
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

**DESCRIÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA DOS
TESTÍCULOS DE *Amblyomma cajennense*
EM JEJUM E ALIMENTADOS**



Rio Claro
2012

LUÍS ADRIANO ANHOLETO

**DESCRIÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE
Amblyomma cajennense EM JEJUM E ALIMENTADOS**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo

Co-orientador: Dr. Pablo Henrique Nunes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2012

595.42 Anholeto, Luís Adriano
A596d Descrição morfo-histológica dos testículos de *Amblyomma*
cajennense em jejum e alimentados / Luís Adriano Anholeto. - Rio Claro :
[s.n.], 2012
54 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Souza Camargo
Co-Orientador: Pablo Henrique Nunes

1. Ácaro. 2. Carrapato. 3. Histologia. 4. Ixodidae. 5.
Espermatogênese. I. Título.

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

Dedico esse trabalho a todos que, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos com ele e
contribuíram para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, avós e tios pela dedicação e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo pelas oportunidades, pela confiança, paciência, amizade, conselhos e, principalmente, por acreditar no meu potencial e tornar esse trabalho possível.

Ao meu co-orientador Dr. Pablo Henrique Nunes por ter me acompanhado ao longo desse trabalho, pelos ensinamentos, discussões, esclarecimentos e por estar sempre presente e disposto a ajudar. Muito obrigado.

Aos meus amigos e membros do Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology – BCSTM, UNESP – Rio Claro, SP, Brasil, pelo acolhimento e apoio, especialmente ao Rafael Remédio pelas orientações, pelos conselhos e por estar sempre disposto a ajudar, à Gislaine Roma pelo apoio e conselhos e à Patrícia Oliveira e Karim Furquim por terem me ajudado em tudo que precisei.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios de Microscopia Eletrônica e de Histologia por todo apoio técnico essencial para a realização desse trabalho, em especial ao Gerson pelos momentos de (muita) descontração.

A todos os professores que estiveram envolvidos direta ou indiretamente com a minha graduação e compartilharam seus conhecimentos, os quais com certeza foram essenciais para a minha formação pessoal e profissional.

Aos meus amigos do CBN08, pela amizade e convivência ao longo desses anos. Nunca esquecerei vocês.

Aos meus amigos Amanda Ribeiro, Maria Claudia Vendramini e Thelma Böerner pelos segredos confidenciais, pelos sorrisos compartilhados, pelas lágrimas enxugadas e por estarem sempre presentes. Amo vocês.

Aos meus amigos Raphael e Mariana pela amizade e apoio.

A todos que participaram direta ou indiretamente da minha formação e que, por ventura, possa ter esquecido de citar.

RESUMO

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos de grande importância epidemiológica, pois são vetores de muitos patógenos. Esses animais pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, são classificados em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nutalliellidae, apresentam ampla distribuição geográfica e podem parasitar grande variedade de vertebrados, inclusive o homem. O carrapato da espécie *Amblyomma cajennense*, popularmente conhecido como carrapato-estrela, carrapato do cavalo ou rodoleiro, tem grande importância médica por ser vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa brasileira (FMB), que pode levar o hospedeiro a óbito. Apesar das crescentes pesquisas com esses animais, ainda existem lacunas na literatura acerca de alguns de seus processos reprodutivos. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo estudar o desenvolvimento dos testículos dessa espécie por meio da descrição da morfologia e histologia dos testículos de indivíduos em jejum e alimentados, identificando a dinâmica do processo de espermatogênese e se a alimentação influencia nesse processo. Os resultados obtidos mostraram que os testículos são estruturas pares e tubulares arrançadas dorsolateralmente no opistossoma, sendo que a região proximal está conectada às vesículas seminais pelos ductos deferentes, semelhante ao observado em outras espécies de ixodídeos. Associado ao aparelho genital masculino encontra-se um complexo de glândulas acessórias multilobuladas. Foi constatado que a alimentação tem papel fundamental no desenvolvimento do sistema reprodutor, visto que nos indivíduos em jejum as vesículas seminais e o complexo de glândulas acessórias foram menores e menos desenvolvidos do que nos animais alimentados. Além disso, as espermátides alongadas, precursoras dos espermatozoides no trato reprodutor feminino, só foram observadas nos indivíduos alimentados. As células germinativas, presentes no testículo de *A. cajennense*, encontraram-se organizadas em espermatocistos, revestidos por tecido conjuntivo. Observou-se que o desenvolvimento acontece da região distal para a proximal (próxima aos ductos deferentes) e que as células na região distal sempre em estágios mais avançados do processo de espermatogênese em relação àquelas da região proximal. Esse padrão foi diferente do observado em outros artrópodes.

Palavras-chave: Histologia. Carrapato. Ixodidae. Espermatogênese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Material.....	10
3.1.1 Carrapatos	10
3.1.2 Laboratórios	10
3.2 Métodos	10
3.2.1 Obtenção do material	10
3.2.2 Histologia.....	11
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	11
4. RESULTADOS	12
4.1 Morfologia dos testículos	12
4.2 Histologia	12
4.2.1 Carrapatos em jejum	12
4.2.2 Carrapatos alimentados.....	13
4.2.2.1 Carrapatos com um dia após liberação no hospedeiro.....	13
4.2.2.2 Carrapatos com dois dias após liberação no hospedeiro.....	13
4.2.2.3 Carrapatos com três dias após liberação no hospedeiro.....	14
4.2.2.4 Carrapatos com quatro dias após liberação no hospedeiro	14
4.2.2.5 Carrapatos com cinco dias após liberação no hospedeiro.....	14
4.2.2.6 Carrapatos com seis dias após liberação no hospedeiro	15
4.2.2.7 Carrapatos com sete dias após liberação no hospedeiro	15
4.2.2.8 Carrapatos com oito dias após liberação no hospedeiro	16
4.2.2.9 Carrapatos com nove dias após liberação no hospedeiro.....	16
4.2.2.10 Carrapatos com dez dias após liberação no hospedeiro	16
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	54

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos, um dos grupos de maior importância entre os artrópodes, são ectoparasitas sugadores de sangue e com grande importância epidemiológica, por serem vetores de muitos patógenos como vírus, bactérias e protozoários (SONENSHINE, 1991).

Esses animais pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, sendo classificados em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Eles apresentam ampla distribuição geográfica e podem parasitar grande variedade de vertebrados, selvagens e domésticos como aves, répteis, anfíbios e mamíferos, inclusive o homem (SAUER et al., 1996; CRAMPTON, 1996; NAVA et al., 2009).

Os machos dos ixodídeos apresentam um escudo que cobre todo o dorso do animal estendendo-se até o bordo do opistossoma. Nas fêmeas, ninfas e larvas esse escudo é reduzido, não ultrapassando o propodossoma. Esses animais fixam-se no hospedeiro realizando um longo repasto em cada fase do ciclo de vida (larval, ninfal e adultos), muito embora os machos tenham um comportamento diferenciado, uma vez que podem fixar-se e desprender-se por várias vezes num mesmo hospedeiro. A postura dos ovos é única e realizada no solo, após a fêmea ter sido fecundada e estar ingurgitada (repleta de sangue) (FLECHTMANN, 1985).

O carrapato adulto da espécie *Amblyomma cajennense*, popularmente conhecido como carrapato-estrela, carrapato do cavalo ou rodoleiro, tem grande importância médica, principalmente por ser vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), também conhecida como febre das Montanhas Rochosas ou Febre do Carrapato, a qual pode levar o hospedeiro a óbito. Essa espécie de carrapato encontra-se amplamente distribuída no continente americano, sobretudo nas zonas mais quentes e pode ser encontrada, em todas as fases do ciclo de vida, em aves domésticas como galinhas, perus e silvestres como seriemas, que vivem em locais infestados por esses carrapatos, além de numerosos mamíferos como cavalo, boi, carneiro, cabra, cão, porco, capivara. O homem é intensamente atacado pelo *A. cajennense* em todas as fases do ciclo, sobretudo pelas larvas e ninfas. É uma praga muito abundante nos campos e invernadas nas estações secas e menos quentes (COOLEY; KOHLS, 1944; FLECHTMANN, 1985).

As fêmeas de *A. cajennense*, após atingir o completo ingurgitamento, com cerca de 10 dias de fixação no hospedeiro, desprendem-se e realizam postura de cerca de seis a oito mil ovos no solo antes de morrerem. Após o período de incubação, que dura de 30 a 70 dias, as larvas (micuins) eclodem e passam por um período de jejum até encontrarem seu primeiro

hospedeiro. Encontrando-o, elas se fixam e se alimentam por três a seis dias e depois se desprendem e caem no solo para sofrerem a muda. Dessa muda, surgem ninfas que num novo hospedeiro vão se fixar e se alimentar por cerca de seis dias. Ingurgitadas, elas se soltarão e cairão no solo, onde passarão por nova muda. Após aproximadamente 25 dias, emergirão os adultos que, depois de cinco a sete dias, estarão aptos a procurar um novo hospedeiro para nele se alimentarem e copularem (FLECHTMANN, 1985).

Os carrapatos são animais dioicos com singamia interna e a forma mais comum de reprodução é a sexual. Um macho sexualmente maduro é atraído pela fêmea, que libera um feromônio percebido por receptores localizados nos palpos. Ele então sobe nas costas da fêmea, rasteja-se em torno da extremidade posterior para o lado ventral, até encontrar a abertura genital com o auxílio do seu aparelho bucal. Com os ventres em contato, o macho dobra suas pernas com as da fêmea e o casal permanece imóvel (SAUER; HAIR, 1986; COONS; ALBERTI, 1999; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

Durante a cópula, a transferência do esperma para a fêmea se dá por meio de um espermatóforo. Nos carrapatos, ele é formado externamente no gonóporo do macho após a localização do gonóporo da fêmea. O macho libera, primeiramente, uma gota contendo glicosaminoglicanos e proteínas para fora da abertura genital. Posteriormente, uma massa de esperma e líquido espermático é ejaculada dentro dessa gota, que se expande como um “balão”. Em seguida, o endoespermatóforo é injetado fechando esse “balão”. (SAUER; HAIR, 1986; COONS; ALBERTI, 1999; KISZEWSKI et al., 2001; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

O espermatóforo dos carrapatos possui formato de pera e é composto por três camadas externas, o ectoespermatóforo, que envolve os outros componentes como o líquido espermático, espermatozoides, grânulos de proteínas, simbiontes e o endoespermatóforo (SAUER; HAIR, 1986; COONS; ALBERTI, 1999; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

Hayes et al. (1980) sugerem que pode ocorrer transmissão da *Rickettsia rickettsii* de machos infectados para fêmeas saudáveis durante a cópula, o que representa importância ecológica na manutenção dos patógenos causadores da Febre Maculosa na natureza.

Os testículos dos carrapatos são estruturas pares e tubulares arrançadas dorsolateralmente no opistossoma e, em algumas espécies, são conectadas na região posterior por um tecido conjuntivo. Os primeiros estágios da espermatogênese nos testículos de machos adultos e alimentados acontecem da região distal em direção à proximal. As células germinativas em desenvolvimento estão arrançadas em espermatocistos revestidos por células

somáticas (tecido conjuntivo) e dentro de cada espermatocisto as células encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento. Em cada testículo há um pequeno canal (lúmen), por onde as espermátides alongadas são descarregadas e atingem a região proximal dos testículos, início dos ductos deferentes. Esses ductos são conectados às vesículas seminais que estão conectadas, ainda, a um complexo de glândulas acessórias multilobuladas (COONS & ALBERTI, 1999; SONENSHINE, 1991).

Os testículos passam por variações dependendo do estágio de alimentação e reprodução, ficando menores e mais finos nos machos jovens em jejum e longos e espessos, nos alimentados, especialmente na região posterior (COONS; ALBERTI, 1999; MATSUO; MÖRI, 2000).

A espermatogênese dos Ixodídeos inicia-se na fase ninfal, quando divisões mitóticas ocorrem nas espermatogônias localizadas nas extremidades distais dos testículos, onde são formados os espermátócitos primários. As espermátides, que se desenvolvem a partir dessas células, rompem a membrana do espermatocisto para atingirem os órgãos de armazenamento. Diferentemente dos insetos, onde o espermatocisto localizado mais próximo do ducto ejaculatório desenvolve-se primeiro, nos carrapatos os espermatocistos em estágios mais avançados de desenvolvimento encontram-se mais distantes da vesícula seminal (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; OLIVEIRA et al., 2012).

Após a ecdise dos adultos, as células germinativas param seu desenvolvimento na última prófase dos espermátócitos primários com retomada somente após o macho encontrar e fixar-se em um hospedeiro. Acredita-se que um estímulo hormonal seja um pré-requisito para a retomada da atividade celular, porém os agentes e os mecanismos responsáveis por esses processos são ainda desconhecidos (KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001; MATSUO; MÖRI, 2000).

A espermiogênese, etapa final da espermatogênese, ocorrerá dentro do endoespermatóforo após a evaginação do espermatóforo no trato genital da fêmea, onde os espermatozoides adquirirão mobilidade e estarão capacitados para fecundar os óvulos (KISZEWSKI et al., 2001).

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi estudar o desenvolvimento dos testículos do carrapato da espécie *Amblyomma cajennense*, por serem essas informações inexistentes na literatura. Será avaliada a morfo-histologia dos testículos de indivíduos em jejum e alimentados, estabelecendo-se a dinâmica da espermatogênese e fazendo-se a correlação com o provável papel da alimentação nesse processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 Material

3.1.1 Carrapatos

Para a realização do presente trabalho foram utilizados carrapatos adultos, machos e fêmeas, da espécie *Amblyomma cajennense*, mantidos em colônia estabelecida pelo grupo Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology (BCSTM) no Biotério do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Rio Claro - SP, Brasil. Para a manutenção da colônia, foram utilizados como hospedeiros coelhos New Zealand White pesando em média 1,5Kg que receberam ração apropriada para a espécie e água “*ad libitum*”.

Os carrapatos, nas fases de não parasitismo, foram acondicionados em estufa BOD a 27°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 12 horas. Depois, no dorso dos hospedeiros e dentro de câmaras de pano, os mesmos foram alimentados.

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal – CEUA – IB – UNESP – CRC, Rio Claro, SP, Brasil sob protocolo nº 942/2012 (Anexo).

3.1.2 Laboratórios

Os estudos morfológicos e histológicos foram realizados nas dependências dos laboratórios de Histologia e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia do IB, UNESP, Campus de Rio Claro – SP.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do material

Após as ninfas sofrerem a muda, os adultos emergentes foram mantidos em estufa BOD durante 10 dias. Em seguida, foram realizadas as infestações utilizando-se dois coelhos que tiveram o dorso tricotomizado e as câmaras de pano fixadas. Após 24 horas, foram liberados 30 casais de *A. cajennense* em cada câmara, as quais foram fechadas e 24 horas depois foram retirados três machos por dia, durante 10 dias, sendo que todos os machos coletados encontravam-se fixados no hospedeiro. Depois de coletados, os mesmos foram dissecados (três machos em jejum para cada uma das técnicas aplicadas). Tanto os machos em jejum como os alimentados foram anestesiados em freezer (choque térmico) e dissecados em solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS (NaCl 7.5 g/L, Na₂HPO₄ 2.38 g/L e KH₂PO₄

2.72 g/L) sob estereomicroscópio, onde tiveram os testículos retirados e depois fixados e processados de acordo com as técnicas descritas a seguir.

3.2.2 Histologia

Para a realização da análise histológica, os testículos foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas. Em seguida, foram transferidos para solução de tampão fosfato de sódio onde permaneceram por mais 24 horas. Na sequência, foram desidratados em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% (banhos de 30 minutos cada), embebidos em resina (JB-4 Polaron Instruments/Bio Rad) por 24 horas e incluídos em moldes plásticos contendo resina mais polimerizador. Após esse processo, os blocos foram seccionados em micrótomo Sorvall JB-4/Bio Rad de onde foram obtidas secções de três micrometros, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas.

As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante cinco minutos. Depois de lavadas por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, também por cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre, em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e, em seguida, foram cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz LEICA DM750.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a dissecação, os testículos foram fixados na mistura de Karnovsky. Na sequência, foram desidratados em série alcóolica de 70 a 100%, além de dois banhos de acetona PA durante 15 minutos cada. Após a dessecação em ponto crítico, foram colados com fita adesiva dupla face em suportes de alumínio, metalizados com ouro em “Sputtering”, examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Philips Hitachi TM3000.

4. RESULTADOS

4.1 Morfologia dos testículos

Os resultados obtidos confirmam que os testículos dos carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* são estruturas tubulares pares dispostas dorsolateralmente no opistossoma (Fig. 1A-B, 2A). A região proximal dos testículos está conectada à vesícula seminal pelos ductos deferentes (Fig. 1A-B, 2A, C), por onde desembocam as espermátides alongadas, que darão origem aos espermatozoides capacitados no trato reprodutor da fêmea. O aparelho genital masculino dessa espécie apresenta, junto às vesículas seminais, um complexo de glândulas acessórias multilobuladas (Fig. 1C, 2B).

Nos indivíduos alimentados, os testículos e as glândulas acessórias são mais desenvolvidos em relação àqueles em jejum, os quais possuem testículos com diâmetro menor (Fig. 2A) e com a superfície rugosa, podendo-se observar os espermatozoides em formação (Fig. 2D). Já os testículos dos animais alimentados apresentam superfície lisa e regular (Fig. 1D).

4.2 Histologia

Por meio da análise histológica, pode-se dividir o testículo em três regiões de desenvolvimento sendo considerada: a) proximal - a região em contato com os ductos deferentes, próximos à vesícula seminal, b) mediana - a região intermediária e c) distal - a região posterior, próxima à extremidade final do testículo.

4.2.1 Carrapatos em jejum

O complexo glandular e as vesículas seminais estão revestidos externamente por epitélio simples escamoso (Fig. 3A) e ambos apresentam lúmen estreito com pouca secreção em seu interior (Fig. 3A).

As células da linhagem germinativa desenvolvem-se da região distal em direção a proximal. Nos carrapatos em jejum observa-se que a região proximal apresenta células arredondadas e núcleo com cromatina dispersa, e não estão organizadas em espermatozoides (Fig. 3B, C). Na região mediana, as células são arredondadas, apresentando núcleo com cromatina condensada e encontram-se alojadas em espermatozoides (Fig. 3DE). Na região distal, as células germinativas são maiores em relação às outras regiões, possuem cromatina

menos condensada e estão arranjadas em espermatocistos que se encontram mais desenvolvidos e revestidos externamente por fina camada de tecido conjuntivo (Fig. 3F).

4.2.2 Carrapatos alimentados

4.2.2.1 Carrapatos com um dia após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após um dia de alimentação no hospedeiro, pode-se observar que tanto as vesículas seminais como as glândulas acessórias apresentam lúmen mais dilatado em relação àqueles em jejum (Fig. 4A), com secreção em seu interior (Fig. 4A).

Na região proximal, as células germinativas são arredondadas, com núcleo com cromatina condensada e homogeneamente distribuída (Fig. 4B-C). Estas se encontram em pequenos espermatocistos (Fig. 4B-C), revestidos por tecido conjuntivo (Fig. 4C). Na região mediana, as células germinativas estão dispostas em espermatocistos mais desenvolvidos (Fig. 4D) e são arredondadas e maiores que as da região proximal, apresentando núcleo com cromatina menos condensada (Fig. 4D). Na região distal, as células são arredondadas, maiores em relação às outras regiões do testículo, com núcleo com cromatina pouco condensada, e estão arranjadas em espermatocistos maiores e mais desenvolvidos em relação às outras regiões (Fig. 4E-F). É possível observar, ainda, um estreito lúmen entre os espermatocistos dessa região (Fig. 4E-F).

4.2.2.2 Carrapatos com dois dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após dois dias de alimentação no hospedeiro, nota-se que tanto as vesículas seminais como as glândulas acessórias apresentam lúmen com diâmetro semelhante aos indivíduos coletados com um dia, ainda com pouca secreção em seu interior (Fig. 5A). Na região proximal, assim como nos machos com um dia após liberação, as células possuem núcleo menor com cromatina muito condensada homogeneamente distribuída. Essas células estão arranjadas em pequenos espermatocistos (Fig. 5B). Na região mediana, as células são arredondadas e maiores do que as anteriores, com núcleo com cromatina menos condensada e também estão arranjadas em espermatocistos (Fig. 5C). Na região distal, observam-se células arredondadas e maiores em relação às outras regiões do testículo, com núcleo com cromatina pouco condensada, e estão organizadas em espermatocistos ainda maiores que os das outras duas regiões (Fig. 5D).

4.2.2.3 Carrapatos com três dias após liberação no hospedeiro

Nos animais coletados após três dias de alimentação, observa-se que as regiões do complexo de glândulas acessórias e das vesículas seminais apresentam lúmen mais dilatado em relação aos em jejum e coletados com um e dois dias (Fig. 6A). As glândulas acessórias possuem células maiores e mais volumosas, com núcleos ovalados e cromatina bem condensada (Fig. 6A). As vesículas seminais possuem células menores, com núcleo ovalado e cromatina bem condensada (Fig. 6A). A região proximal do testículo é constituída de células germinativas arredondadas e menores em relação às regiões mediana e distal, com cromatina bem condensada homogeneamente distribuída por todo núcleo e estão dispostas em pequenos espermatocistos (Fig. 6B-C). Na região mediana as células são arredondadas e maiores que as da distal, com núcleo com cromatina pouco condensada e estão organizadas em espermatocistos maiores e mais desenvolvidos (Fig. 6D-E). Na região distal, as células arredondadas são maiores em relação às outras regiões de desenvolvimento, com núcleo com cromatina pouco condensada e estão dispostas em espermatocistos maiores e bem delimitados (Fig. 6F), com células em processo de divisão, porém ainda unidas por pontes citoplasmáticas (Fig. 6F).

4.2.2.4 Carrapatos com quatro dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após quatro de alimentação, verifica-se que as glândulas acessórias e as vesículas seminais apresentam lúmen dilatado (Fig. 7A). Na região proximal, nota-se que as células germinativas são pequenas com núcleos arredondados e cromatina condensada, arranjadas em espermatocistos bem desenvolvidos (Fig. 7B). Na região mediana, as células arredondadas são maiores, com núcleo com cromatina pouco condensada, dispostas em espermatocistos maiores que os da região proximal (Fig. 7C). A região distal apresenta células arredondadas ainda maiores, com núcleo com cromatina pouco condensada, organizadas em espermatocistos maiores que os das outras regiões, podendo-se notar as células do tecido conjuntivo que os delimitam (Fig. 7D).

4.2.2.5 Carrapatos com cinco dias após liberação no hospedeiro

Nos animais coletados com cinco dias de alimentação, observa-se que o complexo glandular e as vesículas seminais estão bem desenvolvidos, com um lúmen

muito dilatado (Fig. 8A-B). É possível observar grande quantidade de secreção homogênea e granular no interior do lúmen da vesícula seminal, o que demonstra a intensa atividade secretora das células desse órgão (Fig. 8C). A região proximal apresenta células arredondadas, com cromatina bem condensada ocupando todo o núcleo, dispostas em pequenos espermatocistos (Fig. 8D). Na região mediana as células arredondadas são maiores em relação à região proximal, com núcleo com cromatina pouco condensada e estão em espermatocistos mais desenvolvidos em relação à região proximal (Fig. 8E). A região distal apresenta células arredondadas ainda maiores, com núcleos com cromatina pouco condensada, arranjadas em espermatocistos maiores em relação às outras regiões (Fig. 8F).

4.2.2.6 Carrapatos com seis dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após seis dias de alimentação, observa-se que há secreção no lúmen dilatado das glândulas acessórias e das vesículas seminais (Fig. 9A). Na região proximal, as células germinativas são arredondadas, com núcleo com cromatina condensada, arranjadas em espermatocistos (Fig. 9B). Na região mediana é possível observar as células arredondadas em processo de divisões celulares (Fig. 9C-D). Na região distal, as células localizadas dentro dos espermatocistos são alongadas devido ao desenvolvimento dos espermatócitos em espermátides que, posteriormente, originarão os espermatozoides no trato reprodutor da fêmea (Fig. 10A-D). Essas células apresentam núcleo condensado e alongado, localizado na região anterior das mesmas (Fig. 10C-D).

4.2.2.7 Carrapatos com sete dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados com sete dias de alimentação, observa-se que há secreção no lúmen das glândulas acessórias e das vesículas seminais (Fig. 11A). Nota-se, ainda, a presença de grande quantidade de espermátides alongadas nas vesículas seminais (Fig. 11A-B). Na região proximal, as células germinativas são arredondadas com núcleo com cromatina condensada, organizadas em pequenos espermatocistos (Fig. 11C). Na região mediana, observam-se células arredondadas com núcleo com cromatina condensada, dentro de espermatocistos maiores em relação à região proximal (Fig. 11D). As espermátides alongadas são vistas no interior do lúmen dos testículos, em direção às vesículas seminais (Fig. 11D-F) e nos espermatocistos (Fig. 11G).

4.2.2.8 Carrapatos com oito dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após oito dias de alimentação, observa-se que as glândulas acessórias e as vesículas seminais estão desenvolvidas e com um grande lúmen (Fig. 12A). É possível notar forte marcação de secreção no lúmen das vesículas seminais (Fig. 12A) bem como a presença de espermátides alongadas (Fig. 12 A-B). Na região proximal, as células germinativas são volumosas e arredondadas com núcleo com cromatina condensada (Fig. 12C). Na região mediana, as células são arredondadas, com núcleos menores e cromatina condensada (Fig. 12D). Observam-se as diferentes regiões de desenvolvimento das células germinativas no testículo e a presença de espermátides alongadas arranjadas em espermatocistos na região distal do órgão (Fig. 12E-F).

4.2.2.9 Carrapatos com nove dias após liberação no hospedeiro

Nos carrapatos coletados após nove dias de alimentação, as glândulas acessórias e as vesículas seminais estão desenvolvidas, com um lúmen dilatado (Fig. 13A-B) e observa-se a presença de espermátides alongadas no interior das vesículas seminais (Fig. 13A-C). Na região proximal, as células germinativas apresentam núcleo com cromatina pouco condensada dispostas em espermatocistos bem desenvolvidos (Fig. 13D). Na região mediana as células germinativas arredondadas se encontram em fase de divisão e estão organizadas em espermatocistos (Fig. 13E). Na região distal é possível observar o desenvolvimento das espermátides alongadas (Fig. 13F).

4.2.2.10 Carrapatos com dez dias após liberação no hospedeiro

Nos animais coletados após dez dias de alimentação, observam-se as espermátides alongadas no lúmen das vesículas seminais (Fig. 14A) e grande quantidade de secreção no lúmen das glândulas acessórias (Fig. 14A). A região proximal apresenta espermatocistos bem desenvolvidos, com células volumosas e arredondadas (Fig. 14B-C). Nota-se, ainda, a presença de pontes citoplasmáticas entre as células dessa região (Fig. 14C). Na região mediana, os espermatocistos abrigam células arredondadas, com núcleo com cromatina pouco condensada (Fig.

14D). Na região distal, verifica-se o desenvolvimento de espermátides alongadas nos espermatocistos, bem como sua presença no lúmen do órgão (Fig. 14 E-F).

Figura 1: Micrografia eletrônica de varredura de testículos de *Amblyomma cajennense* alimentado. **A.** Visão geral dos testículos (**t**) no opistossoma e ductos deferentes (**dd**). **B.** Detalhe dos testículos (**t**) mostrando os ductos deferentes (**dd**). **C.** Visão do complexo de glândulas acessórias do aparelho genital (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **D.** Detalhe da superfície lisa dos testículos.

1

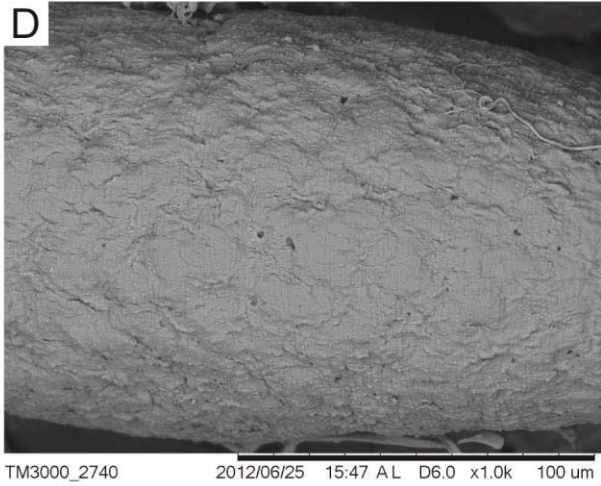
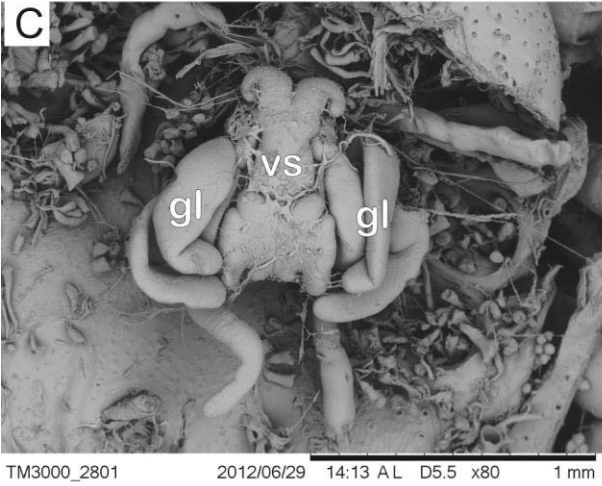
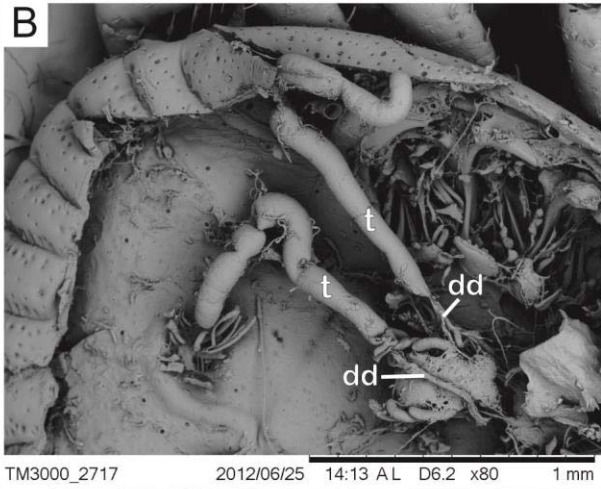
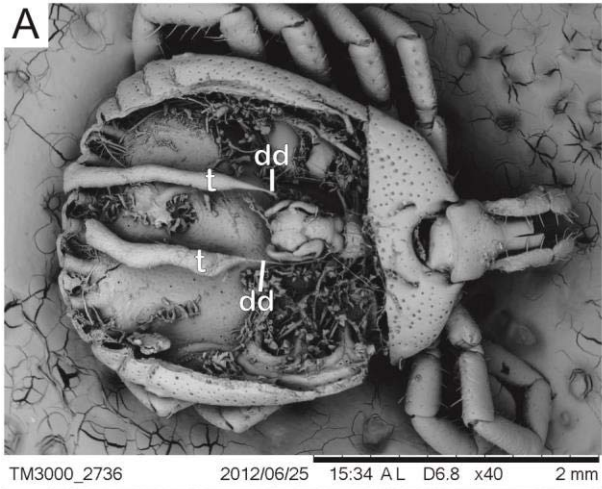
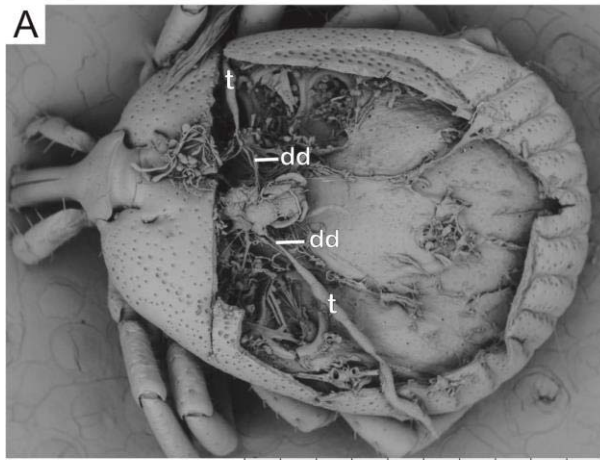
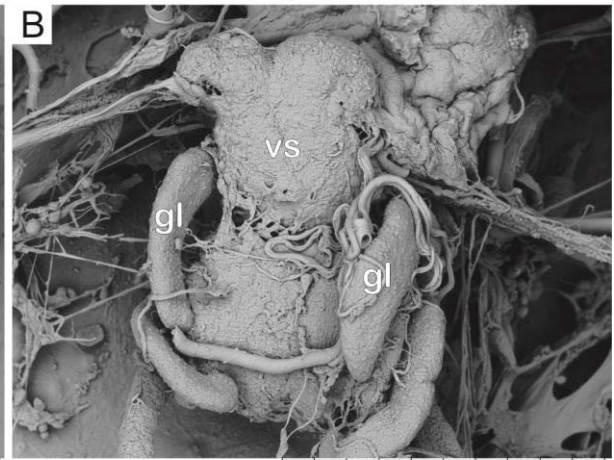


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura dos testículos de *Amblyomma cajennense* em jejum. **A.** Visão geral dos testículos (**t**) no opistossoma e ductos deferentes (**dd**). **B.** Visão do complexo de glândulas acessórias do aparelho genital (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **C.** Detalhe da região proximal dos testículos (**t**) mostrando os ductos deferentes (**dd**). **D.** Detalhe da superfície rugosa dos testículos, evidenciando os espermatocistos (**ec**) em seu interior.

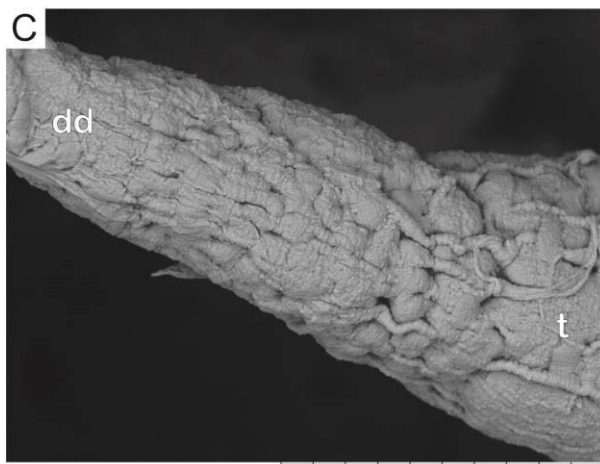
2



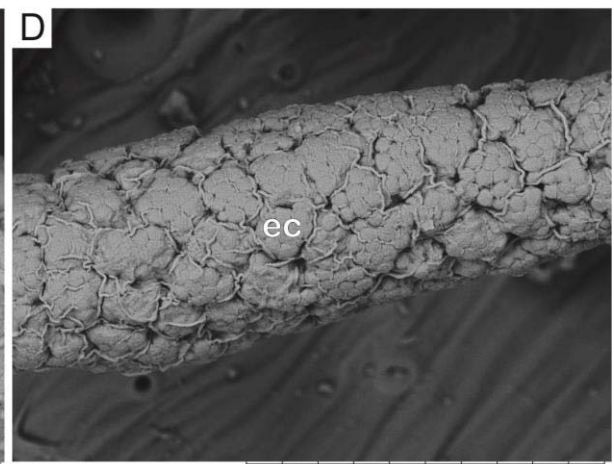
TM3000_2809 2012/06/29 15:08 AL D5.3 x50 2 mm



TM3000_2802 2012/06/29 14:41 AL D5.6 x300 300 um



TM3000_2803 2012/06/29 14:44 AL D5.8 x1.8k 50 um



TM3000_2805 2012/06/29 14:59 AL D5.7 x1.0k 100 um

Figura 3: Secções histológicas do sistema reprodutor masculino de *Amblyomma cajennense* em jejum, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**), revestidos por epitélio simples escamoso (**es**), com secreções no interior do lúmen (**seta pontilhada**). **B.** Visão geral do testículo mostrando as regiões proximal (**p**), mediana (**m**) e distal (**d**). **C.** Detalhe da região proximal do testículo mostrando células em divisão (**seta**). **D-E.** Detalhes da região mediana do testículo mostrando a organização das células germinativas em espermatocistos. **F.** Detalhe da região distal dos testículos evidenciando as células germinativas arranjadas em espermatocistos, revestidos por tecido conjuntivo (**tc**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ec = espermatocistos

n = núcleo

3

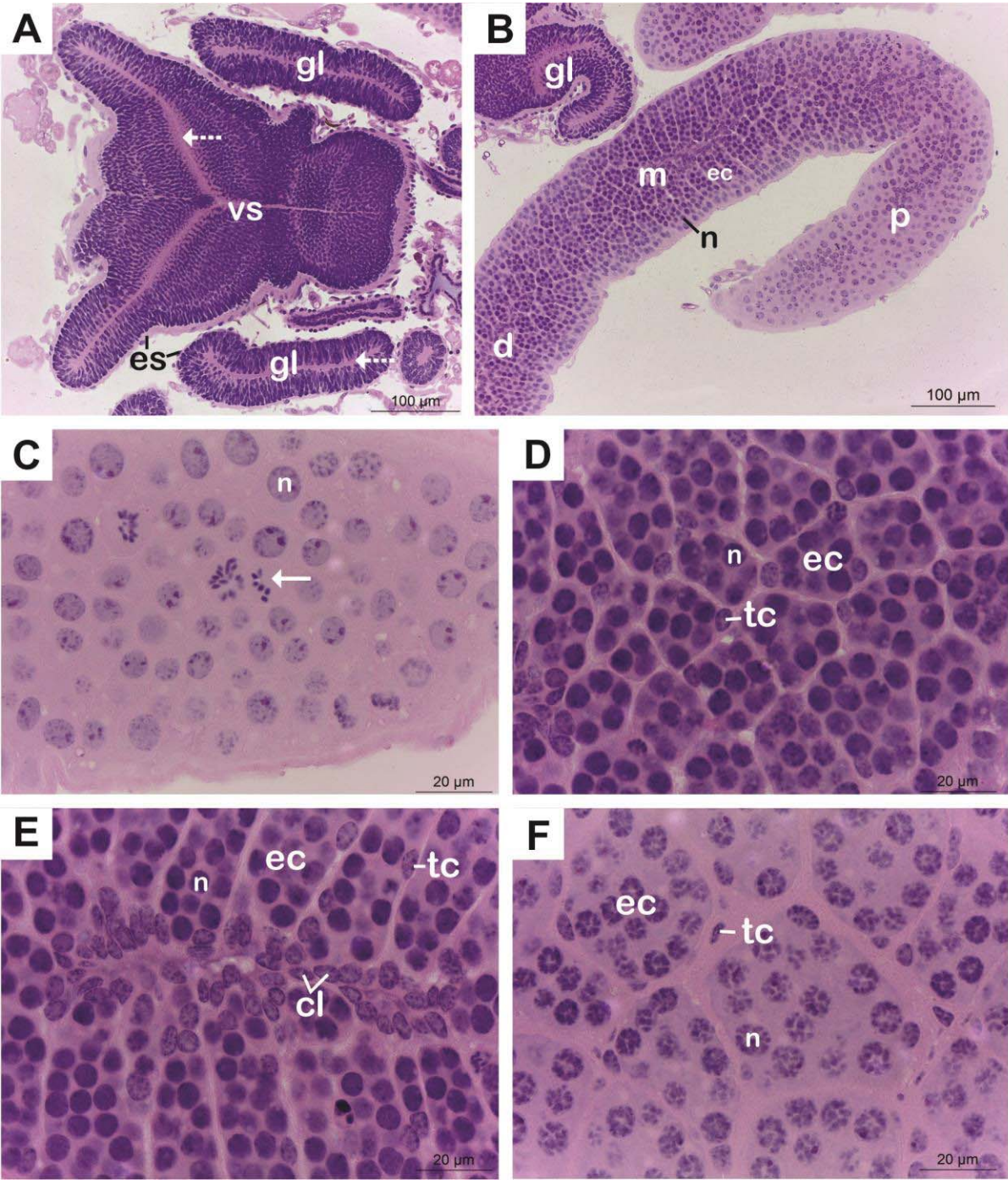


Figura 4: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após um dia de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal dos testículos. **C.** Detalhe da região proximal evidenciando as células germinativas arrançadas em espermatocistos (**ec**), revestidos por tecido conjuntivo (**tc**). **D.** Região mediana do testículo, evidenciando as células germinativas arrançadas em espermatocistos (**ec**). **E.** Região distal do testículo. **F.** Detalhe da região distal do testículo evidenciando as células germinativas arrançadas em espermatocistos (**ec**), revestidos por tecido conjuntivo (**tc**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

l = lúmen

n = núcleo

s = secreção

4

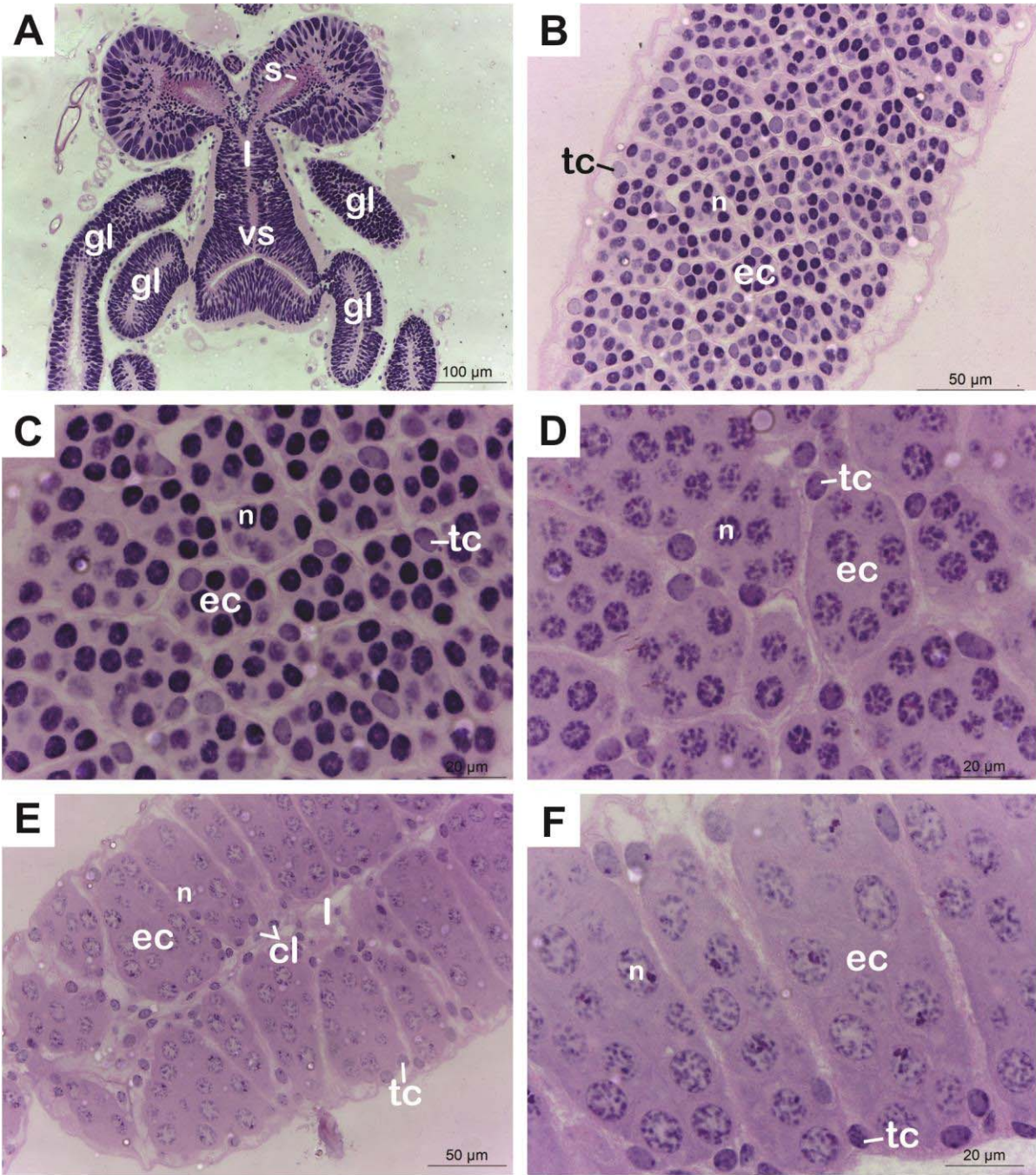


Figura 5: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após dois dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal do testículo. **C.** Região mediana do testículo. **D.** Região distal do testículo evidenciando as células germinativas arranjadas em espermatocistos (**ec**), revestidos por tecido conjuntivo (**tc**).

l = lúmen

n = núcleo

s = secreção

5

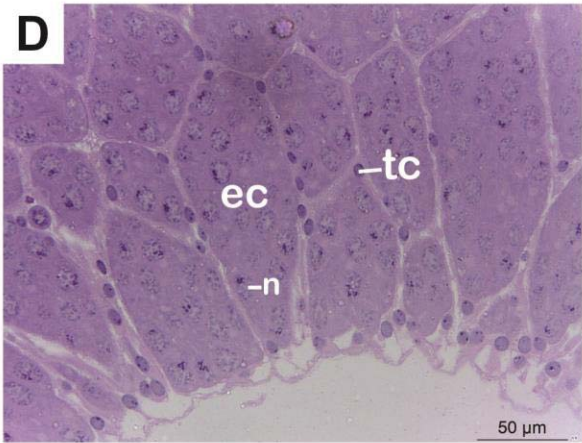
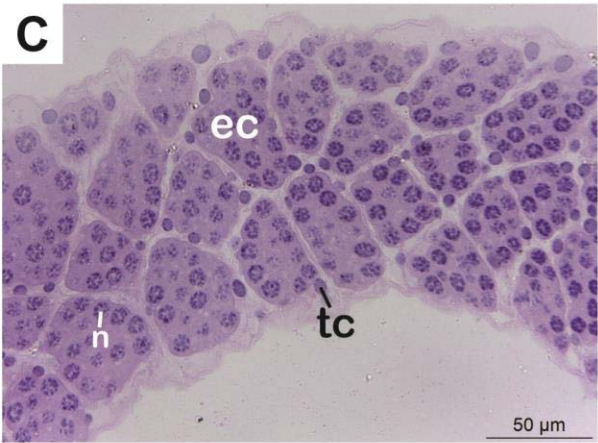
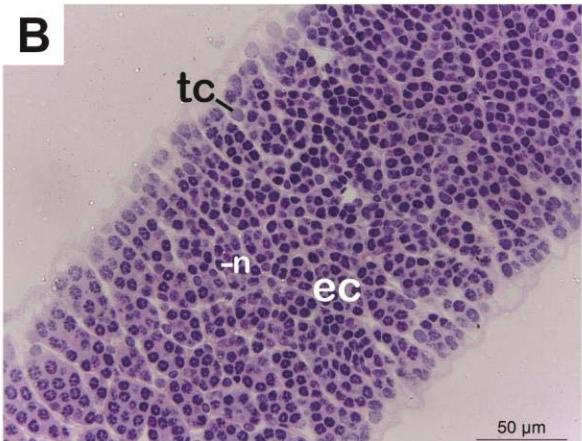
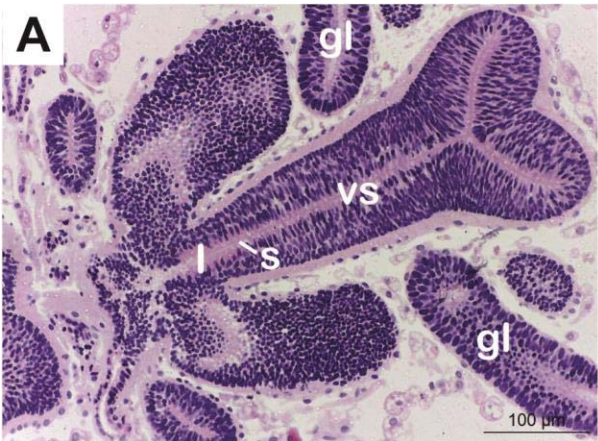


Figura 6: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após três dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Visão geral do testículo mostrando as regiões proximal (**p**) e mediana (**m**). **C.** Região proximal. **D.** Região mediana. **E.** Região distal. **F.** Detalhe da região distal evidenciando as células germinativas em desenvolvimento e as pontes citoplasmáticas entre elas (**seta**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

s = secreção

tc = tecido conjuntivo

6

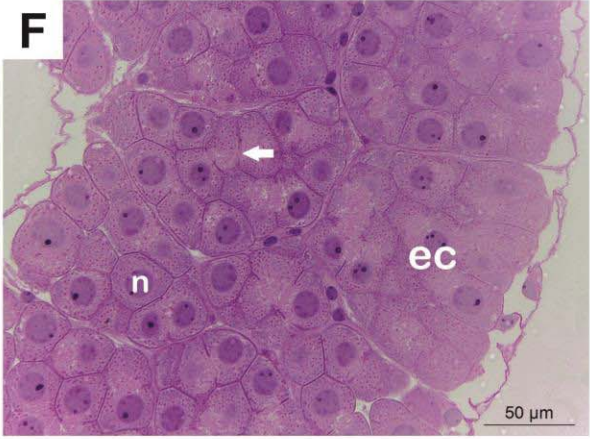
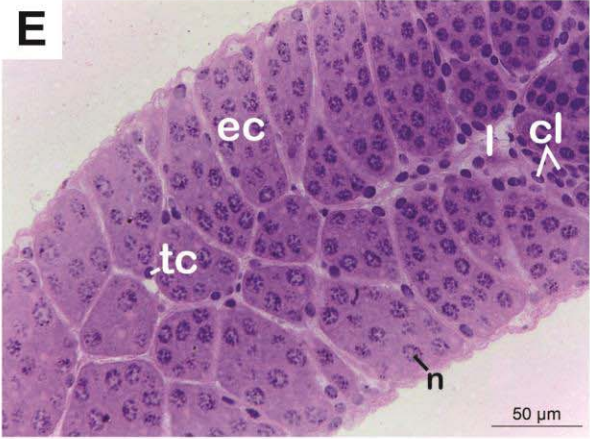
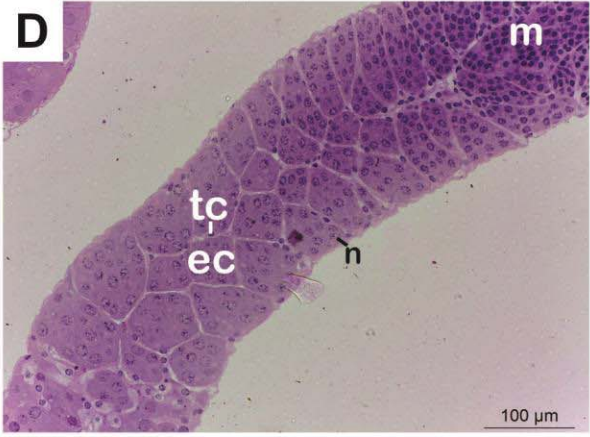
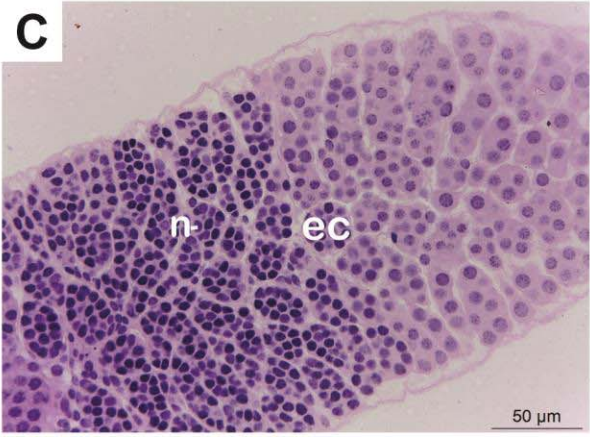
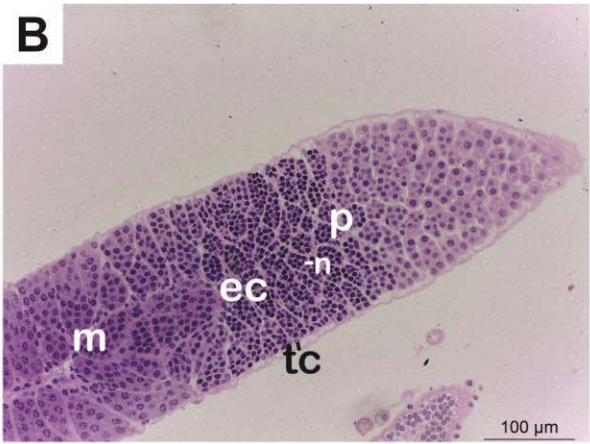
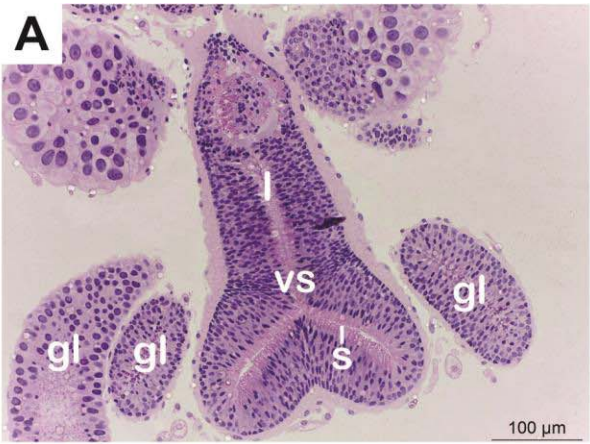


Figura 7. Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após quatro dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal. **C.** Região mediana. **D.** Região distal evidenciando as células germinativas arranjadas em espermatocistos, delimitados por tecido conjuntivo (**tc**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

7

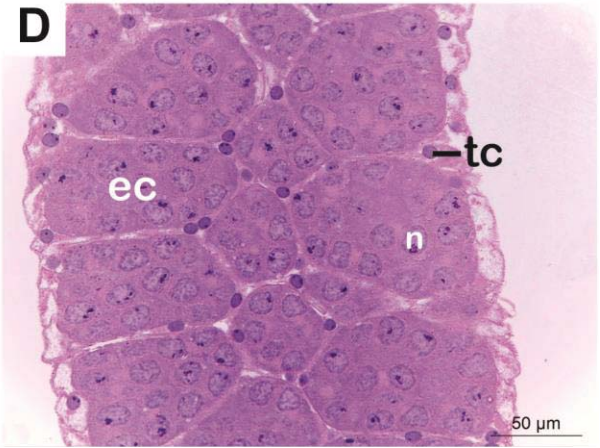
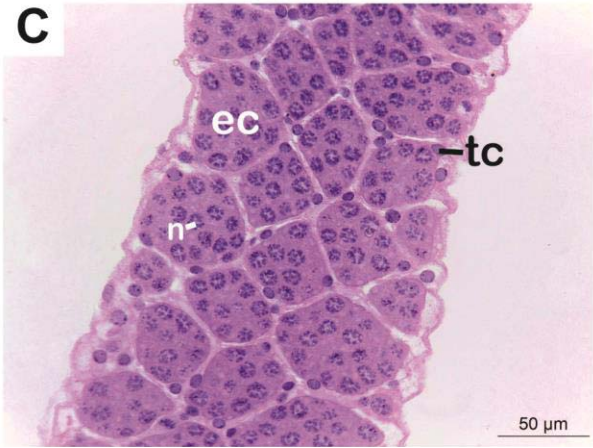
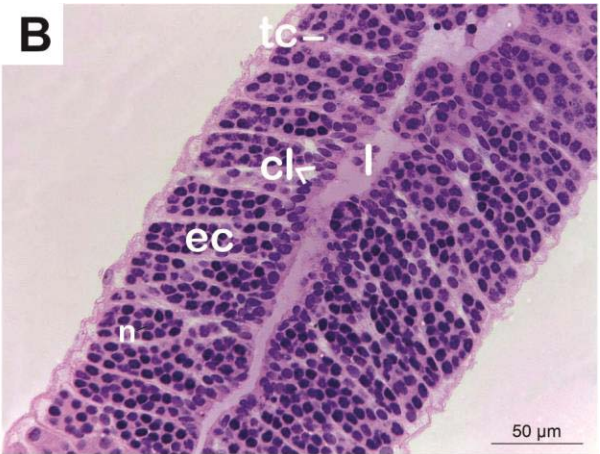
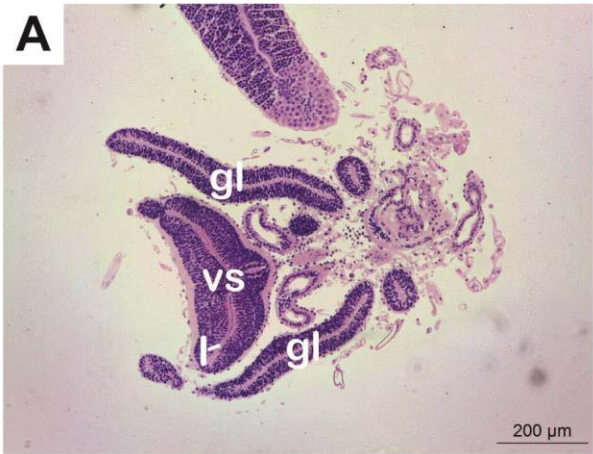


Figura 8. Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após cinco dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **AB.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **C.** Detalhe da vesícula seminal evidenciando a presença de secreção homogênea (**sh**) e granular (**sg**) no interior do lúmen. **D.** Região proximal. **E.** Região mediana. **F.** Região distal.

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

tc = tecido conjuntivo

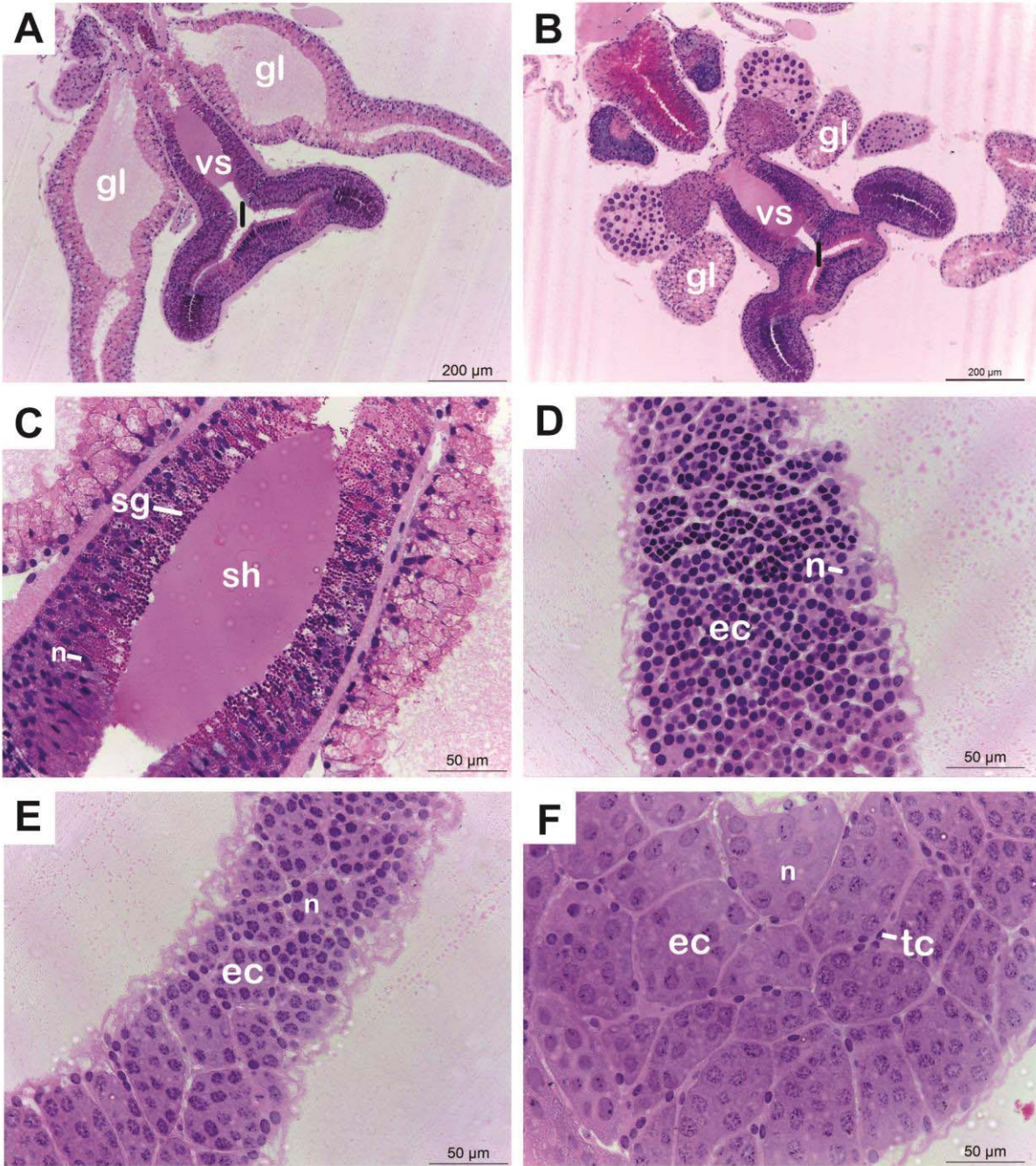


Figura 9: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após seis dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal. **C.** Região mediana. **D.** Detalhe de pontes citoplasmáticas (**seta**) entre as células germinativas da região mediana.

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

s = secreção

tc = tecido conjuntivo

9

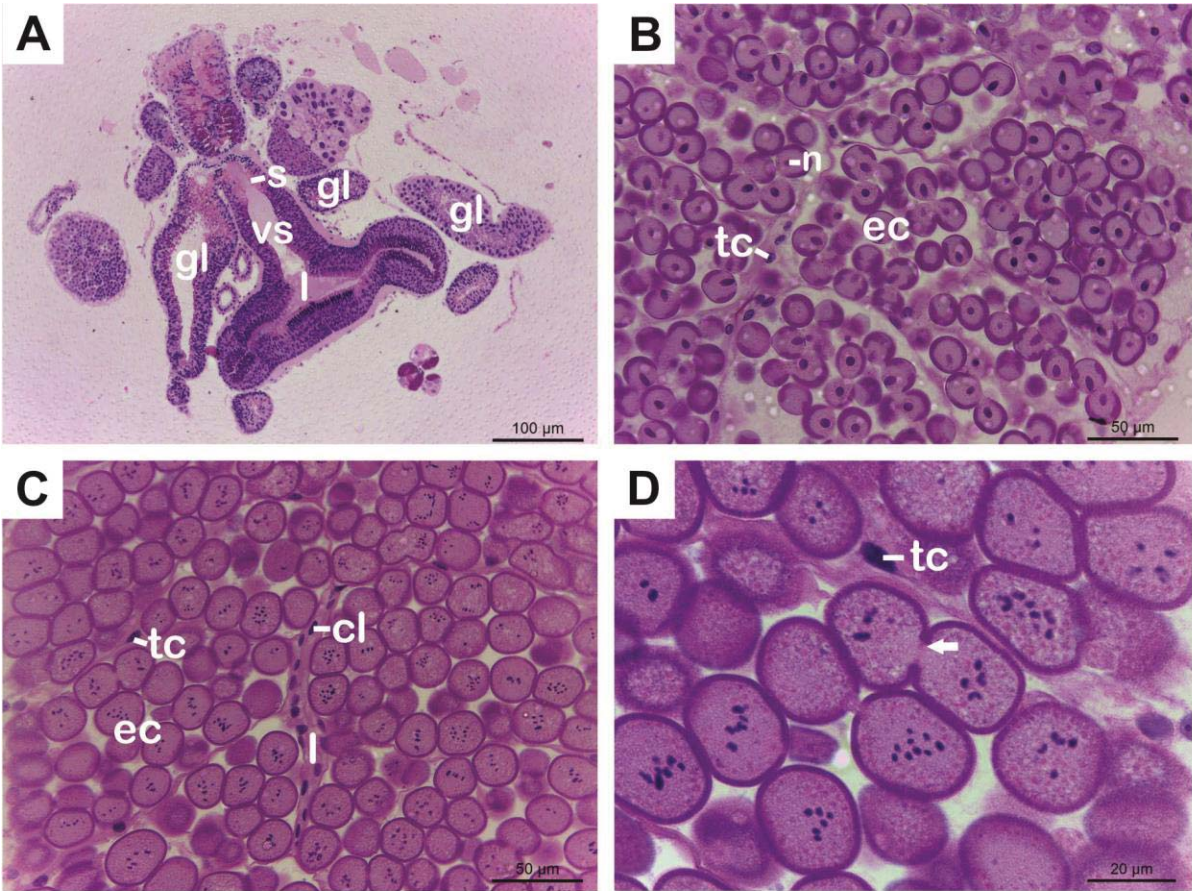


Figura 10: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após seis dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **AB.** Região distal do testículo, mostrando as espermatídes alongadas (**ea**). **CD.** Detalhe das espermatídes alongadas (**ea**) evidenciando o núcleo alongado na parte anterior (**seta pontilhada**).

ec = espermatocistos

m = região mediana do testículo

tc = tecido conjuntivo

10

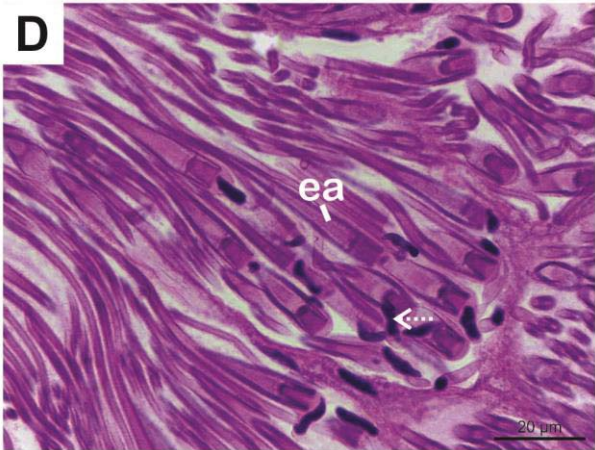
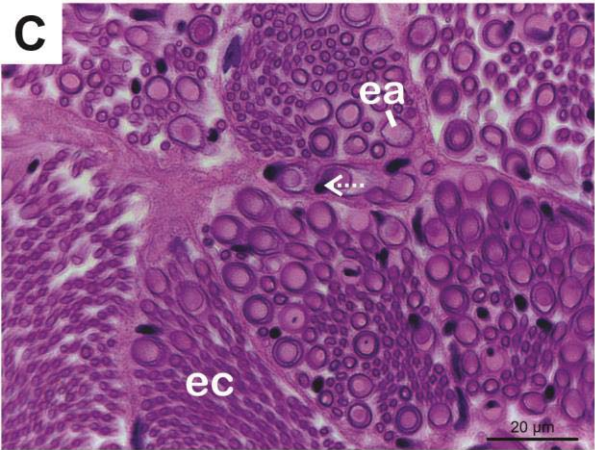
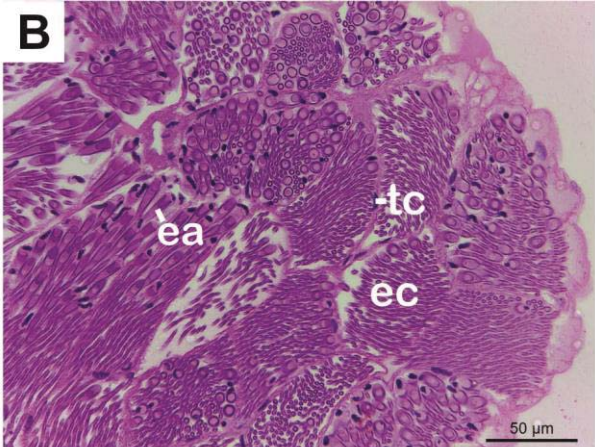
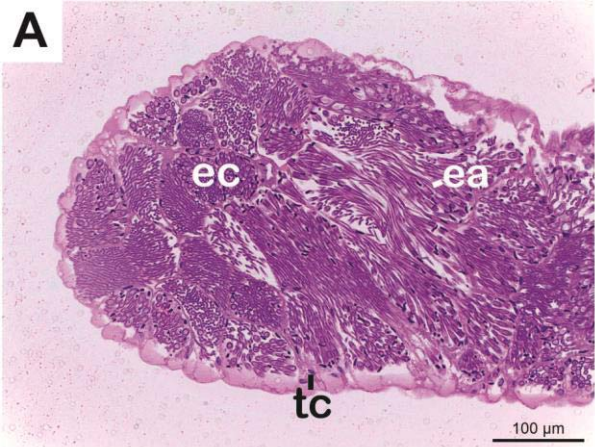


Figura 11: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após sete dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Detalhe da vesícula seminal, mostrando a presença de espermátides alongadas (**ea**) no lúmen (**l**). **C.** Região proximal. **D.** Região mediana, mostrando as espermátides alongadas (**ea**) no lúmen (**l**). **E.** Detalhe da região mediana evidenciando o desenvolvimento das espermátides alongadas (**ea**). **F.** Região distal. **G.** Detalhe da região distal com espermátides alongadas (**ea**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ec = espermatocistos

l = lúmen

s = secreção

tc = tecido conjuntivo

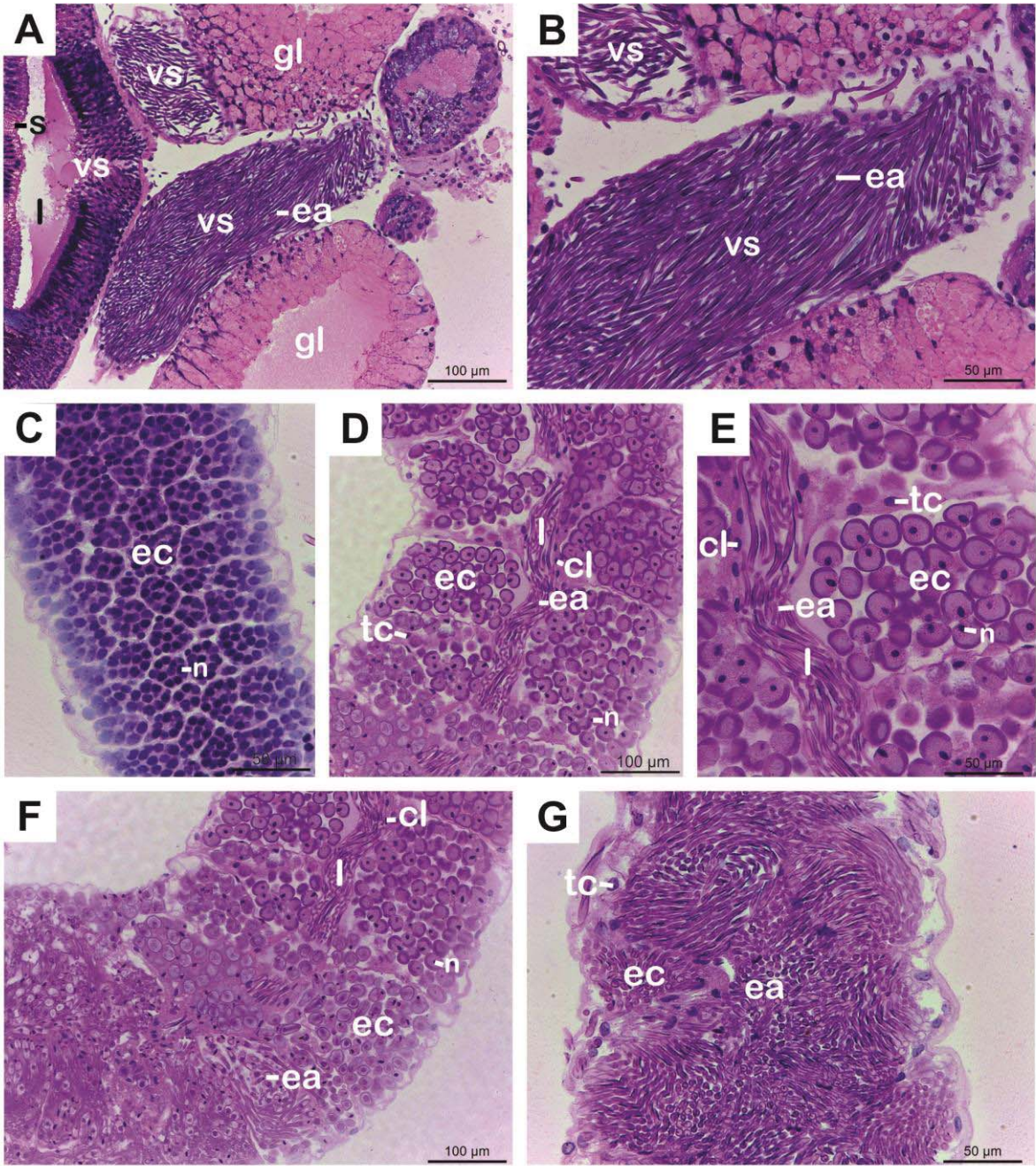


Figura 12: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após oito dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Detalhe da vesícula seminal. **C.** Região proximal do testículo. **D.** Região mediana. **EF.** Região distal.

ea = espermátides alongadas

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

s = secreção

tc = tecido conjuntivo

12

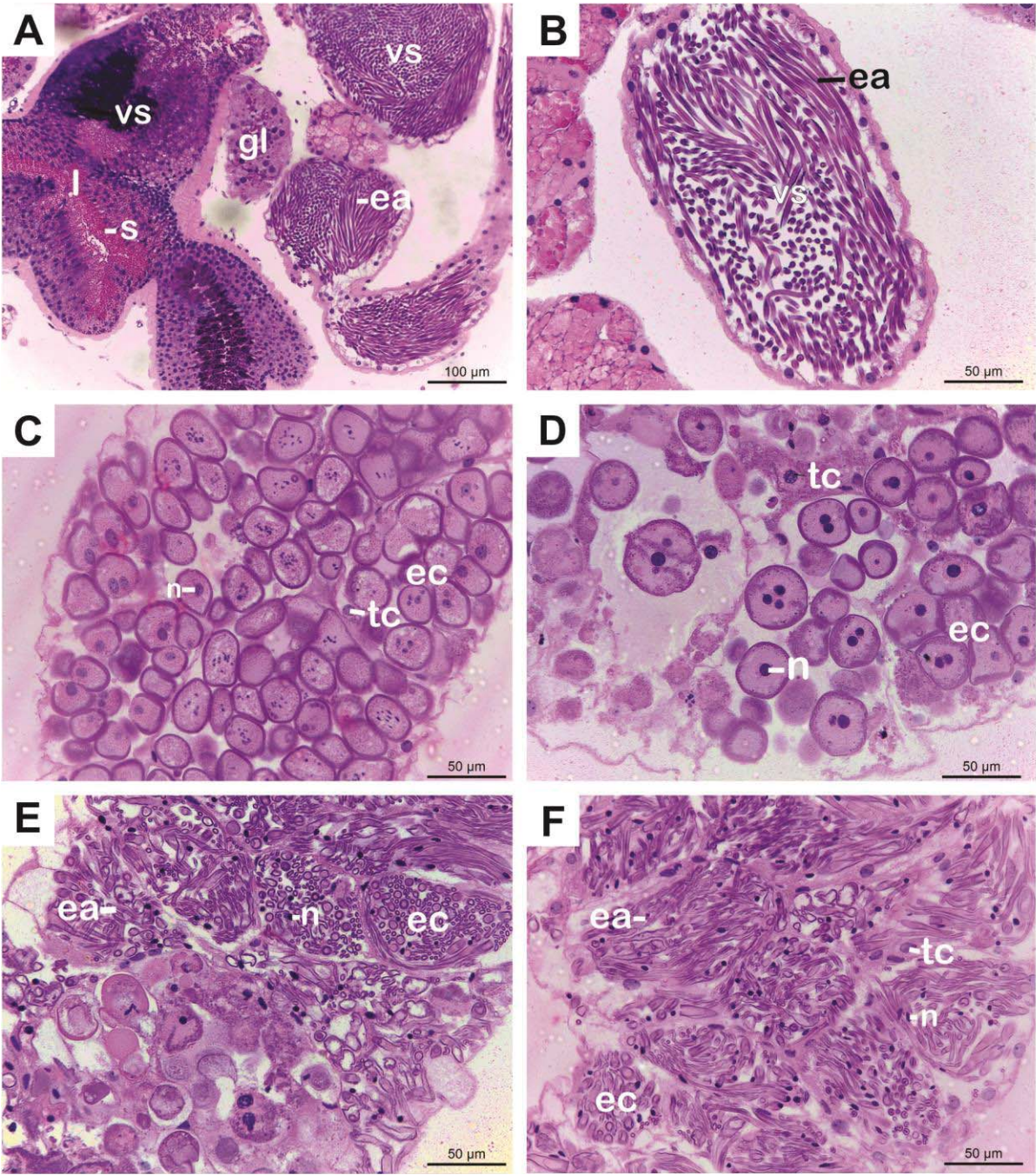


Figura 13: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após nove dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Detalhe do complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **C.** Detalhe da vesícula seminal (**vs**). **D.** Região proximal do testículo. **E.** Região mediana. **F.** Região distal.

ea = espermátides alongadas

ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

tc = tecido conjuntivo

13

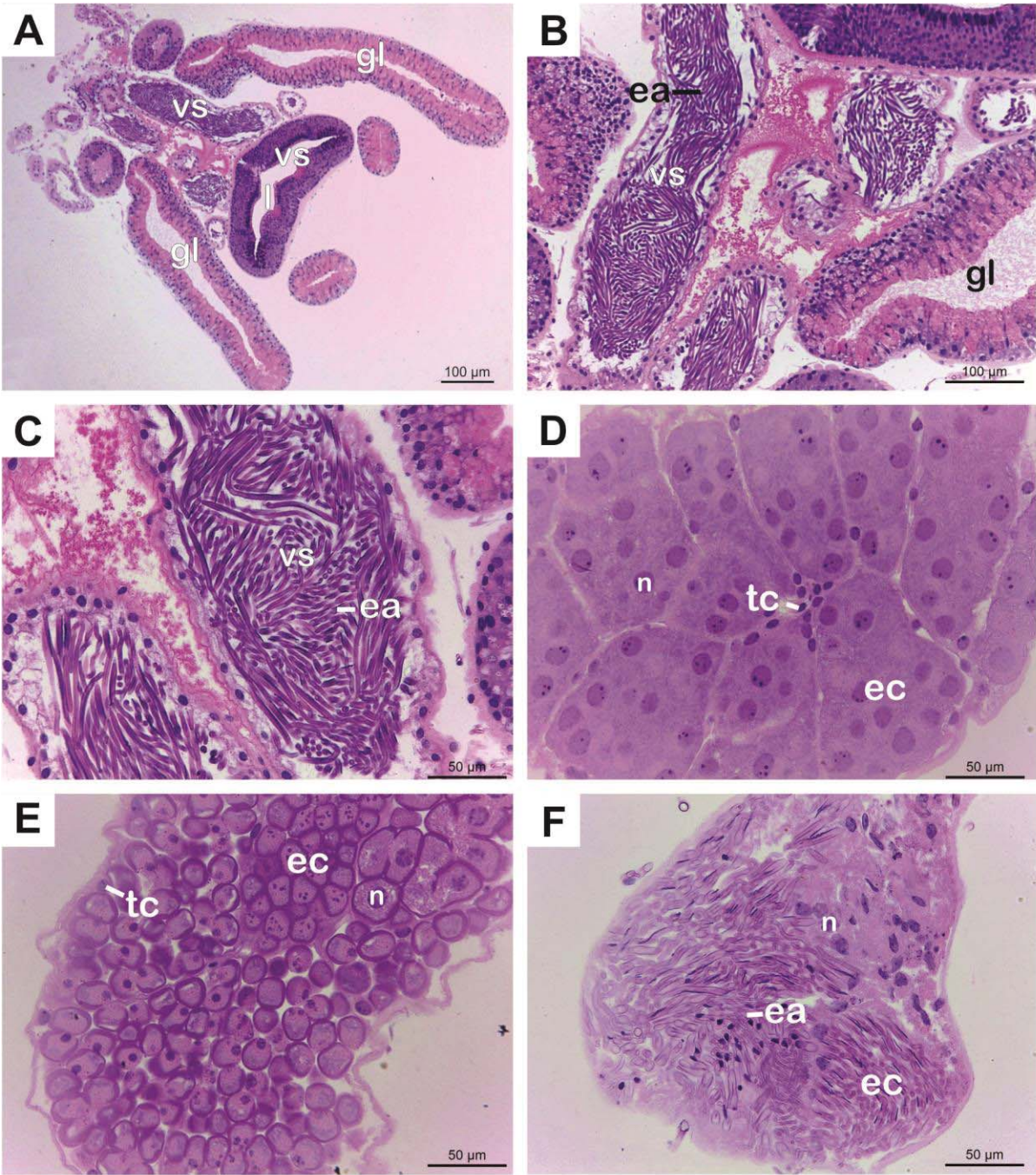


Figura 14: Secções histológicas do sistema reprodutor de *Amblyomma cajennense* após dez dias de alimentação, coradas com hematoxilina-eosina. **A.** Complexo de glândulas acessórias (**gl**) e vesícula seminal (**vs**). **B.** Região proximal do testículo. **C.** Detalhe da região proximal, mostrando pontes citoplasmáticas entre as células germinativas (**seta**). **D.** Região mediana. **E.** Região distal. **F.** Detalhe da região distal evidenciando a presença das espermátides alongadas (**ea**).

cl = células somáticas ao redor do lúmen

ea = espermátides alongadas

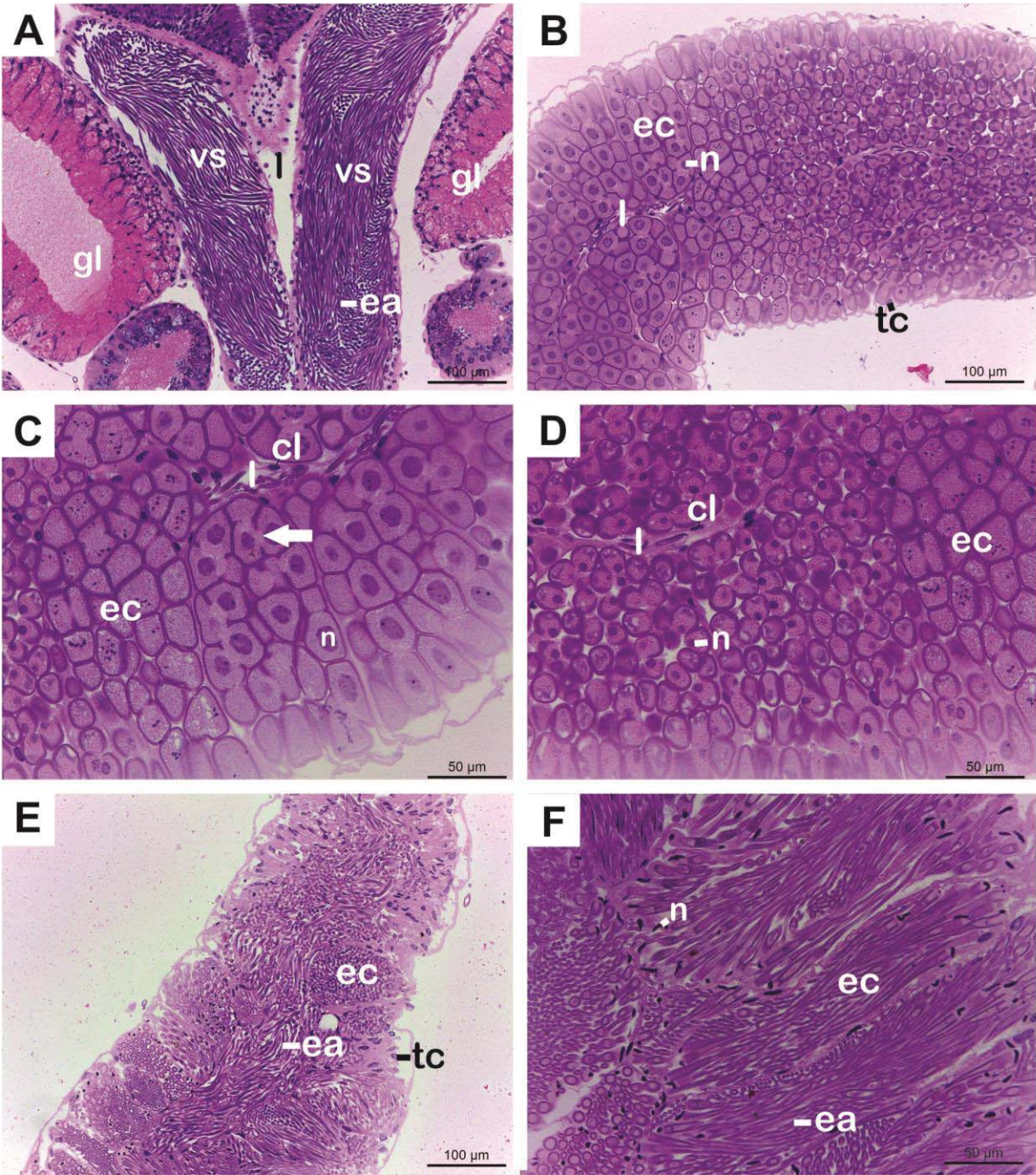
ec = espermatocistos

l = lúmen

n = núcleo

tc = tecido conjuntivo

14



5. DISCUSSÃO

Popularmente conhecido como carrapato-estrela ou carrapato do cavalo, o *Amblyomma cajennense* tem grande importância médica, visto ser o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), doença infecciosa grave e potencialmente fatal. Esse artrópode está amplamente distribuído no continente americano e pode ser encontrado em todas as fases do seu ciclo de vida, em aves domésticas e silvestres e em numerosos mamíferos como cavalo, boi, capivara. O homem é intensamente atacado pelo *A. cajennense*, sobretudo pelas fases larval e ninfal (COOLEY; KOHLS, 1944; FLECHTMANN, 1985).

Um estudo realizado por Hayes et al. (1980), sugere que poderia ocorrer, no momento da cópula, a transmissão da *Rickettsia rickettsii* de machos infectados para fêmeas saudáveis, devido a presença dessas bactérias nas espermatogônias, espermátocitos e espermátides e que teriam a capacidade de invadir as células germinativas dos machos ou permanecerem no fluido que irá formar o espermatóforo, o que demonstra importância ecológica na manutenção desses patógenos na natureza. Entretanto, pouco se relata na literatura sobre os processos reprodutivos dos carrapatos *A. cajennense*, bem como a dinâmica de espermatogênese e espermiogênese desses animais.

Sendo assim, nesse trabalho foram obtidas as primeiras informações acerca da morfologia e histologia do sistema reprodutor de machos da espécie *A. cajennense*, dados esses que serão de fundamental importância para se compreender a fisiologia dos órgãos envolvidos no processo de produção e transferência de gametas masculinos para o trato reprodutivo das fêmeas, bem como servirá de ferramenta e base científica para a proposta de novos métodos de controle desses ectoparasitas.

A análise morfológica do sistema reprodutor de machos do carrapato *Amblyomma cajennense* revelou que os testículos são estruturas tubulares pares arranjadas dorsolateralmente no opistossoma, sendo que a região proximal se conecta às vesículas seminais por meio de ductos deferentes, semelhante ao observado em *Dermacentor occidentalis* (OLIVER; BRINTON, 1972), *D. andersoni* (SONENSHINE, 1991), *Ornithodoros moubata* (COONS; ALBERTI, 1999), *Haemaphysalis longicornis* (MATSUO; MÕRI, 2000) e *Rhipicephalus sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2012). Associado às vesículas seminais, encontra-se um complexo de glândulas acessórias multilobuladas que secretam glicoproteínas, mucoproteínas, lipoproteínas, glicosaminoglicanos, entre outras

substâncias necessárias para a formação do espermatóforo e do fluido seminal, que possibilitará a capacitação dos espermatozoides no trato genital da fêmea (GARCIA-FERNANDEZ; GARCIA; GARCIA, 1998; SONENSHINE, 1991).

Os resultados obtidos em *A. cajennense*, mostraram a presença de secreção no lúmen da vesícula seminal e das glândulas acessórias dos machos, secreções essas que formarão o espermatóforo, o fluído seminal e fisiologicamente seriam responsáveis pela capacitação das espermátides, como relatado em estudo feito por Oliver e Brinto (1972) em *D. variabilis* e *O. moubata* que mostra que a capacitação das espermátides, no trato reprodutor feminino, é ativada por um polipeptídeo (12,500 kDa) produzido pelas glândulas acessórias associadas aos testículos dos machos. Lomas e Kaufman (1992) em seus estudos observaram em *A. hebraeum* a presença de um fator químico produzido nas glândulas acessórias, o qual estaria relacionado com a degeneração das glândulas salivares em fêmeas dessa mesma espécie. Os mesmos autores sugeriram, ainda, que outros fatores químicos, produzidos no trato genital do macho, estariam relacionados com a fase de ingurgitamento, porém a natureza química desses fatores permanece pouco esclarecida.

Nos carrapatos adultos, o sistema reprodutor masculino passa por transformações dependendo do tempo que os carrapatos permanecem fixados ao hospedeiro. Em *A. cajennense* em jejum os testículos, as vesículas seminais e o complexo de glândulas acessórias são menos desenvolvidos e, portanto, menores quando comparados aos indivíduos alimentados, corroborando os dados obtidos para *H. longicornis* (MATSUO; MÖRI; SHIRAISHI, 1996; SONENSHINE, 1991).

Sonenshine (1991) relatou que machos em jejum de *D. variabilis*, apresentam espermátócitos primários arranjados em espermátocistos, estruturas que ocupam grande parte dos testículos, os quais possuem as espermátogônias localizadas na região distal (próxima à extremidade posterior). A maioria das células germinativas nesses machos permanece quiescente e somente algumas espermátogônias encontram-se ativas na síntese de DNA, sendo que a retomada do desenvolvimento das células germinativas se dá somente após o carrapato se alimentar. Essa mesma característica foi observada nos machos de *A. cajennense* em jejum, que apresentaram células germinativas organizadas em espermátocistos, principalmente na região distal dos testículos.

Segundo os diversos estudos disponíveis, ainda não fica estabelecido se a alimentação seria responsável apenas por prover nutrientes necessários para a espermátogênese ou se outros estímulos aconteceriam durante a alimentação, os quais provavelmente desencadeariam

uma cascata de eventos com a liberação de hormônios que estariam envolvidos na espermatogênese (OLIVER; DOTSON, 1993).

As células germinativas, presentes nos testículos de *A. cajennense*, tanto em jejum como alimentados, encontraram-se organizadas em espermatocistos, revestidos por tecido conjuntivo, corroborando com os dados obtidos para *D. variabilis* (SONENSHINE, 1991), *B. microplus* (NORMANN, 1998) e *R. sanguineus* (OLIVEIRA et al., 2012), e o desenvolvimento das células germinativas no testículo de *A. canjennense* acontece da região distal (próxima à extremidade posterior dos testículos) em direção à região proximal (próxima aos ductos deferentes). Portanto, as células na região distal estão sempre em estágios mais avançados do processo de espermatogênese em relação às aquelas das regiões mediana e proximal. Esse padrão, no entanto, é diferente do observado em outros artrópodes. Nos insetos, por exemplo, o desenvolvimento tem início nas extremidades dos folículos espermáticos dos testículos próximas aos ductos deferentes e continuam para a região distal, onde se encontram as espermatogônias (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011; SONENSHINE, 1991).

Nos carrapatos, o desenvolvimento das células germinativas se dá em duas fases distintas: espermatogênese e espermiogênese. A espermatogênese inicia-se no estágio ninfal, quando há o aumento do número de espermatogônias por divisões mitóticas. Posteriormente, ocorre uma fase de crescimento celular e a diferenciação das espermatogônias em espermatócitos primários. Em seguida, ocorre a divisão meiótica para a produção das espermátides (COONS; ALBERTI, 1999; SONENSHINE, 1991; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

Sonhenshine (1991) relatou que, durante o desenvolvimento dos espermatócitos primários, pequenas vesículas oriundas da membrana plasmática seriam formadas abaixo do plasmalema. Após a divisão para a formação das espermátides, essas vesículas aumentariam de tamanho formando a cavidade cisternica e o núcleo mover-se-ia para um dos polos da célula. Em seguida, a vesícula acrossomal seria formada e as espermátides começariam a se alongar. A cavidade cisternica, então, invaginar-se-ia e o núcleo tornar-se-ia alongado. Pode-se sugerir que nos animais coletados com seis dias de alimentação há a formação da cavidade cisternica, o alongamento das espermátides e a invaginação da cavidade cisternica, entretanto, fazem-se necessários estudos aprofundados para o detalhamento do desenvolvimento das células germinativas, por meio de outras técnicas como Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Confocal, que serão aplicadas posteriormente.

A espermiogênese acontece nos machos adultos, pelo crescimento e diferenciação das espermátides em espermátides alongadas não móveis (proesperma ou espermatozoides pré-capacitados). Essas prospermas seriam, então, transportadas do ducto ejaculatório para o espermatóforo e, posteriormente transferidas para a fêmea durante a cópula. No trato genital da fêmea, ocorreria a capacitação, última fase da espermiogênese, em que as espermátides alongadas se tornariam espermatozoides móveis (COONS; ALBERTI, 1999; KISZEWSKI; MATUSCHKA; SPIELMAN, 2001).

Em *A. cajennense* foi observado que as células germinativas no interior dos espermatocistos encontravam-se no mesmo estágio de desenvolvimento, entretanto, em uma mesma região do testículo, os espermatocistos estavam em estágios diferentes de desenvolvimento, corroborando com os dados obtidos para *D. occidentalis* (OLIVER; BRINTON, 1972). Em *A. cajennense*, foi observado, ainda, pontes citoplasmáticas entre as células dos espermatocistos em estágios mais avançados de desenvolvimento. Oliver e Brinton (1972) também observaram essas pontes em *D. occidentalis* e afirmaram que estas provavelmente facilitariam a diferenciação sincronizada das células germinativas nos espermatocistos, por meio da distribuição de fatores de regulação. Esse tipo de ligação intercelular, remanescente das divisões das células germinativas, foi descrito anteriormente em diversos outros grupos de animais como anelídeos, equinodermos, moluscos, aranhas, insetos e anfíbios (OLIVER; BRINTON, 1972).

Segundo Coons & Alberti (1999), o processo de desenvolvimento das células germinativas nos Argasídeos e Ixodídeos é semelhante. Em Argasídeos, a espermatogênese geralmente acontece antes do macho adulto se alimentar e nos Ixodídeos a formação da proesperma seria concluída após o macho se alimentar. Em *A. cajennense* observou-se a presença de espermátides alongadas somente nos animais coletados a partir de seis dias da liberação para alimentação nos hospedeiros, período esse semelhante ao observado em *D. variabilis*, em que as prospermas foram observadas pela primeira vez em machos com 130 horas de fixação nos hospedeiros (SONHENSINE, 1991). Entretanto, em *D. occidentalis* a espermiogênese se dá no macho com 72 horas de fixação no hospedeiro (OLIVER; BRINTON 1972).

6. CONCLUSÃO

Por meio dos dados obtidos no presente estudo, concluiu-se que:

1. A morfologia do aparelho reprodutor masculino dos carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* é semelhante à de outras espécies de ixodídeos.
2. O arranjo e o desenvolvimento das células germinativas nos testículos de *A. cajennense* são semelhantes ao observado em outros ixodídeos.
3. O desenvolvimento das células germinativas em *A. cajennense* se dá da região distal para a proximal, diferindo do padrão observado em outros artrópodes, como nos insetos e assemelhando-se ao descrito para outras espécies de carrapatos.
4. A alimentação tem papel fundamental no desenvolvimento dos testículos, sendo que a espermatogênese é completada somente após o macho se alimentar.
5. As espermátides alongadas completam sua diferenciação somente em machos adultos após seis dias de alimentação.
6. As células germinativas presentes em um espermatoócito apresentam-se sempre no mesmo estágio de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. F, MAGNARELLI, L. A. Biology of Ticks. Infectious Disease Clinics of North America, United States. n. 22, p. 195-215, 2008.
- BARKER, S.C., MURRELL, A., Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology, United Kingdom, v. 129, p. 15-36, 2004.
- BECHARA, G.H. et al. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 61-66, 1995.
- BORGES, L. M. F. et al., Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), Veterinary Parasitology, Netherlands. n. 104, p. 265-273, 2002.
- CASTAGNOLLI, K. C et al. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. Veterinary Parasitology, Netherlands, n. 117, p. 271-283, 2003.
- COOLEY, R. A., KOHLS, G. The genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. The Journal of Parasitology. United States. v. 30, v. 2, p. 77-111, 1944.
- COONS, L.B, ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F.W., FOELIX, R. Microscopic anatomy of invertebrates. USA: Wiley-Liss, 1999. v. 8B, Cap. 5, p. 267-514.
- CRAMPTON, A.; MCKAY, I.; BARKER, S.C. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. International Journal for Parasitology, United Kingdom. n. 5, p. 511-517, 1996.
- FELDMAN-MUHSAM, B. Spermatophore formation and spermiogenesis in *Ornithodoros* ticks. Nature, United Kingdom. v. 156, p. 1252-1253, 1967.
- FLECHTMANN, C.H.W. Ácaros de importância médico-veterinária. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1973. 180p.
- GARCIA-FERNANDEZ, C. GARCIA, S. M. L., GARCIA, R. N. The male genital accessory gland complex of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Biologia, São Carlos. v. 3, n. 58, p. 453-462, 1998.
- HAYES, S. F. BURGDORFER, W., AESCHLIMANN, A. Sexual transmission of Spotted Fever group *Rickettsiae* by infected male ticks: detection of *Rickettsiae* in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. Infection and Immunity, United States. v. 27, n. 2, p. 638-642, 1980.
- JONGEJAN, F. UILENBERG, G. The global importance of ticks. Parasitology, United Kingdom, n. 129, p. 3-14, 2004.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. São Paulo: Santos, 1983. 123p.

KISZEWSKI, A. E., MATUSCHKA, F. R., SPIELMAN, A. Mating strategies and spermiogenesis in Ixodid ticks. Annual Review of Entomology, United States. n. 46, p. 167-182, 2001.

LABRUNA, M. B. et al., Cross-mating experiments with geographically diferente populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology, Netherlands. n. 54, p. 41-49, 2011.

LOMAS, L. O; KAUFMAN, W. R. The influence of a fator from the male genital tract on salivar gland degeneration in the female Ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. Journal of Insect Physiology, Great Britain. v. 38, n. 8, p. 595-601, 1992.

LORD ROTHSCCHILD, F. R. S. Structure and movements of tick spermatozoa (Arachnida, Acari). Quarterly Journal of Microscopical Science, United Kingdom. v. 102, p. 239-247, 1961.

MACALUSO, K. R. et al., Infection and transovarial transmission of *Rickettsiae* in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. Vector Borne and Zoonotic Diseases, United States. v. 1, n. 1, p. 45-53, 2001.

MATSUO, T., MÕRI, T. The significance of feeding for reproduction in male Metastriata tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Acta Zoologica, United Kingdom. n. 81, p. 17-26, 2000.

MONTEIRO, G.E.R., BECHARA, G.H. Cutaneous Basophilia in the Resistance of Goats to *Amblyomma cajennense* Nymphs after Repeated Infestations. Animal Biodiversity and Emerging Diseases, New York, v. 1149, p. 221-225, 2008.

MATSUO, T., MÕRI, T., SHIRAISHI, S. Histological and histochemical studies on the male accessory genital glands and the derivations of the spermatophore components from the accessory glands in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). Journal of the Acarological Society of Japan, Japan. N. 6, p. 1-10, 1997.

MUHSAM-FELDMAN, B., BORUT, S. On the spermatophore of Ixodid ticks. Journal of Insect Physiology. Great Britain. v. 29, n. 5, p. 449-457, 1983.

MUNDERLOH, U. G. et al. Microscopy of Spotted Fever *Rickettsia* movement through tick cells. Microscopy and Microanalysis. United States. n. 4, p. 115-121, 1998.

NAVA, S, GUGLUELMONE, A. A, MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. Frontiers in Bioscience, United States, n. 14, p. 2857-2877, jan. 2009.

NORMANN, C. A. B. M., A espermiogênese em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae): aspectos estruturais e ultra-estruturais. 1998. 79 f. Dissertação. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

NUNES, P. H., Alterações morfológicas em glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, (Acari: Ixodidae) em diferentes estágios de alimentação durante sucessivas infestações em coelhos. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009.

OLIVEIRA, P. R. et al., Morphological characterization of the nymphs *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Description of the testes, integument, Malpighian Tubules and midgut on the detachment day. Microscopy Research and Technique, United States. n. 75, p. 727-736, 2012.

OLIVER, J. H., DOTSON, E. M. Hormonal control of molting and reproduction in ticks. American Zoologist, United States. v. 33, n. 3, p. 384-396, 1993

OLIVER, J. H., STONE, B. F. Spermatid production in unfed, Metastriata ticks. The Journal of Parasitology, United States. v. 69, n. 2, p. 420-421, 1983.

OLIVER, J. H.; BRINTON, L. P. Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea). 7. Spermatogenesis in the Pacific Coast tick, *Dermacentor occidentalis* Marx (Ixodidae). The Journal of Parasitology, United States. v. 58, n. 2, p. 365-379, 1972.

REES, H. H. Hormonal control of tick development and reproduction, Parasitology, United Kingdom. n. 129, p. 127-143, 2004.

REGER, J. F. A fine-structure study on spermiogenesis in the tick *Amblyomma dissimili*, with special reference to the development of motile processes. Journal of Ultrastructure Research, United States. n. 7, p. 550-565, 1962.

RESLER, J. H. et al., Migration and motility of spermatozoa in the female reproductive tract of the soft tick *Onithodoros moubata* (Acari, Argasidae). Parasitology, United Kingdom. n. 136, p. 511-521, 2009.

SAUER, J.R., HAIR, J.A. Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks. New York: Ellis Horwood Limited, 1986, 510 p.

SONENSHINE, D.E. Biology of Ticks. New York: Oxford University Press, 1991, 447 p.

SANCHES, G. S et al. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Experimental and Applied Acarology, Netherlands. n. 44, p. 43-48, jan. 2008.

SONENSHINE, D. E., Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. Parasitology, United Kingdom. n. 129, p. 405-425, 2004.

TELFORD, S. R., GOETHERT, H. K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? Parasitology, United Kingdom. n. 129, p. 301-327, 2004.

TRIPLEHORN, C. A, JOHNSON, N. F. Estudo dos Insetos. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809 p.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 016/2012

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Protocolo nº: 942	Data de Registro CEUA: 22.02.2012
Projeto de Pesquisa: "Comparação morfo-fisiológica e ultraestrutural dos testículos de <i>Amblyoma cajennense</i> em jejum e alimentados"	

Pesquisador Responsável: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO.

Orientando(a): Luís Adriano Anholeto.

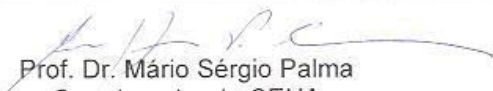
Colaborador(a): Pablo Henrique Nunes

Objetivo Acadêmico:	(X) TCC
	() Mestrado
	() Doutorado
	() Outros – (especificar)

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 12ª reunião ordinária, realizada em 30.05.2012.

()	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
(X)	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 30 de maio.


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
Coordenador da CEUA