spinigera Neumann, 1897 (CHINERY , 1965), Hyalomma anatolicum excavatum Koch (KHALIL, 1970) e Haemaphysalis longicornis Neumann (KHALIL, 1972).

D.andersoni possui uma vagina dividida em uma região curta, próxima à abertura genital, denominada região vestibular, e uma região posterior em forma de barril, a região cervical, que é revestida com uma camada de músculos associados com o movimento da vagina para a extrusão dos ovos. Há a presença de glândulas tubulares acessórias e de glândulas lobadas acessórias. Estas últimas glândulas consistem de uma estrutura ímpar mediana, como um saco, que envolve a vagina cervical. DOUGLAS comparou-a com o útero de Argasidae, onde os espermátóforos são armazenados.

I.ricinus também possui a vagina dividida e as glândulas tubulares acessórias, que entram na vagina vestibular postero-lateralmente. As glândulas acessórias lobadas consistem de numerosos lobos irregulares dispostos nos lados dorsais e laterais da porção vestibular da vagina. Grãos eosinófilos, PAS positivos do epitélio pregueado da parede da parte cervical da vagina parecem passar para dentro do lúmen. A vagina cervical pode atuar como um receptáculo seminal, armazenando espermátóforos. O receptáculo seminal propriamente dito não está presente. A secreção epitelial da vagina cervical pode dissolver as paredes do espermátóforo e liberar os espermatozóides. Na superfície dorsal da parte cervical da vagina, há um tubo conector curto que faz a ligação

com o oviduto comum, que parece ter a função de um útero. Dois ovidutos emergem de um ovário em forma de ferradura.

O sistema genital de H.spinigera consiste de vagina, um par de glândulas acessórias tubulares que se abre na porção distal da vagina, dorsalmente, um tubo conector que liga o receptáculo seminal à vagina e que produz uma secreção mucoprotéica, talvez lubrificante, e um par de ovidutos, que produz uma substância coloidal PAS positiva e que fusiona-se em um ovário tubular.

H.a.excavatum possui a vagina dividida em vestibular e cervical. Duas glândulas tubulares acessórias com ductos revestidos com uma fina cutícula abrem-se para a vagina vestibular, próximo da junção com a vagina cervical. O receptáculo seminal desemboca dorsalmente, na vagina cervical. O epitélio glandular que reveste o pescoço do receptáculo seminal parece ser similar ao epitélio "uterino" de Argas arboreus Kaiser, Hoogstraal e Kohls por secretar uma substância que provavelmente dissolve o espermatóforo.

H.longicornis possui uma vagina dividida, duas glândulas tubulares acessórias, um receptáculo seminal cujo pescoço se situa dorsalmente na vagina cervical, um tubo conector, um ducto comum formado pela confluência dos dois ovidutos e um ovário em forma de "U".

Da família Argasidae, que reúne os carrapatos moles, têm-se descrições do aparelho reprodutor de Argas persicus(Oken) (RO



BINSON & DAVIDSON, 1914), Ornithodoros moubata Murray (LEES & BEAMENT, 1948) e de A. arboreus (KHALIL, 1969).

ROBINSON & DAVIDSON ao descreverem o aparelho reprodutor de A. persicus distinguiram duas partes, na vagina, diferentes histologicamente: uma região posterior ou cervical, em forma de barril, com músculos espessos e uma região vestibular sem músculos circulares. As glândulas tubulares acessórias entram na vagina, nesta junção. Os ovidutos desembocam diretamente na vagina, sem se unir.

Em O. moubata, a vagina é curta e há glândulas acessórias tubulares. Um saco bilobado semelhante ao útero serve como um receptáculo seminal, podendo conter uma dúzia de espermátóforos, que se rompem e assim os espermatozóides vão para os ovidutos. Os ovidutos enrolados levam a um ovário em forma de grinalda.

Em A. arboreus, a vagina é dividida em vestibular e cervical e as duas glândulas tubulares abrem-se na vagina vestibular. Os espermátóforos são armazenados no útero. As espermátides são liberadas quando a parede do espermátóforo é dissolvida, possivelmente devido à ação de uma secreção epitelial. O epitélio uterino é holócrino. Dois ovidutos enrolados desembocam no ovário.

As glândulas tubulares acessórias são universais entre os carrapatos (ARTHUR, 1962). Alguns apresentam também glândulas acessórias lobadas, como D. andersoni e I. ricinus, ou glândulas vaginais, como B. microplus. Pode haver ainda epitélio secretor na vagina, no útero, nos ovidutos, no tubo conector ou no recep-

táculo seminal conforme a espécie.

As glândulas tubulares acessórias são glândulas exócrinas constituídas por um epitélio simples colunar ou células em forma de cunha, com núcleos grandes, medianos, de cromatina compacta e escura. As células delimitam um lúmen estreito (ARTHUR, 1962; CHINERY, 1965; GARCIA et al, 1987). GARCIA et al(1987) observaram a presença de pequenos núcleos na parte central da glândula, junto à luz. Estes autores descreveram o ducto excretor como formado por células cilíndricas, com núcleos redondos e claros, com cromatina frouxa e citoplasma muito corado.

LEES & BEAMENT(1948), em O.moubata, mencionaram a presença de gotas grandes de colóide que coram-se de cinza pálido com Hematoxilina Férrica. GARCIA et al(1987) observaram grãos acidófilos em abundância no citoplasma das células das glândulas de B.microplus.

CHINERY(1965) observou, nas células destas glândulas em adultos recém-emergidos de H.spinigera, um material finamente granular eosinófilo nas porções apicais das células, que constatou ser predominantemente proteína básica. As porções basais das células eram fibrilares e basófilas devido à presença de RNA. Com o ingurgitamento além da glândula aumentar e o ducto se tornar mais largo, as células apresentam alterações histológicas e histoquímicas. Do formato em cunha passam a colunares ou em forma de cúpula. O núcleo aumenta de tamanho se tornando vesicular e localizado na porção média das células. Nos carrapatos completa-



mente ingurgitados, as células estão cheias de grânulos grosseiros, rosa brilhantes com H/E e que contêm principalmente proteínas básicas, ricas em grupos tirosina. Os grânulos são PAS negativos e não coram com azul de toluidina. Elas contêm algum material lipídico bem como grupos dissulfeto. Em carrapatos que estão quase em oviposição, este material granular é liberado no lúmen da glândula na forma de uma material coloidal.

ROBINSON & DAVIDSON(1914) sugeriram que as glândulas sexuais acessórias tubulares sejam responsáveis pela secreção do espermatóforo, dentro do qual entraria as espermátides e ainda que a sua secreção coloidal possa agir como lubrificante, facilitando a extrusão do ovo através da vagina. DOUGLAS(1943) reforça esta última hipótese. CHINERY(1965), com base na similaridade histoquímica das células da glândula tubular acessória e da glândula do órgão de Gené, sugere alguma relação funcional. A glândula sexual acessória pode desempenhar um papel suplementar à glândula do órgão de Gené. Esta suposição é baseada no fato de que LEES & BEAMENT(1948) terem sugerido que a glândula acessória lobada, em I.ricinus, seja responsável por uma camada incompleta de cera, observada na superfície do ovo na vagina e, em H.spini-gera, como não há esta glândula, CHINERY supôs que a glândula tubular acessória forneça esta camada de cera.

As glândulas acessórias lobadas de D.andersoni e I.ricinus diferem entre si morfológicamente, mas são semelhantes na sua histologia. São constituídas por células grandes, colunares, po-

ligonais ou irregulares, com núcleos grandes, citoplasma denso e margens livres de borda em favo de mel (ARTHUR, 1962). Apresentam uma grande similaridade histológica com o tecido glandular do órgão de Gené, sugerindo que secrete cera. A glândula acessória lobada e o órgão de Gené são regiões da epiderme que se tornaram especializadas para uma função glandular particular. A produção de um agente de proteção à água é uma propriedade geral da epiderme (LEES & BEAMENT, 1948).

O órgão de Gené é responsável pela cobertura de cera do ovo quando este sai da vagina, protegendo-o contra a perda de água, do ataque de fungos e permitindo que se juntem em grupos (BOOTH et al, 1984). Quando um ovo é expulso, a vagina se projeta, empurrando o ovo entre os cornos do órgão de Gené, que se evertem para sua direção. A cera passa do lúmen dos cornos para a superfície externa, na forma de um complexo cera-proteína segundo LEES & BEAMENT(1948). Na parte superior dos poros, o complexo parece ser quebrado e a cera de alguma maneira é liberada. A proteína deve ser reabsorvida pelas células, já que a cera é depositada no lado externo do órgão de Gené livre de proteínas.

Quando os cornos do órgão de Gené emergem da posição em que se encontram para alcançar a vagina, passam sobre dois grupos de poros, as áreas porosas, situados na superfície dorsal do capitulum, posterior às quelíceras. Na verdade, são as aberturas externas das glândulas acessórias do órgão de Gené. Estas glândulas somente são encontradas em Ixodidae (BOOTH et al, 1984).



LEES & BEAMENT(1948) descreveram a histologia do órgão de Gené de I.ricinus, observando que o de O.moubata é bastante diferente. As células glandulares do órgão de Gené de I.ricinus são irregulares ou poligonais e são bem espaçadas umas das outras. O núcleo é grande. O citoplasma é denso e profundamente corado. Há uma borda em favo de mel bem desenvolvida. Frequentemente uma mecha de fibras estende-se da margem da célula para o lúmen da glândula.

BOOTH et al(1984), ao estudar as glândulas acessórias do órgão de Gené de B.microplus, observaram que o máximo desenvolvimento das glândulas coincide com o início da oviposição, sugerindo que tenham um papel na cobertura de cera do ovo. FELDMAN-MUH-SAM(1963) sugeriu que a área porosa produza um lubrificante dos cornos do órgão de Gené durante a oviposição. Trabalhos onde estes poros foram fechados (ATKINSON & BINNINGTON, 1973; BOOTH et al, 1984) resultaram em postura de ovos viáveis e eclosão normal. ATKINSON & BINNINGTON(1973) encontraram evidências de que a secreção dos poros exerça um efeito antioxidante em certos componentes esteróides não saturados da cobertura de cera.

A ultraestrutura das células das glândulas acessórias do órgão de Gené é característica de células que sintetizam lipídios: possuem grande quantidade de retículo endoplasmático liso e de Golgi. As células secretoras do órgão de Gené, por sua vez, contém retículo endoplasmático rugoso e pouco retículo endoplasmático liso, sugerindo que seu produto principal seja lipoproteí

na e não lipídios livres. Isto também leva a concluir que as células das glândulas acessórias do órgão de Gené produzam mais esteróides que as células do órgão de Gené (BOOTH et al, 1984).

A maior quantidade de esteróides na cera do ovo de carrapatos do que de outros artrópodos se explica pela dieta rica em colesterol daqueles animais (CHERRY, 1969; 1976).

A composição dos lipídios não polares da cera do ovo de B.microplus é conhecida (McCAMISH et al, 1977), entretanto não se sabe se estes componentes originam-se do próprio órgão de Gené ou se são aplicados no ovo durante sua passagem pelo oviduto, como observaram BOOTH et al(1984).

LEES & BEAMENT(1948) analisaram a casca do ovo de O.moubata e verificaram a presença de três camadas logo após a postura. A "camada da casca" interna é secretada pelo próprio oócito, quando este está no ovário, preso pelo funículo. É colocada em forma de grânulos adjacentes que coalescem para formar uma membrana contínua. Esta aumenta na sua área de superfície e espessura à medida que o ovo cresce em tamanho, dentro da túnica própria. É uma membrana elástica, incolor e sem quitina, composta de proteínas, livre de lipídios. A água do ovo é absorvida quando este passa do ovário para o oviduto. O ovo no oviduto é ainda completamente permeável. A "camada da casca" perde a elasticidade nesse trajeto, chegando ao útero rígida. No útero, os ovos são armazenados por um curto período de tempo antes de serem postos. Sobre a primeira membrana surge uma camada incompleta de grânulos



com grupos aldeídos logo depois da ovulação. A terceira camada é a cobertura externa de cera que é aplicada pelo órgão de Gené. É leve e viscosa, em contrapartida a da cutícula do tegumento que é pesada e cristalina. Esta cera deve ter capacidade de se espalhar sobre a superfície do ovo e talvez impregnar-se pelas camadas alcançando a "membrana interna", que se situa sob a "camada da casca" e surge após dois a três dias de incubação. Esta membrana é uma delicada película que envolve o vitelo, com propriedades elásticas e resistentes e sem quitina. Torna-se gordurosa e hidrófoba, possivelmente por receber lipídios secretados pelo embrião.

Em I.ricinus, LEES & BEAMENT(1948) constataram a presença de uma camada incompleta de cera antes do ovo passar pelo órgão de Gené, o que não há em O.moubata, sendo o órgão de Gené o único responsável pela secreção de cera. Estes autores sugeriram que a fonte dessa camada incompleta adquirida pelo ovo na sua passagem pela vagina possa ser as células que revestem a região cervical da vagina, as glândulas tubulares acessórias ou as glândulas lobadas acessórias.



## 1 - Objetivos:

A maioria dos trabalhos sobre o aparelho reprodutor feminino dos carrapatos descreve a sua morfologia e histologia. Alguns autores estudaram a gametogênese, vitelogênese, oviposição e a estrutura da casca do ovo, entretanto não há referências sobre a exata função das glândulas sexuais acessórias. Há sugestões de que sejam responsáveis pela secreção do espermatóforo ou por uma camada incompleta de cera na cobertura do ovo e ainda de atuarem como um lubrificante, facilitando a extrusão do ovo através da vagina.

Os autores geralmente salientam a sua localização, o formato em cunha das células secretoras, a similaridade histológica com a glândula acessória lobada e com o órgão de Gené, a presença de grãos acidófilos e gotas de colóide. Uma descrição histológica mais detalhada não foi encontrada, e uma investigação histoquímica só foi realizada por CHINERY(1965) que estudou as glândulas de H.spinigera.

No presente trabalho, pretende-se fornecer subsídios para elucidar o papel das glândulas acessórias no aparelho reprodutor feminino dos carrapatos.

A morfologia e a histologia das glândulas sexuais acessórias de B.microplus nos ínstares partenógina e teleógina foram descritas, e alguns testes histoquímicos foram realizados para avaliar a natureza da sua secreção.

### 1.1 - Considerações sobre os ínstares utilizados:

As fases teleógina e partenógina foram analisadas por não apresentarem tantas diferenças morfológicas, histológicas e possivelmente histoquímicas, já que, em ambas as fases, as fêmeas podem ser fecundadas e realizarem postura. Em contrapartida, neóginas não foram utilizadas por não realizarem oviposição, diferindo biologicamente das anteriores e porque as glândulas sexuais acessórias são bastante rudimentares, como praticamente todo o aparelho reprodutor, dificultando em muito a dissecação e posterior investigação.

### 1.2 - Considerações sobre as técnicas histológicas e histoquímicas:

A maior parte dos corantes utilizados em histologia é classificada como corantes ácidos e básicos. Entretanto não são nem ácidos, nem bases de fato, mas sais neutros que se dissolvem na água, onde se dissociam em ânions e cátions. O fato pelo qual um corante é denominado ácido ou básico depende do componente que possibilita a cor estar no ânion ou no cátion do sal dissociado. Se estiver no ânion (radical ácido), o corante é chamado corante ácido ou aniônico, enquanto que se estiver associado ao cátion, o corante é denominado básico ou catiônico. O corante ácido ou aniônico cora os radicais (ácidos), enquanto o corante básico ou catiônico cora (as bases). A substância é denominada basófila se possuir uma afinidade para um corante básico, enquanto a substân

*básicos corrigidos positivamente*  
*os radicais ácidos*  
*as subst. carregadas negativamente*



cia é dita acidófila se absorver um corante ácido. Os termos ácido e eosinófilo são comumente empregados como sinônimos (HAM, 1977).

### Técnica de Hematoxilina e Eosina

A hematoxilina é um exemplo de corante básico, enquanto a eosina, de corante ácido. A hematoxilina cora substâncias <sup>com carga negativa</sup> (basófilas), enquanto a eosina, substâncias <sup>com carga positiva</sup> (acidófilas).

Na verdade, a hematoxilina não é um corante básico, porém é utilizada com mordentes. Os mordentes são substâncias com cargas positivas que se ligam tanto à hematoxilina como aos locais que recebem o corante, de modo que a hematoxilina atua como um corante básico. A coloração dos núcleos pela hematoxilina se dá porque o DNA e o RNA possuem radicais de fosfato (ácido) que se combinam ao complexo mordente-hematoxilina, carregados positivamente (HAM, 1977).

As eosinas são eosinatos de sódio ou de potássio e possuem tons azulados e amarelados, entretanto são avermelhadas com fluorescência (MAIA, 1967). Apresentam a cor nos ânions (carregados negativamente), sendo então um corante ácido. Coram o citoplasma das células através da combinação com as proteínas presentes neste local. Em pH normal, muitas proteínas do corpo, inclusive as do citoplasma das células, possuem vários grupos (básicos (carregados positivamente)) em suas cadeias laterais (HAM, 1977).



Os testes histoquímicos são realizados para se conhecer a composição química das células ou o seu grau de atividade. Neste trabalho, foram realizados para se verificar a presença de outras células, além das células secretoras, na constituição das glândulas, o que foi feito através de métodos para DNA, demonstrando os núcleos. E ainda para se obter informações sobre a secreção das glândulas sexuais acessórias, em especial dos grânulos presentes no citoplasma de suas células.

#### Técnica para identificação de ácidos nucleicos:

A reação de Feulgen é a reação mais conhecida e utilizada para as determinações de DNA "in situ". Ela se processa em duas etapas. Na primeira etapa, há a hidrólise do DNA pelo ácido clorídrico, que promove a quebra das ligações purina-desoxirribose e a retirada das bases púricas, levando à formação de grupos aldeídos. Durante este processo, o RNA é removido do tecido. Na segunda etapa, o DNA, com radicais aldeídos livres, é submetido à presença do reativo de Schiff (fucsina básica, um corante de cor vermelha, descolorada pelo anidrido sulfuroso), resultando num composto vermelho (MELLO & VIDAL, 1980; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

#### Técnicas para identificação de radicais protéicos:

A presença de proteínas nas células é demonstrada através de reações gerais ou por meio de reações específicas para resí-

duos de aminoácidos, tais como para arginina, tirosina, triptofano... (MELLO & VIDAL, 1980).

Como reações gerais podem ser consideradas aquelas devidas aos grupamentos -  $\text{NH}_3^+$  (-  $\text{NH}_2$ ) disponíveis dos aminoácidos. Estes grupamentos têm caráter eletropolar positivo e, portanto, combinam-se com corantes aniônicos (MELLO & VIDAL, 1980). A Xylidane de Ponceau é exemplo deste tipo de corante e por isso escolhida para o estudo de possíveis radicais protéicos nos grãos de secreção das glândulas sexuais acessórias.

Fast Green também é um corante aniônico, entretanto quando em pH elevado (pH=8) é específica para a identificação de proteínas básicas. Em pH alcalino, os grupos -  $\text{NH}_2$  presentes em todas as proteínas não estão ionizados e assim não se ligam ao corante aniônico, enquanto que os grupos básicos, como os grupos guanidina da arginina e os grupos  $\epsilon$ -amino da lisina, permanecem ionizados e, conseqüentemente, se ligam ao Fast Green, promovendo a sua coloração. Normalmente estes grupos básicos estão ligados a grupos ácidos no tecido, particularmente aos ácidos nucléicos. Então o DNA deve ser removido anteriormente por tratamento com ácido tricloroacético quente.

Técnicas para identificação de polissacarídeos:

A histoquímica dos polissacarídeos se baseia principalmente em métodos para evidenciar os seus grupamentos 1-2 glicol ou radicais ácidos. O uso de enzimas como a amilase, protease, con-



droitinase, hialuronidase..., associado aos métodos para 1-2 glicol e radicais ácidos permite uma análise mais específica da natureza dos polissacarídeos presentes nos tecidos (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

O teste histoquímico mais utilizado para o diagnóstico de carboidratos é a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS). Esta reação abrange duas etapas. Na primeira etapa, as ligações carbono-carbono das seqüências 1-2 glicol do substrato são oxidadas pelo ácido periódico, resultando na produção de aldeídos no substrato. Na segunda etapa, o material é tratado com o reativo de Schiff. As moléculas do reativo de Schiff, ligando-se aos aldeídos do substrato, restabelecem o grupo cromofórico anteriormente presente nas moléculas da fucsina básica (MELLO & VIDAL, 1980 ; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

O Alcian Blue baseia-se nas ligações eletrostáticas que se estabelecem entre um corante carregado positivamente (corante básico ou catiônico) com polissacarídeos ácidos (polianions), que são denominados glicosaminoglicanos. Estes contém repetidos grupos ácidos, que podem ser carboxilas ou grupamentos sulfato, na sua constituição. O caráter polianiônico dos glicosaminoglicanos permite que se liguem à água, em grandes quantidades, por isso eram chamados de mucopolissacarídeos (BANKS, 1986; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Os grupamentos <sup>Asfalto</sup> sulfato dos ácidos nucleicos não reagem com o Alcian Blue, nem os polissacarídeos neutros. Os glicosaminogli



canos fortemente sulfatados reagem com o Alcian Blue a  $\text{pH}=1,0$  , os fracamente sulfatados reagem entre  $\text{pH}= 1,0$  e  $2,5$ . Glicosamino glicanos não sulfatados (e portanto contendo carboxilas) reagem entre  $\text{pH}= 1,7$  e  $3,2$ . Esta superposição nos  $\text{pH}$ s impossibilita a separação nítida das duas últimas categorias de glicosaminoglicanos por este método (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

#### Técnica para identificação de lipídios:

Os lipídios são geralmente localizados por corantes que se dissolvem nas gorduras, então os corantes seguem um princípio mais físico do que químico. Os tecidos com gotículas de lipídios são imersos em soluções alcoólicas saturadas de corantes muito lipossolúveis e fracamente álcool-solúveis. Após um certo tempo, o corante utilizado transfere-se do álcool para os lipídios dos tecidos, tornando-os coloridos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990). Exemplos deste tipo de corante são os Sudan.

## MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas de B. microplus das fases teleóquina e partenóquina, em número de 50, foram coletadas diretamente do hospedeiro (boi) na zona rural de Porto Alegre, Caxias do Sul e Nova Petrópolis. Foram mantidas em temperatura de cerca de 24°C por um a cinco dias até serem dissecadas.

A dissecação foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópico Bausch & Lomb modelo BVB-73. O animal foi colocado sobre uma fita adesiva de dupla face, em uma placa de Petri com parafina endurecida. Seccionou-se as bordas do corpo com bisturi e a parede dorsal foi levantada e colocada na fita adesiva, deixando o interior do animal à mostra. Durante a manipulação, estruturas não relacionadas com o trato genital eram retiradas, facilitando a visualização do aparelho reprodutor. Utilizou-se formol 10% para fixar o material já durante a dissecação e azul de metileno para melhor contrastá-lo. O aparelho reprodutor foi retirado, com exceção do ovário e de parte dos ovidutos.

Para a análise topográfica, este material, fixado em formol 10%, foi preparado "in toto" sobre lâmina e fotografado em um microscópio óptico Zeiss modelo N.U.

Para o estudo histológico, aparelhos reprodutores de fê -  
meas nos ínstares teleógina e partenógina foram fixados em for -  
mol 10% por 8 a 12 horas e colocados em álcool 70% no mínimo por  
<sup>lavados em água corrente por 12 hs.</sup> 15 minutos e no máximo por 24 horas. Após serem desidratados em  
soluções de concentrações crescentes de etanol por 10 minutos ca  
da, foram diafanizados em clorofórmio por 5 minutos, colocados  
em parafina por 5 minutos a uma temperatura de 58°C e então em -  
bloqueados em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados,  
em um micrótomo da Casa Lonner, numa espessura de 7 µm. Os corte  
tes, distendidos em banho-maria a uma temperatura de cerca de  
37°C, foram pescados com lâminas com albumina (mistura de 1:1 de  
albumina e glicerina). A albumina permite a melhor aderência dos  
cortes nas lâminas. Estas lâminas foram coradas por Hematoxilina  
Eosina.

#### Técnica de Hematoxilina-Eosina:

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em con  
centrações decrescentes de álcool por 1 minuto cada e em água  
destilada por 5 minutos. A hidratação é necessária porque os co  
rantes são solúveis em água. Os cortes foram corados por Hemato  
xilina de Harris por 5 minutos, colocados em água corrente por  
20 minutos para a diferenciação e corados em eosina por 1 minuto.  
Foi realizada a subida alcoólica, deixando 1 minuto em cada ál -  
cool. Foram clarificados em dois banhos de xilol por 1 ou 2 minu  
tos em cada e em xilol fenicado por 1 ou 2 minutos. Foram monta  
dos em bálsamo-do-Canadá sintético.



Como resultado obtêm-se os núcleos corados de roxo azulado e o citoplasma, de róseo.

Para o estudo histoquímico, foram utilizados diferentes fixadores segundo a técnica empregada.

Para a reação de Feulgen e Alcian Blue, o material foi fixado em álcool-ácido acético(3:1 de álcool absoluto e de ácido acético glacial) de 12 a 24 horas.

Os aparelhos reprodutores destinados à Xylidine de Ponceau e à reação do Ácido Periódico de Schiff(PAS) foram fixados em formol neutro tamponado (900 ml de água destilada; 100 ml de formol; 6,5 g de fosfato bibásico de sódio e 4 g de fosfato monobásico de sódio) por 12 a 24 horas.

Formol de Holt (900 ml de tampão fosfato pH= 7,2 0.05 M; 100 ml de formol e 75 g de sacarose) foi utilizado para fixar o material a ser testado por Fast Green a pH=8 e por Sudan III. O material permaneceu 18 a 24 horas no fixador a 4° C e posteriormente era colocado em solução de sacarose 15% e, quando saturado (cerca de 24 horas), foi transferido para uma solução de sacarose 30% até saturar.

As peças fixadas em álcool-ácido acético e formol neutro tamponado foram incluídas em parafina, seccionadas e preparadas em lâminas num procedimento igual ao realizado para o estudo histológico.

Do material fixado em formol de Holt foram obtidos cortes

realizados em criostato Wild Leitz modelo 1720, com 7  $\mu\text{m}$  de espessura para o Fast Green e 15  $\mu\text{m}$  para o Sudan III. Os cortes foram colocados em lâminas anteriormente embebidas em solução de alúmen de cromo e secas a 37°C por 2 a 3 horas.

As técnicas Feulgen, Alcian Blue e PAS foram realizadas em cortes do aparelho reprodutor de fêmeas na fase teleógena, enquanto que o método Fast Green foi realizado tanto para teleóginas quanto para partenóginas e o Sudan III, por sua vez, somente para partenóginas.

#### 1- Técnica para identificação de ácidos nucleicos:

##### 1.1 - Feulgen (MELLO & VIDAL, 1980)

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool e em água destilada por 2 minutos cada, colocados em ácido clorídrico 1N a 60°C por 10 minutos e lavados em água destilada por 2 minutos. Foram corados em Reativo de Schiff (100 ml de água destilada, 10 ml de HCl 1N, 4g de metabissulfito de sódio, 1 g de fucsina básica diamante, 200 mg de carvão ativo) por 1h e 30min (Os autores citados recomendam 40 minutos, entretanto verificou-se que o tempo ideal no Reativo de Schiff para o material em questão era 1h e 30 min). Os cortes foram lavados em 3 banhos sulfurosos (18:1:1 de água destilada, HCl 1N e metabissulfito de sódio) por 5 minutos cada e em água destilada por 20 minutos. Realizou-se a subida alcoólica para desidratar os tecidos. O material foi colocado em xilol para clari

ficar e foi montado em bálsamo-do-Canadá sintético.

O DNA aparece evidenciado em vermelho-púrpura.

2 - Técnicas para identificação de radicais protéicos:

2.1 - Xylidine de Ponceau (MELLO & VIDAL, 1980)

Os cortes foram desparafinados, hidratados, corados em solução corante (100 ml de tampão acetato pH= 1,7 e 0,1 g de Xylidine ponceau) por 15 a 20 min e diferenciados em tampão a pH=1,7 durante 15 a 24 horas. Foram lavados em água, desidratados, diafanizados e montados em bálsamo-do-Canadá sintético.

Como resultado obtêm-se os radicais protéicos corados em vermelho-alaranjado.

2.2 - Fast Green a pH= 8 (CHAYEN et al, 1973)

A técnica consistiu em hidratar os cortes, imergí-los em ácido tricloroacético 5% a 95°C, lavá-los por 3 vezes (10 minutos cada) em álcool 70% e então em água destilada por 5 minutos para remover todo o ácido tricloroacético. Os cortes foram corados em Fast Green por 30 min. Foram lavados rapidamente em água destilada e transferidos para álcool 95%, desidratados, clarificados e montados em bálsamo-do-Canadá sintético.

Como resultado obtêm-se as proteínas básicas coradas em esverdeado ou azul-esverdeado (verde-berilo). As histonas se coram intensamente.



### 3 - Técnicas para identificação de polissacarídeos:

#### 3.1 - Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS)

Os cortes foram desparafinados, hidratados, oxidados em ácido periódico 0,5% por 10 minutos, lavados em água destilada e corados por Reativo de Schiff por 15 minutos. Foram lavados em água destilada por alguns segundos, em 3 banhos sulfurosos de 3 minutos cada e em água destilada por 10 minutos. Foram corados em Hematoxilina de Harris durante 5 minutos e diferenciados em água corrente por 20 minutos. Foram desidratados, clarificados e montados em bálsamo-do-Canadá sintético.

Os polissacarídeos neutros, as glicoproteínas e o glicogênio são evidenciados em vermelho-púrpura.

#### 3.2 - Alcian Blue a pH=2,5 (MELLO & VIDAL, 1980)

A técnica consistiu em levar os cortes até água, corar durante 10 minutos com a solução de Alcian Blue a pH=2,5 (97 ml de água destilada, 3 ml de ácido acético glacial, 100 mg de Alcian Blue), lavar em água destilada por 30 segundos, desidratar, diafanizar e montar em bálsamo-do-Canadá sintético.

Como resultado obtêm-se os glicosaminoglicanos corados em azul.

### 4 - Técnica para identificação de lipídios:

#### 4.1 - Sudan III (ROMEIS, 1928)

Os cortes foram colocados em uma placa de Petri com álcool 50% na mesma temperatura do criostato (cerca de  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente em uma placa de Petri com uma solução saturada de Sudan III ( 1 litro de álcool 70% e 30 gramas de Sudan III) por 20 a 30 minutos. Foram lavados em dois banhos de álcool 50% por cerca de 1 minuto cada e montados em meio de Kaiser (gelatina-glicerina).

Como resultado obtêm-se os lipídios corados de amarelo-alaranjado a laranja-avermelhado, enquanto os demais componentes não se coram.

## RESULTADOS

## A - Morfologia

O aparelho reprodutor feminino de Boophilus microplus está constituído pela abertura genital, vagina, útero, dois ovidutos, ovário, espermateca e um par de glândulas sexuais acessórias.

A vagina, curta e cilíndrica, comunica-se diretamente com a espermateca, que apresenta uma parte estreitada, o "gargalo", e uma parte globosa onde os esperamtóforos são armazenados. O útero, que abre-se entre a vagina e a espermateca, ventralmente, é formado pela confluência dos dois ovidutos. Estes são contínuos a um ovário em forma de ferradura.

As glândulas sexuais acessórias são exócrinas e tubulares simples. Seus ductos excretores abrem-se na vagina, dorso-lateralmente, na junção desta com a espermateca (Fig.4).



## B - Histologia



Figura 4 - Vista dorsal de parte do aparelho reprodutor de teleó gina de B. microplus, mostrando a fixação dos ductos das glândulas sexuais acessórias na vagina (seta). VG - vagina; GA - glândula sexual acessória; SC - espermateca. Aumento: 80x.



## B - Histologia

A técnica de Hematoxilina e Eosina foi utilizada para permitir a visualização das células que constituem a glândula sexual acessória, com seus núcleos e grãos de secreção. Esta técnica marca a acidofilia e a basofilia das estruturas.

As glândulas sexuais acessórias da fêmea de B.microplus são constituídas por um epitélio simples, alto, com células cuneiformes ou colunares. Os núcleos destas células são ovóides, grandes, chegando a ocupar mais de 1/3 de seu volume, e estão em posição mediana ou submediana (Fig.5, Fig.6). Sua cromatina é altamente condensada e geralmente dois nucléolos estão presentes (Fig.6, Fig.7). O citoplasma, quando corado com H/E, mostra-se densamente preenchido por grãos eosinófilos (Fig.8).

No centro da glândula, verificam-se, junto à luz, estruturas pequenas, redondas e claras semelhantes a núcleos (Fig.5, Fig.6). Os limites dessas possíveis células não são visualizados por técnicas rotineiras como o H/E.

A técnica de Feulgen foi utilizada para comprovar se estas estruturas realmente se tratavam de núcleos. A resposta foi positiva. Estas células são provavelmente cúbicas, o que se supõe pelo formato arredondado dos núcleos, e delimitam a luz glandular, sugerindo a interiorização do ducto excretor.

A mesma técnica demonstrou a presença de alguns núcleos pequenos e achatados adjacentes à superfície basal das células se-

cretoras (Fig.7). Estas células devem ter origem epitelial, pois, como as células secretoras, também estão apoiadas na membrana basal. Os núcleos achatados sugerem que as células sejam pavimentosas ou irregulares.

Externamente à membrana basal foi visualizada, com H/E e PAS, uma segunda membrana (Fig.5).

Considerando-se estas observações pode-se realizar um esquema idealizado da glândula sexual acessória (Fig.9).



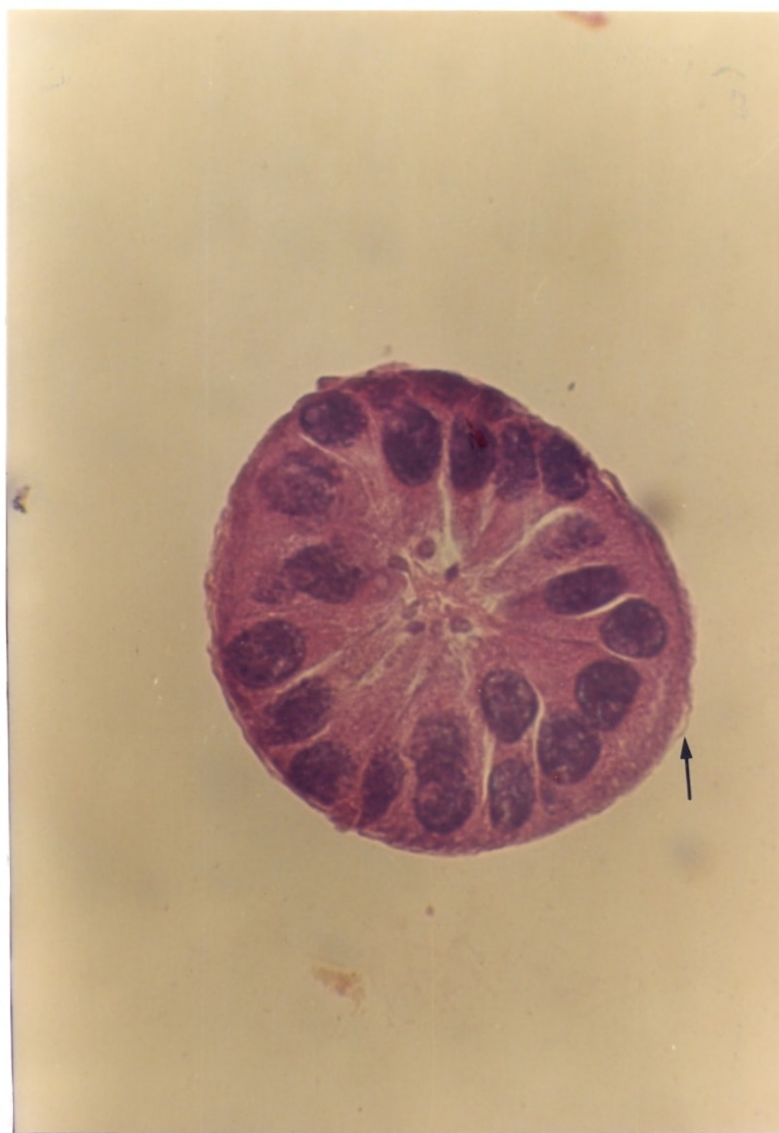


Figura 5 - Corte transversal da glândula sexual acessória de teleóquina de B.microplus, mostrando as células secretoras, cuneiformes, com núcleos ovóides, grandes, e os núcleos pequenos junto ao lúmen. A seta indica a membrana externa à membrana basal. Coloração: H/E. Aumento: 250x.

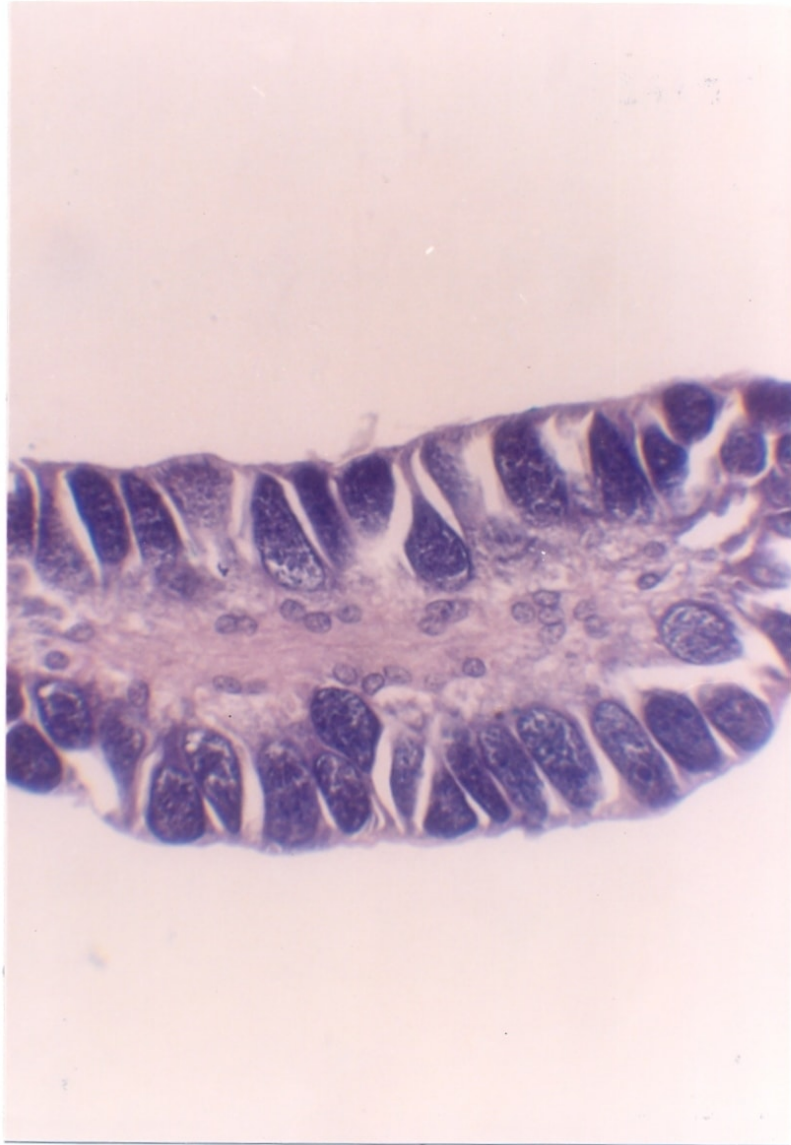


Figura 6 - Corte longitudinal da glândula sexual acessória de te leógina de B.microplus, mostrando o seu epitélio simples colunar, com núcleos grandes, ovóides, de cromatina compacta. Junto à luz da glândula, observam-se os núcleos pequenos e claros. Coloração: H/E. Aumento: 400x.

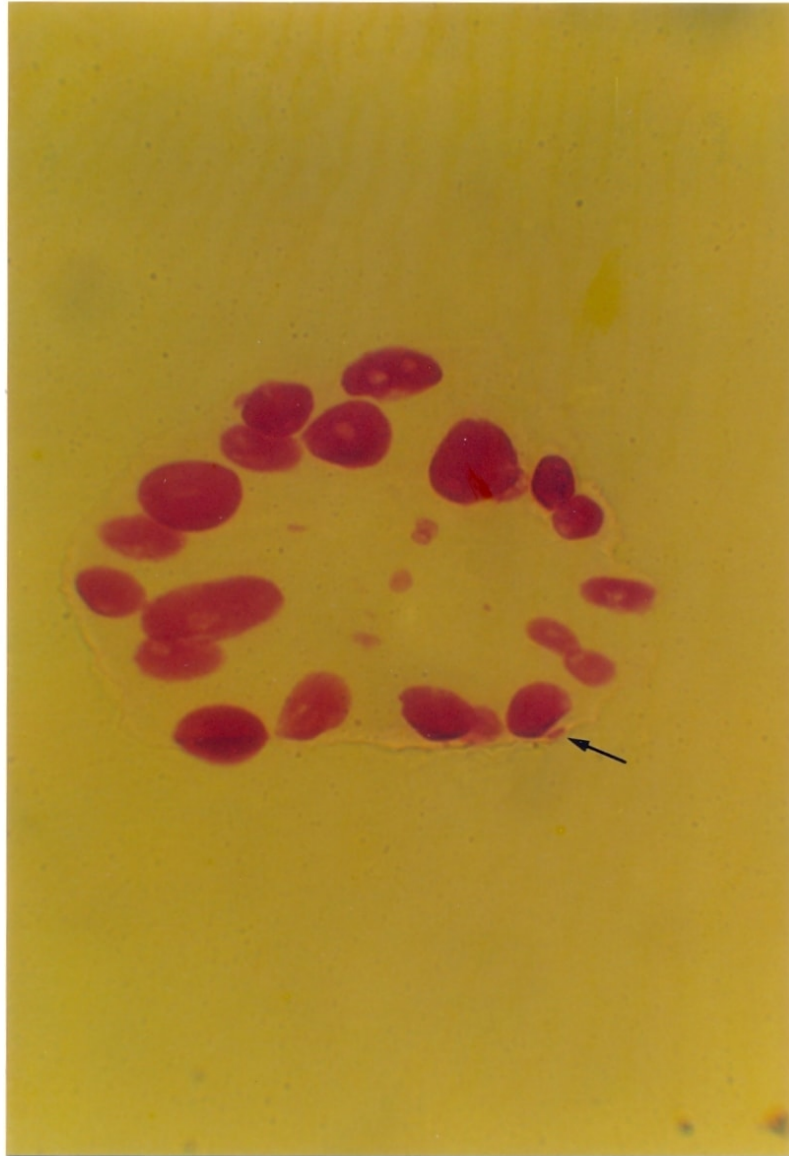


Figura 7 - Corte transversal da glândula sexual acessória de teleóstina de B.microplus, mostrando a presença de dois ou mais nucléolos nos núcleos das células secretoras, de núcleos pequenos, redondos no centro da glândula e de núcleos pequenos, achatados na base das células secretoras (estes apontados pela seta). Coloração: Feulgen. Aumento: 400x.



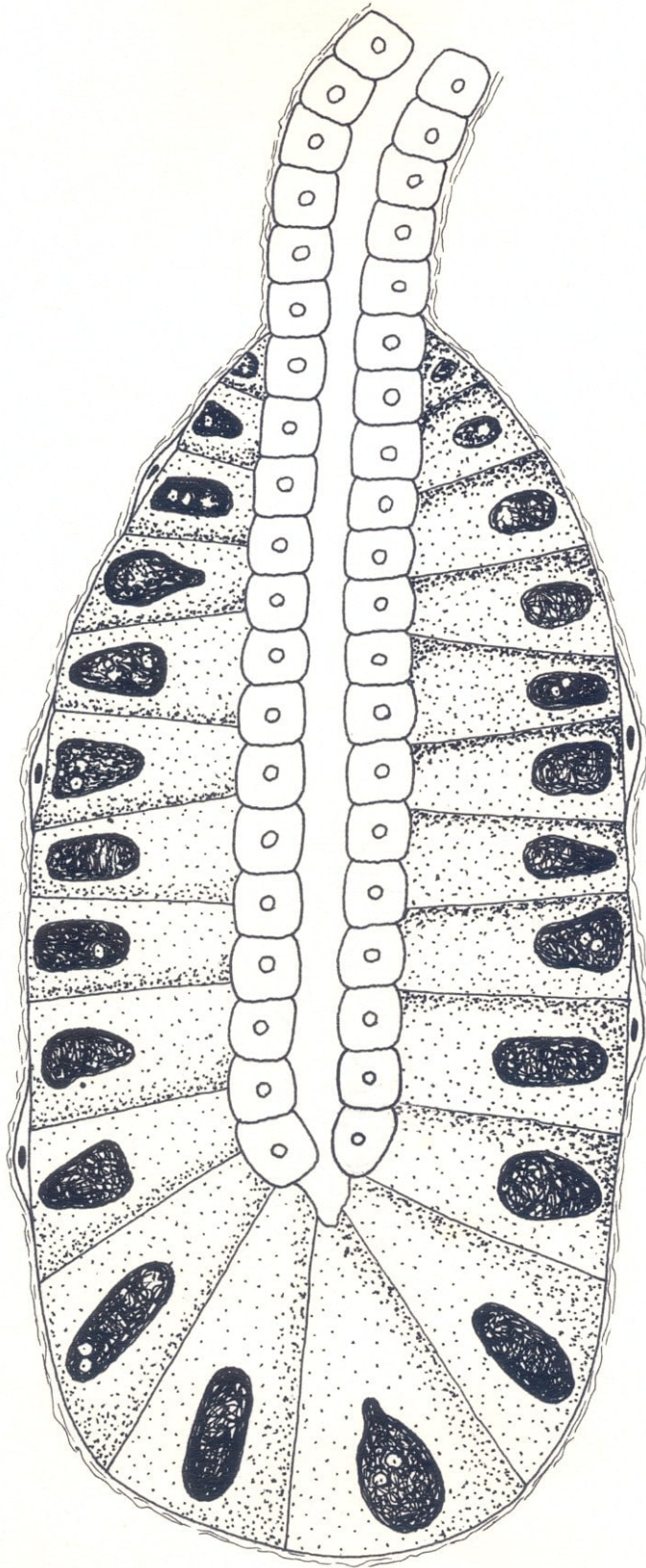
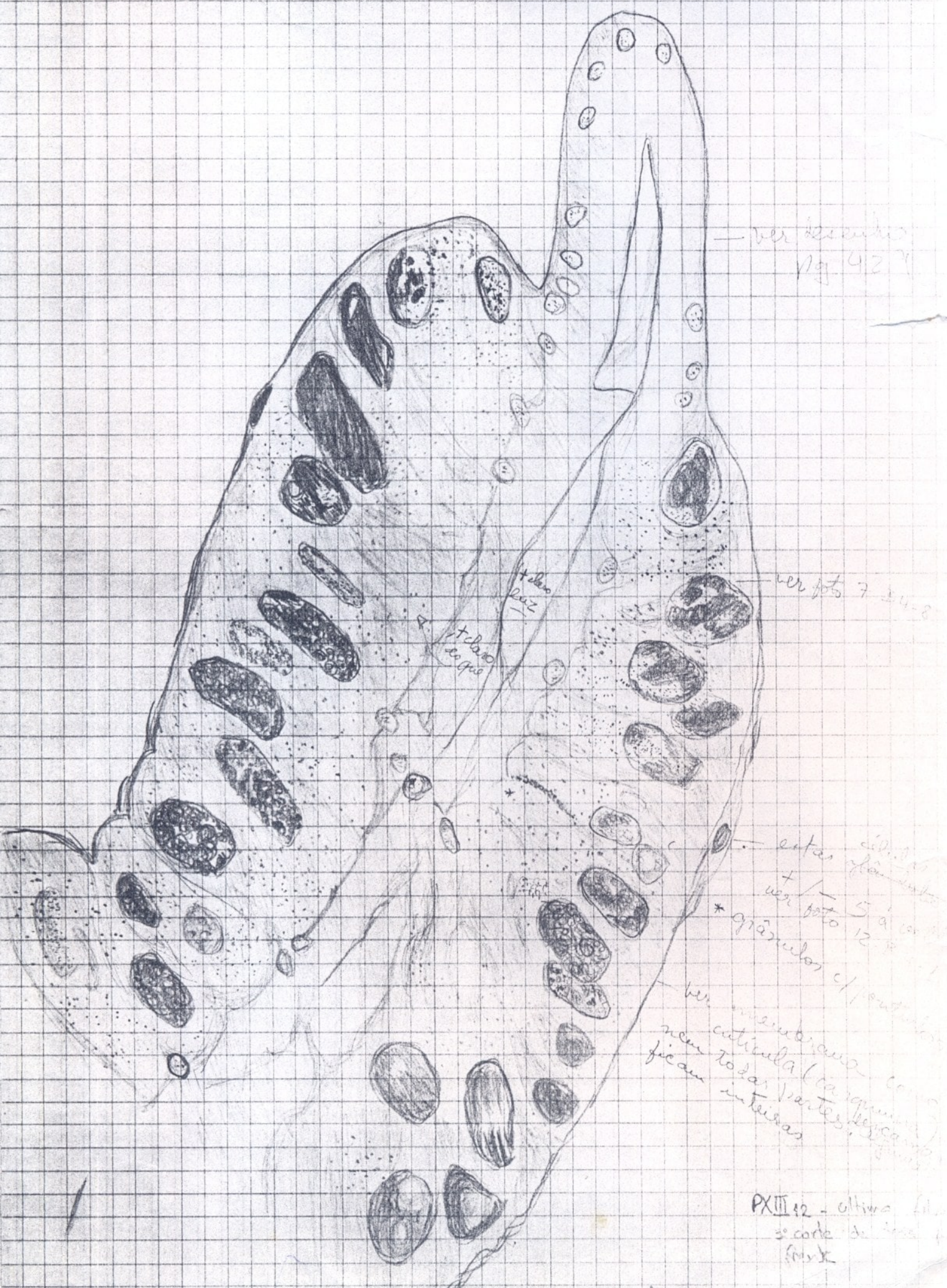


Figura 9 - Esquema idealizado da glândula sexual acessória de B. microplus, mostrando as células secretoras, o ducto intraglandular, as células adjacentes à superfície basal das células secretoras e a membrana externa à membrana basal.



g = 1000 μm extrapolado do trabalho da Sávia



ver secundo  
fig. 412 X

ver foto 7 34-8

cloro  
leuz  
cloro  
leuz

estas células  
+ ver foto 5 a cor  
\* grânulos c/ pontinhos

ver membrana com  
cutícula (a seguir)  
nem todas partes  
ficam intintas

PXIII 12 - última fila  
3ª corda de sílex  
Aum =

Aum =



### C - Análise da Secreção Glandular

Constatando-se a presença abundante de grãos eosinófilos no citoplasma das células secretoras, realizaram-se alguns testes histoquímicos para a identificação de sua natureza e outros para complementar o estudo da secreção glandular. Os seguintes testes foram executados:

- a) para radicais protéicos - Xylidine de Ponceau e Fast Green;
- b) para mucopolissacarídeos - Reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue;
- c) para lipídios - SudanbIII.

Toda a glândula mostrou resposta positiva à Xylidine de Ponceau, apresentando-se de cor alaranjada. Os grãos no citoplasma e os núcleos se destacaram pela coloração laranja-avermelhada (Fig.10). A resposta positiva indica a presença de radicais protéicos.

Os grânulos existentes no citoplasma da glândula sexual acessória e grumos de grande tamanho se coraram intensamente pelo Fast Green (Fig.11; Fig.12), indicando a sua constituição por proteínas básicas. Espaços vazios, arredondados ou ovais, pequenos, grandes ou de formato irregular são encontrados com abundância no citoplasma (Fig.11). Os núcleos apresentaram pouca coloração em contraste aos nucléolos (Fig.12). O colóide existente no lúmen e a membrana basal se coraram levemente de verde berilo (Fig.12), o que demonstra a pouca presença de proteínas básicas.



No citoplasma, uma granulação fina uniformemente distribuída pela glândula e grãos concentrados em determinadas regiões foram corados pelo PAS, sendo então constituídos por polissacarídeos. O conteúdo do lúmen da glândula apresentou intensa resposta ao PAS, distinguindo-se uma massa homogênea e grupos de grânulos grosseiros, altamente positivos. A membrana basal se corou fortemente pelo PAS. A membrana externa a esta também foi visualizada por esta técnica (Fig. 13; Fig.14).

Não houve resposta positiva dos grânulos e das demais estruturas da glândula ao Alcian Blue, o que significa ausência de glicosaminoglicanãs.

Não foi determinada a presença de lipídios em partenóginas já que o material não se corou pelo Sudan III.

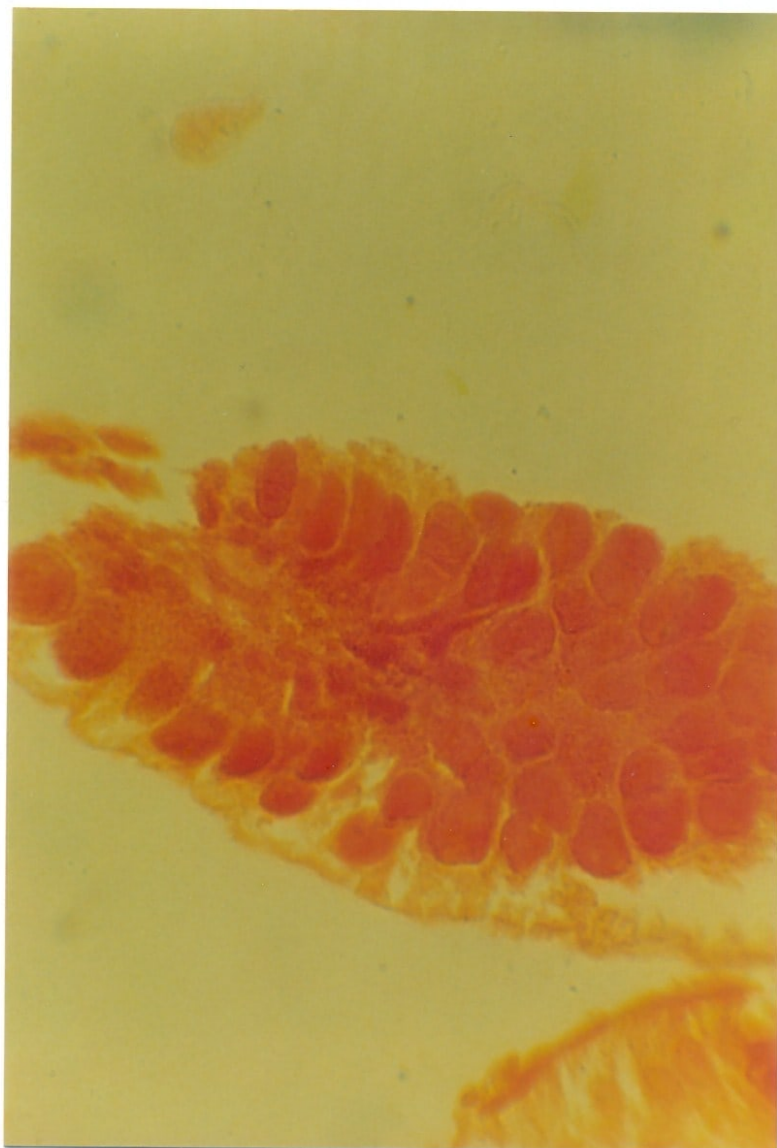


Figura 10 - Corte longitudinal da glândula sexual acessória de teleóstegina de B. microplus, exibindo grânulos protéicos. Os núcleos também reagiram positivamente à técnica. Coloração: Xylidine de Ponceau. Aumento: 400x.

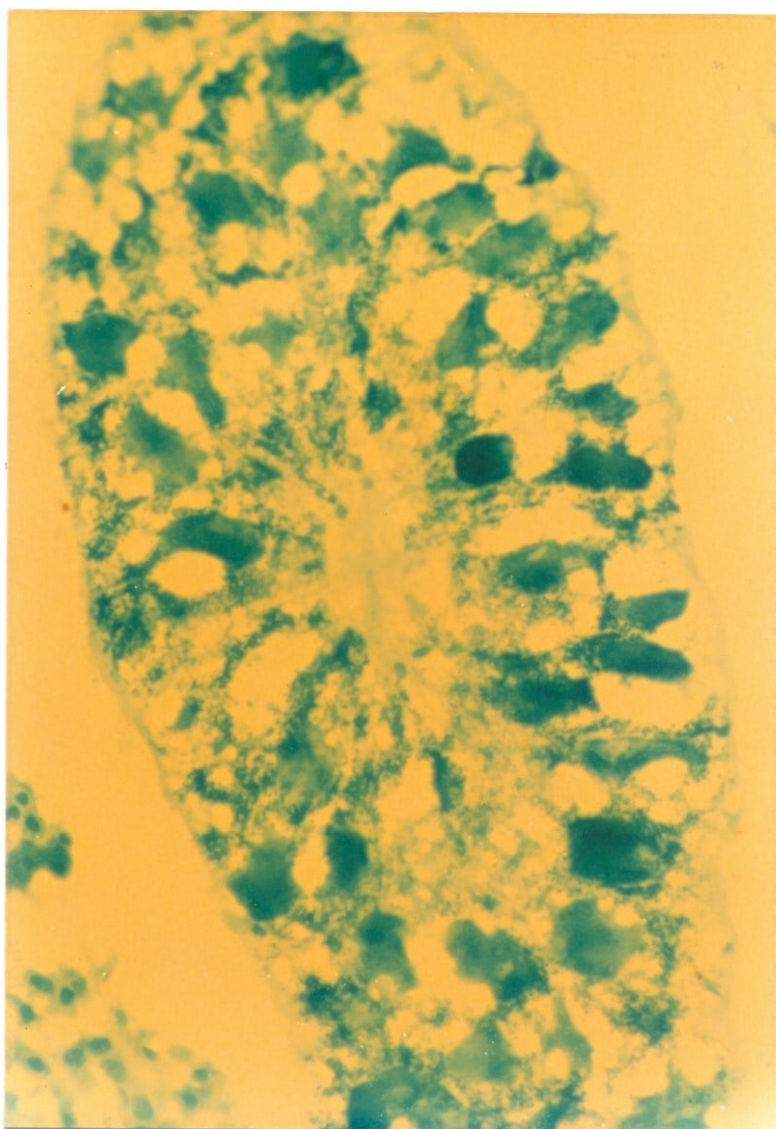


Figura 11 - Corte transversal da glândula sexual acessória de teleóquina de B.microplus, mostrando grânulos de proteína básica no interior das células secretoras e colóide pouco constituído de proteínas básicas no lúmen. Coloração: Fast Green. Aumento: 250x.



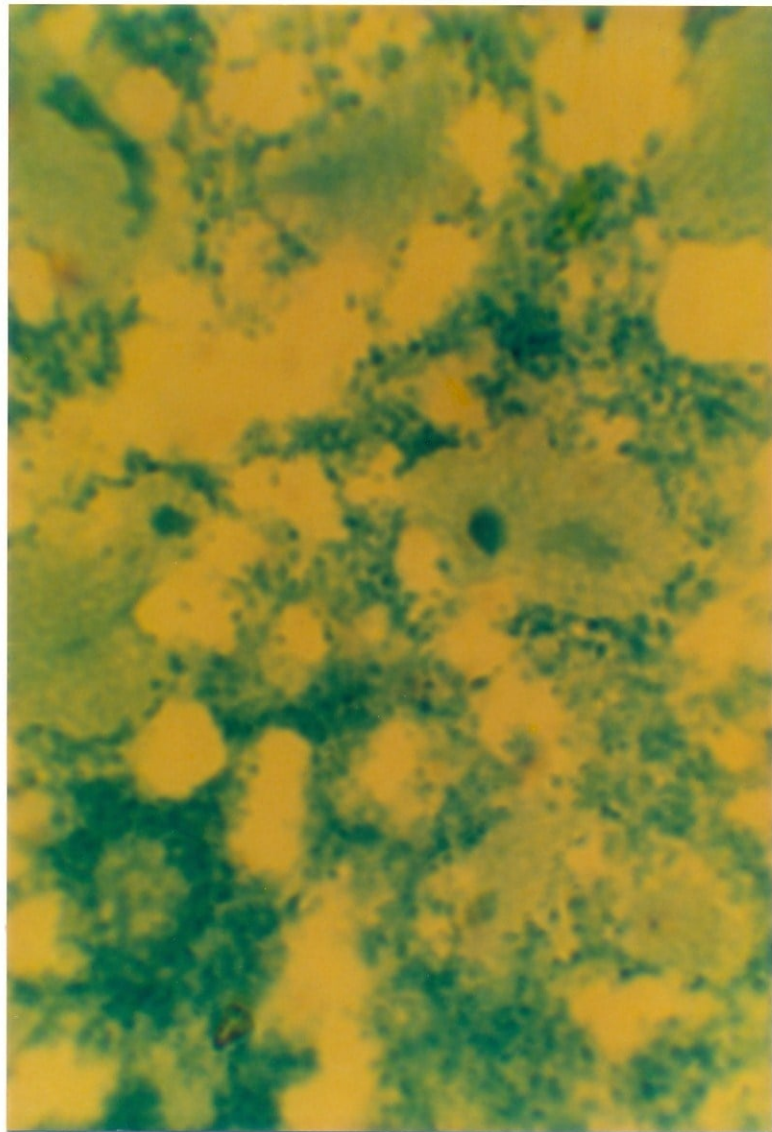


Figura 12 - Detalhe da glândula sexual acessória de teleóquina de B.microplus, mostrando os núcleos e seus nucléolos e os grânulos de proteína básica. Coloração: Fast Green. Aumento: 1000x.

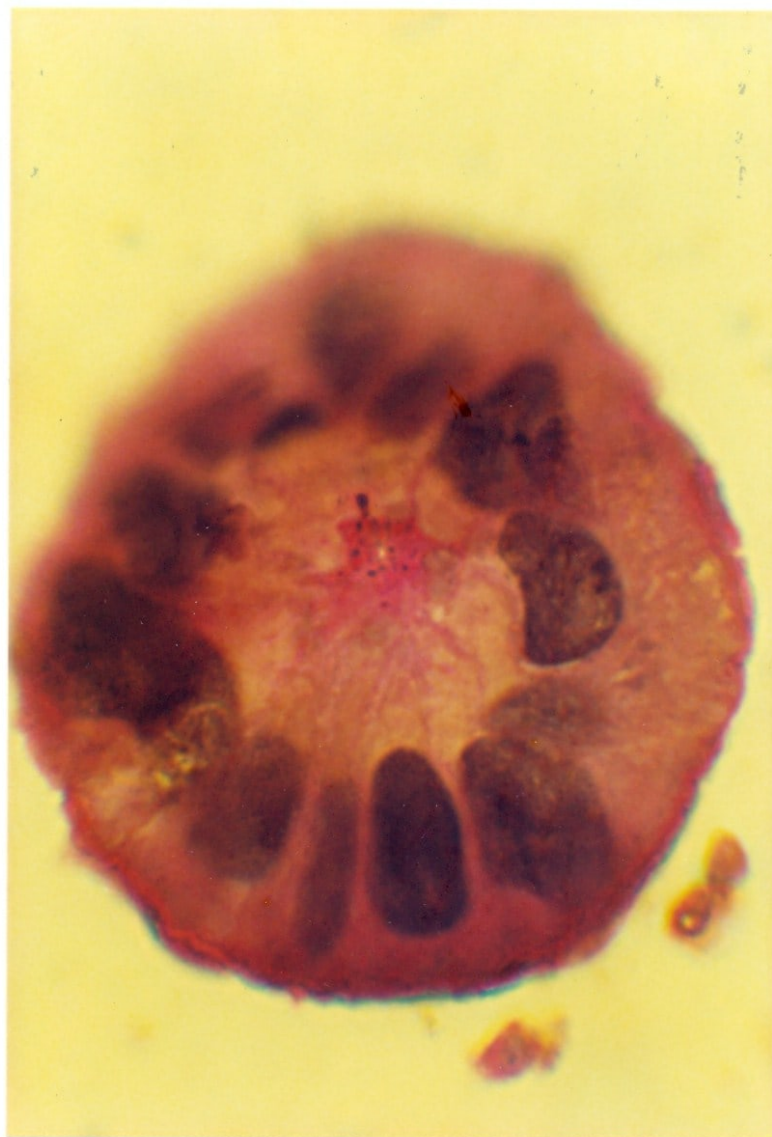


Figura 13 - Corte transversal da glândula sexual acessória de teleógina de B.microplus, demonstrando o material coloidal PAS positivo e os grãos na luz da glândula. A membrana basal respondeu positivamente à técnica. Coloração: PAS. Aumento: 1000x.

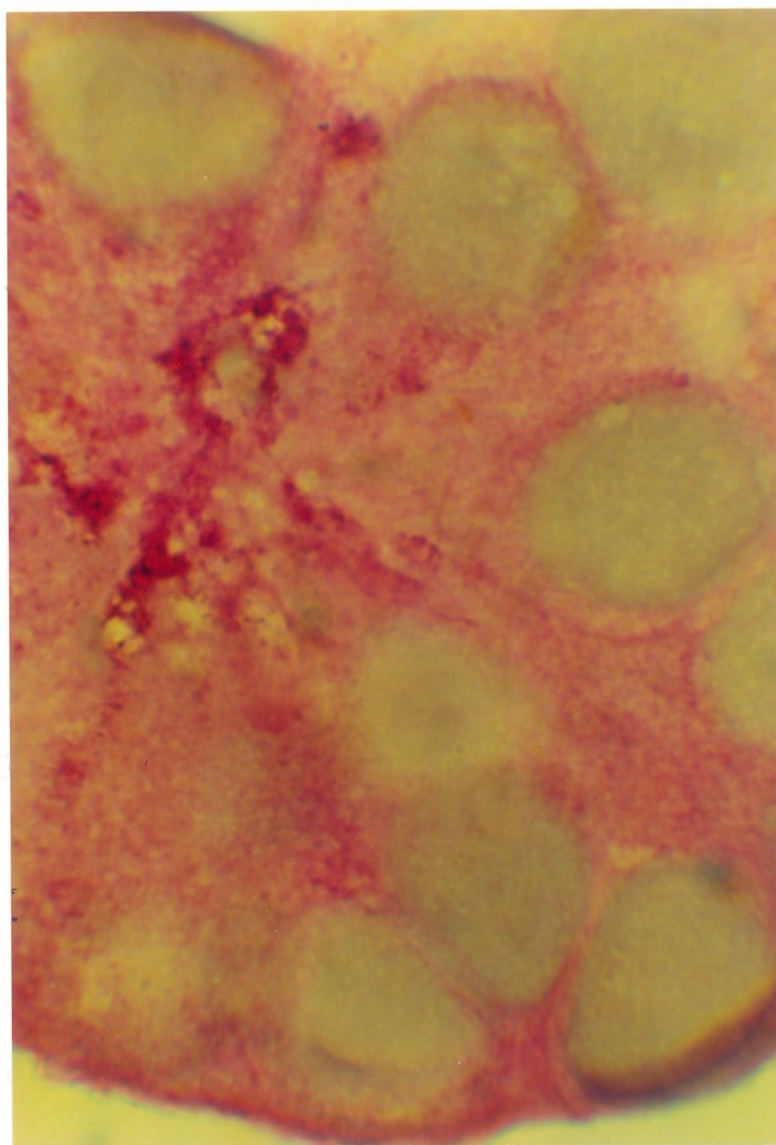


Figura 14 - Corte transversal da glândula sexual acessória de teleóquina de B.microplus, onde observam-se a granulação fina no citoplasma das células e os grânulos grosseiros no lúmen. Coloração: PAS. Aumento: 1000x.



## DISCUSSÃO

Há uma certa variação na morfologia e histologia do aparelho reprodutor feminino entre as espécies de carrapatos. As glândulas sexuais acessórias de B.microplus são exócrinas e tubulares simples como nos demais, entretanto apresentam uma localização diferente daquela da maioria, já que sua vagina é diferente. Geralmente a vagina se divide em duas regiões histologicamente distintas: a vagina vestibular (proximal) e a vagina cervical (distal), e as glândulas tubulares acessórias se abrem na vagina vestibular perto da vagina cervical. Em B.microplus, B.decoloratus, H.spinigera e O.moubata não foram descritas vaginas vestibular e cervical. Em B.microplus, os autores mencionaram a presença de músculos circulares envolvendo toda a vagina, o que leva a crer que não haja, neste animal, uma diferenciação da vagina em porção vestibular e cervical, já que, neste último caso, somente a vagina cervical é envolvida por feixes musculares. Nestas quatro espécies, apesar de algumas diferenças morfológicas do aparelho reprodutor, as glândulas tubulares acessórias abrem-se na porção distal e dorsal da vagina e anteriormente à espermateca e ao útero (quando este é presente).

Com o ingurgitamento, as glândulas sexuais acessórias de B.microplus aumentam de tamanho, o que CHINERY(1965) observou em H.spinigera.

As glândulas tubulares acessórias, nas diversas espécies, são semelhantes histologicamente: um epitélio de células em forma de cunha delimitam um lúmen estreito. Os núcleos destas células são bastante grandes e estão em posição mediana ou submediana. A cromatina é altamente condensada. CHINERY (1965) observou, em H.spinigera, que estes núcleos se tornam vesiculares à medida que a fêmea se ingurgita. Em B.microplus, os núcleos das células secretoras das glândulas sexuais acessórias, inclusive de fêmeas ingurgitadas, não eram vesiculares, eram grandes e com cromatina compacta.

No presente trabalho, foi verificado a presença de dois ou três nucléolos no núcleo das células secretoras das glândulas sexuais acessórias, o que não era mencionado em outras descrições.

O trabalho de LEES & BEAMENT(1948) traz uma fotografia da glândula sexual acessória de O.moubata em corte transversal(Fig. 15), entretanto esta glândula não é analisada em sua histologia no texto, dificultando a comparação com os resultados obtidos em B.microplus. Contudo analisando esta fotografia, constata-se a similaridade da glândula de O.moubata com a de B.microplus no que diz respeito às células secretoras em forma de cunha com núcleos bastante grandes. Notam-se, no lúmen, pequenos pontos, mas não está claro se consistem de núcleos como aqueles identifica-



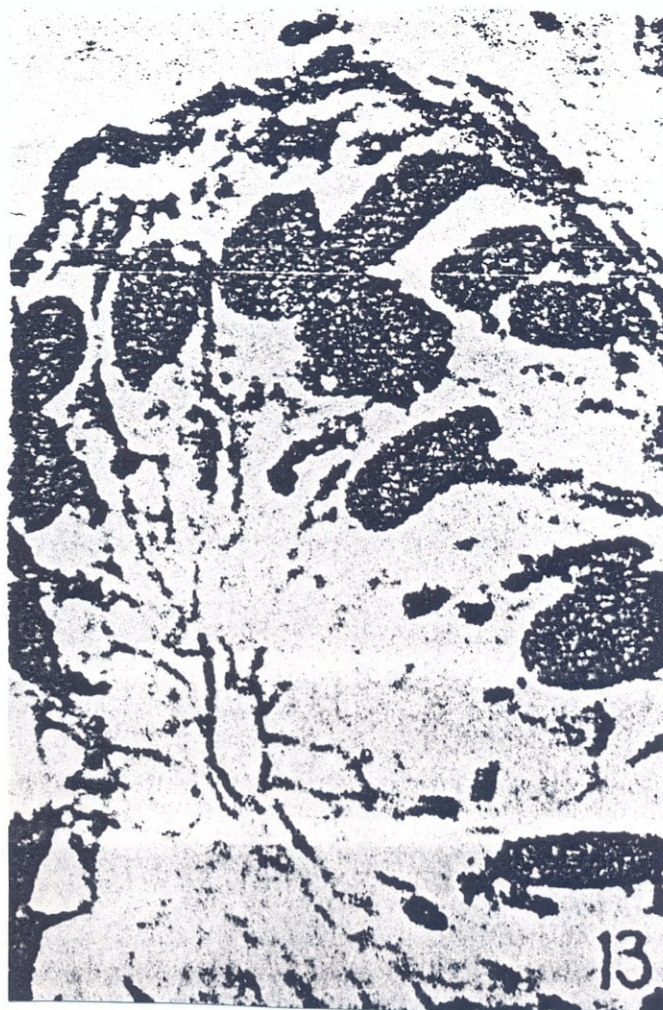


Figura 15 - Corte transversal da glândula sexual acessória de O. moubata, mostrando as células secretoras, pontos no lúmen da glândula, pequenos núcleos entre as células secretoras e células pavimentosas envolvendo a glândula (Reprodução de LEES & BEAMENT, 1948).

Aumento: 210x.

dos no lúmen da glândula de B.microplus e anteriormente mencionados por GARCIA et al(1987). Os núcleos observados junto à luz da glândula sexual acessória de B.microplus são semelhantes aos dos do ducto excretor descritos por GARCIA et al(1987): são pequenos, redondos e com cromatina frouxa, e assim estes núcleos indicam a interiorização do ducto excretor na glândula. Também vê-se pequenos núcleos no espaço das células grandes da glândula sexual acessória de O.moubata. Em B.microplus, também foram observados alguns núcleos pequenos e redondos entre as células glandulares ou mesmo dentro delas. Devido a pouca ocorrência destes núcleos é necessário um estudo mais detalhado, com auxílio de técnicas mais especializadas para se ter um diagnóstico mais preciso sobre a sua relação com as demais células secretoras e sua função.

Nesta fotografia da glândula sexual acessória de O.moubata, pode-se ainda visualizar uma camada de células com núcleos achatados, envolvendo externamente as células secretoras, enquanto, em B.microplus, estes núcleos eram ocasionalmente observados. A presença destes núcleos em B.microplus sugere que eles pertençam possivelmente a células mioepiteliais, que possuem formato irregular e são responsáveis pela contração da glândula para expulsar a secreção, ou ainda a células pavimentosas que envolvem externamente a glândula. Certeza sobre isto somente será obtida em microscopia eletrônica.

KHALIL(1970;1972) e GARCIA et al(1987) mencionaram o revestimento interno do ducto da glândula sexual acessória por cutícula



la, em continuação ao da vagina, entretanto não há menção de um revestimento externo da glândula para esclarecer a membrana externa à membrana basal, visualizada com H/E e PAS. Esta membrana foi observada em algumas lâminas, como se estivesse sofrendo descamação, sugerindo que se tratasse de um revestimento de cutícula.

Grãos acidófilos em abundância no citoplasma das células em cunha já haviam sido observados por GARCIA et al(1987) em B.microplus e por CHINERY(1965) em H.spinigera. CHINERY porém, em fêmeas recém-emergidas, os observou somente nas porções apicais das células. As porções basais das células, segundo este autor, eram basófilas devido à presença do RNA. Nesta investigação sobre B.microplus, animais recém-emergidos não foram considerados, não sendo constatado, portanto, se, neste exemplar, também há esta distinção em duas zonas nas células secretoras. Tal distinção nas porções das células não é mais encontrada nos carrapatos H.spinigera completamente ingurgitados, onde somente grânulos grosseiros, rosa brilhantes com H/E são visualizados.

Os testes histoquímicos realizados no aparelho reprodutor feminino de B.microplus, neste trabalho, demonstraram que os grânulos abundantes no citoplasma das células das glândulas sexuais acessórias consistem de proteínas básicas e polissacarídeos, exceptuando-se os glicosaminoglicânos.

As proteínas básicas são aquelas proteínas constituídas principalmente por aminoácidos básicos, como lisina, histidina e

arginina, enquanto as proteínas ácidas podem ser proteínas básicas associadas a ácidos nucléicos ou a glicosaminoglicanos ou ainda proteínas com uma alta proporção de aminoácidos ácidos, como o ácido glutâmico (CHAYEN et al, 1973; WANNMACHER & DIAS, 1986).

No lúmen, a secreção granular se torna coloidal. Como este colóide se corou levemente para o teste que indica a presença de proteínas básicas (Fast Green a pH=8) e intensamente para polisacarídeos (PAS), constatou-se que sua composição é principalmente glicídica. Grãos com radicais protéicos e com polissacarídeos também foram visualizados no lúmen.

O termo colóide é utilizado para se referir a certas substâncias solúveis, incluindo muitas proteínas, que durante a evaporação de suas soluções, deixam um resíduo amorfo e viscoso, ao invés de cristalino, como ocorre com os cristalóides. As proteínas são colóides liófilos, ou seja, atraem água, ficando em estado de solução (HAM, 1977). As moléculas de uma solução coloidal são demasiadamente grandes para atravessar os poros das membranas celulares, assim a passagem das células secretoras para o lúmen deve se dar na forma de cristalóides.

A resposta negativa ao Alcian Blue a pH=2,5 indica a ausência de glicosaminoglicanos, em especial daqueles fracamente sulfatados e dos não sulfatados (que contêm carboxilas). Segundo BANKS(1986) e WANNMACHER & DIAS(1986), a única glicosaminoglicana não sulfatada é o ácido hialurônico, e este é também a única



glicosaminoglicanô que pode não estar associadô a proteínas. O pH ideal do corante Alcian Blue para a identificação de glicosaminoglicanôs fortemente sulfatadôs é de 1,0, assim estes não foram investigadôs neste trabalho.

A constataçãõ da presença de polissacarídeos pelo PAS e da ausência de glicosaminoglicanôs (não considerando ôs glicosaminoglicanôs fortemente sulfatadôs) pelo Alcian Blue sugere a presença de glicogênio ou de glicoproteínas (proteínas que contêm alguns carboidratos) neutras.

O glicogênio é o único polissacarídeo, além do ácido hialurônico, que pode não estar ligado a proteínas e está presente no organismo dos mamíferos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990). Ele é armazenado sob forma de colóide, não podendo difundir-se através da membrana celular. Para ser transportado pela membrana deve ser degradado a glicose, ou seja, estar na forma de cristalóide. A degradação do glicogênio ocorre sempre que houver deficiência de glicose ou ATP. Acredita-se ainda que o glicogênio esteja associado a proteínas ou a lipídios formando glicoconjugados (WANNMAKER & DIAS, 1986).

A composição protéica dos grânulos também foi mencionada por CHINERY(1965) na glândula de H.spinigera, observando que eram de proteínas básicas, ricas em grupos tirosina. Estes grânulos, entretanto não continham polissacarídeos, já que a resposta ao PAS foi negativa. O material granular também era liberado no lúmen sob a forma de colóide.

Gotas de colóide no lúmen também foram observadas por ROBINSON & DAVIDSON(1914) em A.persicus, DOUGLAS(1943) em D.andersoni e LEES & BEAMENT(1948) em O.moubata.

Não foi identificado material lipídico na glândula sexual acessória de B.microplus, apesar de haver em H.spinigera.

Alguns autores hipotetizaram sobre o papel funcional das glândulas sexuais acessórias. Uma análise sobre estas hipóteses com os resultados obtidos neste trabalho é realizada:

A suposição de ROBINSON & DAVIDSON(1914) de que as glândulas tubulares acessórias fossem responsáveis pela secreção do espermatóforo, dentro do qual entraria as espermátides, torna-se sem fundamento com os conhecimentos obtidos (GALUN & WARBURG, 1967; FELDMAN-MUHSAM & BORUT, 1971; OLIVER et al, 1974; FELDMAN-MUHSAM & BORUT, 1978;1983) após esta data sobre a formação do espermatóforo pelo macho e sua introdução na fêmea.

ROSHDY(1969) sugeriu que a secreção do epitélio da vagina cervical de I.ricinus dissolvesse as paredes do espermatóforo, liberando os espermatozóides. KHALIL(1969;1970) fez a mesma consideração sobre a secreção do epitélio holócrino do útero de A.arboreus e sobre o epitélio glandular do pescoço do receptáculo seminal de H.a.excavatum. Entretanto em B.microplus, como em B.decoloratus (LONDT & SPICKETT, 1976), os espermatóforos não se dissolvem, permanecendo intactos e sendo acumulados na espermateca à medida que são introduzidos na fêmea. Os espermatozóides são liberados pelos ductos, possivelmente pelo ducto grosso que se



comunica com o útero (GARCIA et al, 1987). Assim a secreção das glândulas sexuais acessórias não tem por função dissolver as paredes dos espermatóforos.

O maior desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias com o ingurgitamento e a liberação de sua secreção próximo à oviposição sugerem que a sua função esteja relacionada com a postura.

ROBINSON & DAVIDSON(1914), observando gotas de colóide no lúmen da glândula tubular acessória de A.persicus e DOUGLAS (1943), em D.andersoni sugeriram que a secreção atue como um fluido lubrificante, facilitando a extrusão do ovo através da vagina.

Os resultados obtidos não levam a confirmar esta hipótese, já que não foi verificada a presença de glicosaminoglicanôs. Os glicosaminoglicanôs, pelo seu caráter polianiônico, se ligam à água em grandes quantidades, conferindo aos tecidos viscosidade, elasticidade e resistência e atuando como lubrificantes(BANKS, 1986; WANNMACHER & DIAS, 1986). Esta hipótese contudo poderá ser revista aplicando-se testes para glicosaminoglicanôs fortemente sulfatadôs.

Uma análise da casca do ovo de B.microplus semelhante a realizada por LEES & BEAMENT(1948) sobre a casca do ovo de O.moubata e I.ricinus não foi encontrada na revisão bibliográfica realizada para B.microplus, tampouco a menção da presença ou não da cobertura de cera antes do ovo passar pelo órgão de Gené. Encon-

trou-se apenas um comentário de BOOTH et al(1984) sobre a falta de conhecimento de onde os lipídios da cera são aplicados, sugerindo o oviduto como um dos locais.

Levando-se em consideração que B.microplus pertence à mesma família que I.ricinus é provável que, em B.microplus, também haja a secreção de uma camada incompleta de cera antes do ovo receber a secreção do órgão de Gené. Entretanto deve-se observar que, em I.ricinus, há as glândulas lobadas acessórias, de igual histologia ao órgão de Gené, enquanto em O.moubata, onde estas são ausentes, não há qualquer cobertura do ovo antes de passar pelo órgão de Gené. A vagina e a localização das glândulas tubulares acessórias de O.moubata são mais semelhantes com B.microplus que I.ricinus, já que esta última apresenta vagina cervical e vestibular, enquanto as primeiras, vagina curta, não diferenciada.

A ausência de glândulas lobadas acessórias faz este caso parecer-se assemelhar ao descrito por CHINERY(1965), examinando H.spini-gera, pertencente à família Ixodidae. CHINERY com base na similaridade histoquímica entre as glândulas tubulares acessórias e a glândula do órgão de Gené e a ausência das glândulas lobadas acessórias, sugeriu que a primeira pudesse realizar parte da secreção de cera que cobre o ovo. Assim também pode-se supor que as glândulas sexuais acessórias de B.microplus realizem a secreção de parte da cobertura do ovo.

Como não foi identificado material lipídico nas glândulas



sexuais acessórias, deduz-se que os lipídios presentes em grande quantidade na cera do ovo de B.microplus não sejam oriundos destas glândulas. Também não são provenientes dos ovidutos como BOOTH et al (1984) colocaram como alternativa, já que até este local o ovo, se for de igual estrutura ao de O.moubata e de I.ricinus, possui somente a membrana primária secretada pelo oócito, denominada por LEES & BEAMENT (1948) por "camada da casca" interna e uma camada incompleta de grânulos com grupos aldeídos, que surge logo após a ovulação. Após a passagem do ovo pelas glândulas sexuais acessórias, o ovo de B.microplus recebe ainda a secreção das glândulas vaginais, das glândulas acessórias do órgão de Gené e do órgão de Gené. Então estas três estruturas podem ser responsáveis pela secreção dos lipídios da cera do ovo. É conhecido que o produto principal das células do órgão de Gené é lipoprotéico, enquanto a ultraestrutura das células das glândulas acessórias do órgão de Gené é característica de células que sintetizam lipídios (BOOTH et al, 1984).

## CONCLUSÕES

- As glândulas sexuais acessórias de B.microplus são um par de glândulas exócrinas, tubulares simples, cujos ductos se abrem dorso-lateralmente na vagina.

- São constituídas por células em forma de cunha ou colunas, com núcleos grandes, ovóides, com dois ou três nucléolos e cromatina compacta, situados mediana ou submedianamente.

- Núcleos pequenos, redondos e com cromatina frouxa junto à luz da glândula sugerem a interiorização do ducto excretor na glândula.

- Núcleos achatados, de pouca ocorrência, adjacentes à porção basal das células secretoras <sup>que</sup> podem pertencer a células mioepiteliais ou a células pavimentosas.

- Uma membrana externa à membrana basal pode indicar um revestimento externo cuticular da glândula.

- Os grânulos abundantes no citoplasma da glândula sexual acessória são compostos por proteínas básicas e polissacarídeos.

- No lúmen, a secreção granular se torna coloidal, e esta é constituída principalmente por polissacarídeos. Grãos protéi -



cos e polissacarídicos também foram visualizados na luz da glândula.

- A secreção das glândulas sexuais acessórias pode ser parte da cobertura do ovo ou talvez atuar como lubrificante, facilitando a extrusão do ovo pela vagina. Para a segunda hipótese testes para glicosaminoglicanôs fortemente sulfatadôs deverão ser realizados.

- A ausência de lipídios na composição da secreção das glândulas indica que os lipídios em abundância na cera do ovo de B.microplus não sejam oriundos destas glândulas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, R.U.; GONZALES, J.C. A postura e a viabilidade de Boophilus microplus (Canestrini, 1887)(Acarina, Ixodidae) em condições de laboratório. Rev.Lat.amer.Microb., v.21, p.31-36, 1979.
- ARTHUR, D.R. Ticks and Disease. Oxford: Pergamon Press, 1962. p.170-213: Reproduction, Development and Life Histories.
- ATKINSON, P.W.; BINNINGTON, K.C. New evidence on the function of the porose areas of ixodid ticks. Experientia, v.29, p.799-800, 1973.
- BANKS, W.J. Applied Veterinary Histology. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p.76-91: Extracellular Matrix.
- BOOTH, T.F.; BEADLE, D.J.; HART, R.J. Ultrastructure of the accessory glands of Gene's organ in the cattle tick, Boophilus. Tissue & Cell, v.16, n.4, p.589-599, 1984.
- CERNY, V.; DE LA CRUZ, J. Development and survival of the tick Boophilus microplus (Can.) in laboratory and under natural conditions of Cuba. Folia Parasitol., v.18, p.73-78, 1971.
- CHAYEN, J.; BITENSKY, L.; BUTCHER, R.G. Practical Histochemistry. London: John Wiley & Sons, 1973. p.30-98: The Analysis of Chemical Components of Cell and Tissues.
- CHERRY, L.M. Cholesterol in the cuticular wax of B.microplus. Nature, v.222, p.777, 1969.
- \_\_\_\_\_. Utilization of cholesterol by the cattle tick, B.microplus;



cholesterol economy in the engorged female adult. Insect Biochem., v.6, p.587-594, 1976.

CHINERY, W.A. Studies on the various glands of the tick Haemaphysalis spinigera Neumann, 1897. Part II. Studies on the ovary, oviduct, tubular accessory genital gland and Gage's organ. Acta Trop., v.22, n.3, p.247-266, 1965.

DOUGLAS, J.R. The internal anatomy of Dermacentor andersoni Stiles. Univ.Calif.Publ.Entomol., v.7, p.207-272, 1943.

FELDMAN-MUHSAM, B. Function of the areolae porosae of ixodid ticks. Nature, v.187, p.100, 1963.

FELDMAN-MUHSAM, B.; BORUT, S. Copulation in Ixodid ticks. J.Parasitol., v.57, n.3, p.630-634, 1971.

\_\_\_\_\_. Further observations on the spermatophore formation in Argasid ticks. J.Insect Physiol., v.24, p.693-697, 1978.

\_\_\_\_\_. On the spermatophore of Ixodid ticks. J.Insect Physiol., v.29, n.5, p.449-457, 1983.

GALUN, R.; WARBURG, M. Studies on the reproductive physiology of the tick Ornithodoros tholozani. The effect of mating on oogenesis. Vestn.Cesk.Spolecnosti, v.31, n.4, p.329-334, 1967.

GARCIA, C.F.; GARCIA, S.L.de; SILVA, V.M.da. Morfoanatomia e histologia do aparelho reprodutor feminino de Boophilus microplus (Acari, Ixodidae). Acta Biol.Par., v.6, n.1,2,3,4, p.1-13, 1987.

HAM, A.W. Histologia. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. p.2-20: Microscopia e Biologia de Células.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p.15-21: Histoquímica e Citoquímica.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1.ed. São Paulo: Santos, 1983. pp.69-84: Métodos Histoquímicos e Citoquímicos.

- 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., v.55, n.6, p.1287-1297, 1969.
- \_\_\_\_\_. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Gonad development and gametogenesis in Hyalomma (H.) anatolicum excavatum Koch (Ixodidae). J.Parasitol., v.56, n.3, p.596-610, 1970.
- \_\_\_\_\_. Gonad development in the partenogenetic Haemaphysalis (Kaiseriana) longicornis Neumann (Ixodoidea: Ixodidae). J.Parasitol., v.58, n.4, p.817-823, 1972.
- LAHILLE, F. Contribution à l'étude des ixodidés de la République Argentina. Buenos Aires: División de Ganaderia, Zoología y Policía Veterinaria, 1904. 166p.
- LEES, A.D.; BEAMENT, J.W.L. An egg-waxing organ in ticks. Quart. J.Micr.Sci., v.89, p.291-332, 1948.
- LONDT, J.G.H.; SPICKETT, A.M. Gonad development and gametogenesis in Boophilus decoloratus (Koch, 1844) (Acarina: Metastriata: Ixodidae). Onderstepoort J.Vet.Res., v.43, n.3, p.79-96, 1976.
- MAIA, V. Compêndio de Estudos Histológicos. Recife: Imprensa Universitária, 1967. v.1: Técnica Histológica. p.149.
- MCCAMISH, M.; CANNELL, G.A.; CHERRY, L.M. The nonpolar egg wax lipids on the cattle tick B.microplus (Canestrini). Lipids, v.12, p.182-187, 1977.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.de C. Práticas de Biologia Celular. São Paulo: Edgar Blücher, 1980. 69p.
- MORÁN, C.G.R. Investigaciones realizadas en el campo de la parasitología veterinaria. Ministerio de Desarrollo Agropecuario/ Universidad de Panama, 1976. p.5-56.
- OLIVEIRA, G.P. Relação entre o peso da postura e o peso da fê -



mea ingurgitada de B.microplus (Can.)(Acarina:Ixodidae). Cien-tífica, v.7, n.2, p.273-276, 1979.

OLIVER, J.H.; AL-AHMADI, Z.; OSBURN, R.L. Reproduction in ticks 3.Copulation in Dermacentor occidentalis Marx and Haemaphysa - lis leporispalustris (Packard)(Ixodidae). J.Parasitol., v.60, p.499-506, 1974.

OLIVER, J.H., Jr.; MURPHY, R.W.; OBENCHAIN, F.D. Reproduction in ticks (Acari:Ixodoidea). 4.Effects of mechanical and chemical stimulation on oocyte development in Amblyomma americanum. J.Parasitol., v.61, n.4, p.782-784, 1975.

PEREIRA, M. de C. Boophilus microplus: Revisão Taxonômica e Morfo-Biológica. Rio de Janeiro: Químico, 1982. p.1-105.

ROBINSON, L.E.; DAVIDSON, J. The anatomy of Argas persicus(Oken, 1818). Part 3. Parasitology, v.6, p.382-424, 1914.

ROMEIS, B. Guia Formulario de Técnica Histológica. Barcelona: Labor, 1928. p.250.

ROSHDY, M.A. Structure of the female reproductive system of Ixodes to other Ixodid genera. J.Parasitol., v.55, n.5, p.1078 - 1083, 1969.

WANNMACHER, C.M.D.; DIAS, R.D.(Eds.). Bioquímica Fundamental. 6.ed. Porto Alegre: Departamento de Bioquímica/UFRGS, 1986. 556p.