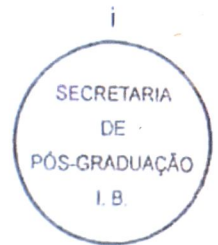


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



GIOVANA ANDRESSA TOMAINO GOMES

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO VENTRÍCULO E DO
OVÁRIO DE *Acutisoma longipes* (OPILIONES: GONYLEPTIDAE)
DURANTE O CICLO REPRODUTIVO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GIOVANA ANDRESSA T. GOMES
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Campinas, 2008.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G585c

Gomes, Giovana Andressa Tomaino
Caracterização morfológica do ventrículo e ovário de
Acutisoma longipes durante o ciclo reprodutivo / Giovana
Andressa Tomaino Gomes. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Flávio Henrique Caetano.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Intestino médio. 2. Jejum. 3. Fêmea. 4. Ovos.
5. Opiliões. I. Caetano, Flávio Henrique. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Título em inglês: Morphologic characterization of the ventricle and of the ovary of *Acutisoma longipes* (Opiliones: Gonyleptidae) during reproductive cycle.

Palavras-chave em inglês: Midgut; Starvation; Female; Eggs; Harvestmen.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Mary Anne Heidi Dolder, Fernando José Zara, Doralice Maria Cella, José Eduardo Serrão.

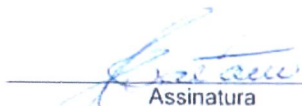
Data da defesa: 27/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 27 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

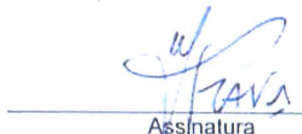
Prof. Dr. José Eduardo Serrão


Assinatura

Profa. Dra. Doralice Maria Cella


Assinatura

Prof. Dr. Fernando Jose Zara


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Assinatura

Profa. Dra. Karina Carvalho Mancini

Assinatura

*"O Senhor é meu pastor e nada me
faltará"*
(Sl 22, 1)

Dedico a...

Meu marido, Thiago, meu grande amor, aquele que me deu o melhor presente: o nosso Guilherme. Sem você não imagino a vida...

Dedico a...

Meu filho, Guilherme, a quem dei a vida e darei quantas vezes for preciso. Te amo sempre. “Você é assim, um sonho pra mim, quero te encher de beijos, eu penso em você desde o amanhecer até quando eu me deito...”

Dedico a...

*Meus pais, Regina e Alcides, a eles
minha eterna gratidão e amor.*

*Minha irmã, Giorgia, pela
verdadeira amizade.*

AGRADECIMENTOS

É chegada hora de agradecer as pessoas que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho:

À DEUS... obrigada pela graça da vida.

Ao meu marido, primeiramente pelo amor, amizade, companheirismo e paciência. Só você sabe me roubar um sorriso nas horas difíceis. Desculpe minha ausência em muitos momentos, a sua compreensão é fundamental para o acontecimento de tudo isso. É como você diz “todo esforço é válido uma vez que é feito para nós dois...”. Te amo.

Ao meu pequeno homenzinho por me ensinar um dos maiores valores da vida “a paciência”. Obrigada por me ensinar a amar incondicionalmente. Mamãe te ama.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio e por estarem ao meu lado todos os momentos me ensinando a crescer com honestidade e dignidade. Amo vocês.

À minha irmã pela amizade, carinho e pelas boas risadas quando nos pegamos a relembrar os bons momentos de nossa infância.

À minha mãe que tanto me auxilia cuidando e amando meu filho como se fosse seu próprio filho.

Aos meus familiares D. Regina, Sr. Flávio, Flavinho, Carlos, Beto, Ká, Déia, Rê, Getúlio, por todo carinho, apoio e incentivo, aos meus sobrinhos: Beatriz, Vinícius, Gabriel, Isabela, Maria Clara e à minha afilhada Ana Flávia, que com ingenuidade e simplicidade me ensinam a ser feliz. Todos vocês moram no meu ♥.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano pela amizade, profissionalismo e orientação de minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Glauco Machado por toda ajuda viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Doralice Maria Cella por toda ajuda e sugestões no desenrolar deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro pelos ensinamentos e colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro: Gerson Melo Souza, Lucila de Lurdes Segalla Franco e Cristiane, pela ajuda e atenção.

Aos técnicos do laboratório de Microscopia Eletrônica, Antonio Teruyoshi Yabuky e Monika Iamondi, pela grande colaboração.

Ao Departamento de Biologia Celular e ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biologia da UNICAMP, por toda compreensão e ajuda mesmo a distância.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação Prof^a Dr^a Laurecir Gomes, pela atenção.

À secretária do curso de Pós-Graduação Lílíam Panagio pela grande colaboração e presteza.

À minha amiga Karim por toda ajuda, idéia e troca da figurinhas... Mesmo na madrugada não perdíamos o humor.

Às amigas de muitas horas e boas gargalhadas (freqüentadoras assíduas do “rancho”) Thaisa, Karim, Débora, Sandra, Gabriela e Gislaine.

Aos companheiros e amigos de pós-graduação: Marielle, Milena, Jack, Daniela, Thaís, Tati, Jaqueline, Du, Reinaldo, Murilo, Bruno, Silvana, Fernanda, Luciana, Elaine, Roberta, Fabiana, Pablo, Patrícia, Fábio Britto e Thalita, pelo convívio e amizade.

Às amigas: Carol, Michele, Fabi e Milene, que mesmo longe não se afastavam das lembranças.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	01
2. ABSTRACT	04
3. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1. Material.....	19
5.2. Métodos	19
5.2.1. Classificação dos ovócitos	19
5.2.2. Microscopia de Luz.....	20
5.2.2.1. Análise Histológica.....	20
5.2.2.2. Análise Histoquímica.....	21
5.2.3. Microscopia Eletrônica.....	21
5.2.3.1. Análise Morfológica.....	21
5.2.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
5.2.3.2. Análise Ultra-Estrutural.....	22
5.2.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	22
5.2.3.2.1.1. Convencional.....	22
5.2.3.2.1.2. Citoquímica para Localização de Glicogênio (Afzelius).....	23
6. RESULTADOS	24
6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	25
6.1.1. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> sem ovos maduros.....	25
6.1.1.1. Análise do Ventrículo.....	25
6.1.1.2. Análise do Ovário.....	25
6.1.2. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> com ovos maduros.....	26
6.1.2.1. Análise do Ventrículo.....	26
6.1.2.2. Análise do Ovário.....	26
6.1.3. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> cuidando da prole.....	26
6.1.3.1. Análise do Ventrículo.....	26
6.1.3.2. Análise do Ovário.....	27

6.2. Histologia (coloração H-E).....	27
6.2.1. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> sem ovos maduros.....	27
6.2.1.1. Análise do Ventrículo.....	27
6.2.1.2. Análise do Ovário.....	28
6.2.2. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> com ovos maduros.....	29
6.2.2.1. Análise do Ventrículo.....	29
6.2.2.2. Análise do Ovário.....	29
6.2.3. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> cuidando da prole.....	30
6.2.3.1. Análise do Ventrículo.....	30
6.2.3.2. Análise do Ovário.....	30
6.3. Histoquímica.....	31
6.3.1. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> sem ovos maduros.....	31
6.3.1.1. Análise do Ventrículo.....	31
6.3.1.2. Análise do Ovário.....	32
6.3.2. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> com ovos maduros.....	33
6.3.2.1. Análise do Ventrículo.....	33
6.3.2.2. Análise do Ovário.....	34
6.3.3. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> cuidando da prole.....	35
6.3.3.1. Análise do Ventrículo.....	35
6.3.3.2. Análise do Ovário.....	36
6.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	37
6.4.1. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> sem ovos maduros.....	37
6.4.1.1. Análise do Ventrículo.....	37
6.4.1.2. Análise do Ovário.....	38
6.4.2. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> com ovos maduros.....	39
6.4.2.1. Análise do Ventrículo.....	39
6.4.2.2. Análise do Ovário.....	40
6.4.3. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> cuidando da prole.....	40
6.4.3.1. Análise do Ventrículo.....	40
6.4.3.2. Análise do Ovário.....	41
6.5. Citoquímica- Localização de Glicogênio (Afzelius).....	41
6.5.1. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> sem ovos maduros.....	41

6.5.1.1. Análise do Ventrículo.....	41
6.5.1.2. Análise do Ovário.....	42
6.5.2. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> com ovos maduros.....	42
6.5.2.1. Análise do Ventrículo.....	42
6.5.2.2. Análise do Ovário.....	42
6.5.3. Fêmeas de <i>Acutisoma longipes</i> cuidando da prole.....	42
6.5.3.1. Análise do Ventrículo.....	42
6.5.3.2. Análise do Ovário.....	43
7. DISCUSSÃO	148
8. CONCLUSÕES	164
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
APÊNDICE 1.....	177

1. RESUMO

Acutisoma (=G.) *longipes* Roewer, 1913 (Arachnida: Opiliones) é uma espécie de opilião pertencente à sub-ordem Laniatores. As fêmeas da espécie passam por um jejum durante o período de cuidados com a prole. Assim fêmeas sem ovos maduros, com ovos maduros e cuidando da prole foram coletadas e os ventrículos e ovário analisados com técnicas histológicas (hematoxilina-eosina), histoquímica para proteínas totais (azul de bromofenol e xilydine ponceau), polissacarídeos (PAS), proteínas colágenas (Picrosirius red) e proteínas ácidas (azul de toluidina), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e citoquímica ultra-estrutural para glicogênio. Histologicamente o ventrículo é formado de células digestivas e generativas. As primeiras têm características de células secretoras, com acúmulo citoplasmático de grânulos protéicos ácidos, formação e liberação de vesículas granulares para o lúmen. O ventrículo sofre retração e ocorre a diminuição de vesículas citoplasmáticas de secreção entre a fase em que a fêmea se alimenta e não tem ovos maduros para a fase em que permanece algum tempo em jejum e cuida da prole. O corpo gorduroso que circunda o ventrículo é considerado tecido de estocagem, dando suporte ao metabolismo do aparelho digestivo. Ultra-estruturalmente, distinguem-se três tipos de células no epitélio ventricular, as células digestivas, que provavelmente tornam-se células excretoras, e as secretoras, sendo as células excretoras escassas em fêmeas com prole. Em *Acutisoma longipes*, as células generativas ou de reposição têm núcleos grandes e pouco citoplasma não especializado, podendo se diferenciar ou em células digestivas, secretoras ou células de excreção.

O ovário das fêmeas na fase de cuidados com a prole apresenta camada de células epiteliais que também sofre retração, assim como ocorre no ventrículo no mesmo período fisiológico deste. Tais observações são constatadas com a MET, com a qual é evidente o estreitamento parcial do lúmen. Ovário caracteriza-se pela presença de ovócitos em toda sua extensão e pela ausência de células nutridoras.

Todos os graus de desenvolvimento dos ovócitos podem ser encontrados nas três fases de fêmeas estudadas. Isto demonstra ser a ovogênese um processo dinâmico e contínuo. Ovócitos sendo reabsorvidos são comuns na última fase (de cuidados com a prole) quando o tempo de jejum já é longo. A reabsorção de nutrientes de ovócitos pode ser nesse caso, para suprir o déficit nutricional e energético das fêmeas em jejum (cuidando da prole) até o momento que a cria é emancipada e a fêmea volta a se alimentar, e posteriormente entrar ou não em novo ciclo reprodutivo.

2 ABSTRACT

2. ABSTRACT

Acutisoma (=G.) *longipes* Roewer, 1913 (Arachnida: Opiliones) is a harvestmen of the suborder Laniatores. Females of this species do not feed while tending the brood care. In this study, females without mature eggs, with mature eggs, and tending the brood care were collected, and the ventriculi and ovaries were examined using histological techniques (hematoxylin-eosin), histochemistry for total proteins (bromophenol blue and xylidine ponceau), polysaccharides (PAS), collagenous proteins (picosirius red) and acidic proteins (toluidine blue), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), ultrastructural cytochemistry for glycogen. Histologically, the ventriculus consists of digestive cells and regenerative cells. The former exhibit characteristics of secretory cells, with granules of acidic proteins in the cytoplasm, forming vesicles containing granules and releasing them into the lumen. From the phase when the female feeds and does not carry mature eggs to the phase when she tends the brood and does not feed the ventriculus retracts and the amount of cytoplasmic secretory vesicles decreases. The fat body was observed surrounding the ventriculus. The fat body is considered an energy storage tissue, supporting the digestive system metabolism. Three different cell types were observed in the ventricular epithelium: Digestive cells, which probably become excretory cells, and secretory cells. Excretory cells are not abundant in females tending the brood. In *A. longipes*, regenerative cells have large nuclei and little undifferentiated cytoplasm, and can later be specialized to carry out digestive, secretory or excretory functions. The ovary of females in these phases exhibit a layer of epithelial cells and this organ also retracts similar to what is observed in the ventriculus, with a partial narrowing of the lumen. The presence of oocytes is characteristics of the ovary throughout its extension, as well as the absence of nurse cells. Young oocytes and these in other developmental stages are observed in females during the three phases examined, indicating that oogenesis is a dynamic and continuous process.

Oocytes being reabsorbed are common in the brood care phase when the starving period is long. The resorption of nutrients from oocytes in this case might reduce the nutritional and energetic deficit until emancipation of the brood when the female can feeding again and possibly begin a new reproductive cycle.

3 INTRODUÇÃO

3. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- A ordem Opiliones

Os aracnídeos formam o mais diverso grupo de quelicerados conhecido, com cerca de 75.000 espécies descritas, e 300.000 estimadas. Apesar da enorme diversidade de formas, os aracnídeos possuem muitas características comuns. O corpo se divide em prossomo e abdômen ou opistossoma. O prossomo não segmentado geralmente é coberto dorsalmente por uma carapaça sólida; a superfície ventral é provida de uma ou mais placas esternais ou é coberta pelas coxas dos apêndices. O abdômen é segmentado e divide-se em um pró-abdômen e um pós-abdômen. Os apêndices comuns a todos os aracnídeos têm origem no prossomo e constam de um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas (BARNES, 2005).

No Brasil, os opiliões são conhecidos por diversos nomes populares atribuídos à sua semelhança com as aranhas e ao forte odor que emitem: aranha bode, bodum, aranha fedida, frade fedorento, aranha de chão. São comumente confundidos com aranhas, mas diferem pela ausência de glândulas produtoras de seda ou veneno, ausência de um pecíolo ou pedicelo, conferindo a não-segmentação do corpo, e presença de um único par de ocelos e quelíceras queladas (BERLAND, 1949).

A ordem Opiliones inclui os opiliões, que representam o terceiro maior grupo em diversidade de espécies da classe Arachnida, menos diverso apenas que ácaros e aranhas (PINTO-DA-ROCHA, 1999). Os opiliões constituem um grupo bastante diversificado em hábitos e formas, sendo divididos em quatro subordens: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi e Laniatores (GIRIBET et al., 1999). Os Cyphophthalmi são um grupo pequeno, com cerca de 130 espécies distribuídas pelo mundo. Seus representantes são semelhantes a ácaros, pois são muito pequenos, apresentando corpo arredondado e pernas curtas. As subordens Eupnoi e Dyspnoi apresentam um pouco mais de 2000 espécies, concentradas

principalmente nas regiões temperadas e seus representantes possuem corpo pequeno e arredondado e pernas longas. Os Laniatores especificamente na América do Sul, apresentam uma grande variação morfológica, mas em geral, possuem corpo robusto, pernas longas e pedipalpos revestidos com espinhos (SHULTZ, 1998). No Brasil, a subordem Laniatores é a mais abundante e não existem registros de ocorrência de espécies da subordem Cyphophthalmi.

Espécies neotropicais do gênero *Acutisoma* (Laniatores: Gonyleptidae), são representadas por indivíduos grandes, habitantes de cavernas, fendas em rochas e troncos de árvores (MACHADO, 2002). A espécie *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* Roewer 1913, anteriormente classificada como, estudada neste trabalho tem ampla distribuição no sudeste do Brasil, onde populações foram registradas em cavernas de arenito (GNASPINI; TRAJANO, 1994) e em cavernas graníticas úmidas (MACHADO; OLIVEIRA, 1998). Neste ultimo ambiente muitos indivíduos são vistos em descanso na parede da caverna, que é também o local preferido pela fêmea para a oviposição. A atividade rítmica desempenhada por indivíduos da espécie, mostra que estes usam a caverna como abrigo e local reprodutivo (MACHADO; OLIVEIRA, 1998), mas eles deixam a caverna periodicamente para o forrageamento noturno, podendo ser considerados troglóxenos (MACHADO et al., 2000). O tráfego entre a caverna e o meio externo, feito por *A.*(=*G.*) *longipes* parece ser influenciado pelo fotoperíodo, com os indivíduos deixando a caverna após o entardecer e retornando antes do amanhecer. Os indivíduos forrageiros usam o mesmo caminho, tanto na entrada como na saída do abrigo (MACHADO et al., 2000).

Observações realizadas durante o ciclo de vida de fêmeas de *Acutisoma longipes* indicam que as mesmas passam por um período de jejum, período este que se inicia imediatamente antes da oviposição (MACHADO, 2002).

- Ecologia

A maior diversidade da ordem ocorre em áreas tropicais, em ambientes menos estressantes fisiologicamente, com moderadas variações de temperatura e umidade ao longo do ano (COKENDOLPHER et al., 1993). Todas as espécies de opiliões são terrestres e respiram por espiráculos e traquéias. De maneira geral, abrigam-se em locais protegidos da luz, uma vez que muitos são fotofóbicos. Podem ser encontrados numa grande variedade de habitats como no solo, sobre musgos e vegetação, no folhiço, sob pedras e em superfícies verticais, como troncos de árvores e paredes de cavernas (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1958). Ao anoitecer saem dos abrigos em busca de alimento. Esses animais são pouco conhecidos pelo público, devido, talvez a seus hábitos crípticos e noturnos, resultando em reduzido número de trabalhos na literatura.

Diferente dos demais aracnídeos, os opiliões apresentam comportamento gregário, no qual se formam grupos de pelo menos três indivíduos a dezenas, cujas pernas se sobrepõem (MACHADO et al., 2000). As explicações para tal comportamento são variadas e relacionam com a escolha de ambientes que possam diminuir o risco de desidratação e evaporação, além de aumentar a capacidade defensiva pela ação coletiva de descarga das substâncias repugnatórias.

A fauna de formações mais secas, como cerrado e caatinga, possui diversidade muito menor, podendo ocorrer menos de 10 espécies por área; entretanto, espécies de áreas úmidas, possuem uma distribuição geográfica muito mais ampla. No Brasil, por exemplo, a fauna de caverna compreende pelo menos vinte e seis espécies de seis famílias (ADIS, 1997).

Existem várias espécies de opiliões que vivem em cavernas. De acordo com sua dependência ecológica e evolutiva com o meio subterrâneo, os animais cavernícolas podem ser classificados em: (1) troglóbios, que são espécies restritas ao ambiente cavernícola e no qual completam todo o ciclo de vida; (2) troglófilos,

espécies cujos indivíduos podem ser encontrados tanto dentro, quanto fora do ambiente cavernícola e completam seu ciclo facultativamente na caverna ou no ambiente externo e (3) troglóxenos, espécies das quais os indivíduos saem obrigatoriamente da caverna para cumprir parte de seu ciclo de vida, seja para alimentação e/ou reprodução (GNASPINI, 1996).

- Hábitos alimentares e aspectos da digestão

Os opiliões, em geral são carnívoros, alimentando-se de pequenos artrópodes, mas podem ser encontradas espécies saprófagas ou onívoras. Adicionalmente, a maioria das espécies, por ser fotofóbica, se alimenta e se reproduz à noite (SAVORY, 1938), sendo que logo ao entardecer eles iniciam sua atividade e voltam aos seus refúgios no alvorecer (GNASPINI, 1996). O alimento é detectado com o segundo par de pernas, agarrado com o auxílio dos pedipalpos e passado para as quelíceras onde é triturado (SANTOS et al., 2002). A morfologia das quelíceras, que são usadas para manipular e macerar a presa é, provavelmente, o principal componente que determina a seleção de presas (ACOSTA; MACHADO, 2007).

A dieta generalista e voraz da maioria dos opiliões é dependente das características locais e da abundância de presas. Com base nas preferências alimentares apresentadas pelos opiliões, os itens alimentares consumidos parecem ser selecionados pelo tamanho e a resistência cuticular da presa. Certas diferenças já foram demonstradas com relação à importância e predominância de certos hábitos alimentares de indivíduos da mesma espécie, diferenças essas dependentes do microhabitat em que os animais estão inseridos (ACOSTA; MACHADO, 2007). Ao contrário do que ocorrem com muitas aranhas, os opiliões não resistem a longos períodos sem água ou alimento (SANTOS et al., 2002).

Na ordem Opiliones apresentam a digestão extra-oral, porém o alimento ingerido não se limita ao material liquefeito, pois inclui também pequenas partículas sólidas (SANTOS et al., 2002).

Nesses animais o trato digestivo é dividido em três regiões principais, o intestino anterior, o médio ou ventrículo e o posterior. Essas regiões diferem em sua histologia, em consequência de suas origens embrionárias. Os intestinos anterior e posterior se originam de uma dobra da ectoderme, são revestidos por uma camada de cutícula, a qual é uma continuação da cutícula da parede do corpo. Já o ventrículo é originado da endoderme. O ventrículo difere dos intestinos anterior e posterior principalmente pela ausência da camada de cutícula (COMSTOCK, 1975).

A porção anterior do ventrículo é ramificada em vários cecos ou divertículos formando a unidade funcional do trato digestivo (BECKER; PETERS, 1985b). O sistema de divertículos ocupa a maior parte do opistossoma. O epitélio destes divertículos se apóia na lâmina basal e está circundado por um tecido intermediário e por uma rede de músculos. As células do tecido intermediário, provavelmente, têm a função de armazenar material de reserva que pode ser tanto glicogênio como lipídeo, ou mesmo ambos (BECKER; PETERS, 1985a).

No ventrículo ocorre a digestão e absorção de nutrientes oriundos da digestão externa (BECKER; PETERS, 1985b). Assim como em pseudoescorpiões (GILBERT, 1952) os divertículos do ventrículo constituem o principal órgão de digestão, estocagem de nutrientes e excreção. O alimento entra na porção anterior do ventrículo com consistência fluida ou semifluida (BECKER; PETERS, 1985b). Essa mistura de alimento e saliva é transportada até o lúmen do ventrículo (KASTNER, 1933 apud BECKER; PETERS, 1985b), ocorrendo a liberação pelas células de enzimas para a digestão que podem ser, tanto proteases como amilases (BECKER; PETERS, 1985a). Dentro dos divertículos, partículas da pré digestão são capturadas por pinocitose sofrendo digestão intracelular e o material não digerido é então excretado das células e transportado para a porção posterior do ventrículo (BECKER; PETERS, 1985a).

Muitos aracnídeos são favorecidos com uma notável capacidade para jejuar por longos períodos, vivendo assim de suas reservas energéticas (SAVORY, 1977). Em pseudoescorpiões a sobrevivência sem alimento pode durar semanas

ou até meses, graças à capacidade específica dos divertículos do ventrículo em armazenar glicogênio e lipídeo (WEYGOLDT, 1969). Em opiliões o lipídeo também funciona como importante material de reserva energética, visto que quando esses animais foram privados de alimento os estoques lipídicos foram perdidos (BECKER; PETERS, 1985a).

Diante de situações em que animais são privados de alimentos, o trato digestivo e principalmente sua porção funcional na digestão, como o ventrículo devem passar por remodelações celulares, visto que tanto a fisiologia como o metabolismo desses animais está alterado, tal como ocorre em aracnídeos.

- Aspectos da reprodução

Assim como o trato digestivo, o aparelho reprodutor da fêmea em opiliões está localizado no opistossoma, ventralmente em relação ao ventrículo. Como na maioria dos aracnídeos, o sistema reprodutor das fêmeas de opiliões é composto de ovário, que é apenas um, em forma de ferradura, assim como ocorre em carrapatos (SAID, 1992). Seguem ovidutos laterais, que em opiliões unem-se distalmente formando o oviduto comum ou útero, a vagina, glândulas acessórias e receptáculos seminais ou espermatecas, que são divertículos da vagina, frequentemente esclerosadas que se abrem junto à abertura genital. Como em todos aracnídeos, a vagina localiza-se entre o segundo e terceiro esternito do opistossoma (WEYGOLDT, 1969). O sistema reprodutor dos opiliões ainda inclui estruturas que não existem em outros aracnídeos, com exceção de alguns ácaros, que é o ovipositor. O ovipositor é tubular e localizado na porção mediana do ventre. Sua parede, em muitas espécies, contém anéis de quitina, ligados por delgadas membranas (BARNES, 2005). Tal ovipositor é uma estrutura retrátil e projetada para fora do orifício genital para possibilitar o processo de oviposição, como constatado em opiliões (JUBERTHIE, 1965).

O ovário em aracnídeos é revestido internamente por uma camada de células epiteliais e externamente pela membrana basal e ocasionalmente por

células da musculatura lisa e o tecido conectivo acelular, a *tunica propria*. Os ovócitos são inicialmente sustentados por células da parede do ovário que formam assim o pedicelo ou funículo como observado em carrapatos e pseudoescorpiões (; SONENSHINE, 1991; SAID, 1992; KONDO et al., 1993). São pequenas células alinhadas ao longo da parte externa desse epitélio, projetando-se para fora do órgão.

A região proximal do ovário, na qual os ovidutos se abrem é dita ampola, como citado para carrapatos e para outros aracnídeos, e os ovidutos são considerados prolongações do ovário (SONENSHINE, 1991).

Em geral, nos aracnídeos, as ovogônias parecem ser o primórdio germinativo, ainda no estágio larval, permanecendo assim até a última muda da ninfa (SONENSHINE, 1991). Inicia-se então a ovogênese com a transformação de muitas ou da maioria das ovogônias em ovócitos primários (BALASHOV, 1963). Cada ovócito encontra-se aderido à parede do ovário pelo funículo, durante ou logo após a passagem do último estágio de ninfa. Até o estágio II, segundo Balashov (1963), os ovócitos estão na fase pré-vitelogênica.

Nos estágios III e IV ocorre a deposição de vitelo, diferente do que ocorre em insetos onde os ovócitos desenvolvem-se enquanto movem-se posteriormente ao longo do ovariolo e o depósito de vitelo ocorre somente no vitelário (KOEPE et al., 1985). Tanto em aracnídeos, como carrapatos (SONENSHINE, 1991) e pseudoescorpiões (WEYGOLDT, 1969), os ovócitos permanecem estacionados e ocorre a deposição do vitelo. Os ovócitos maduros e vitelogênicos expandem-se para a hemocèle e logo são ovulados, passando para dentro do lúmen do ovário (SONENSHINE, 1991). No lúmen do ovário ou no oviduto ocorre a fecundação, o ovócito sofre a primeira divisão meiótica tornando-se ovócito secundário. A ovogênese é completada após a oviposição com a divisão reducional final (segunda divisão da meiose) (BALASHOV, 1963).

A falta de trabalhos específicos que descrevam as estruturas internas e caracterização histológica de órgãos e sistemas internos de opiliões faz com que os trabalhos existentes com esse grupo, sejam baseados em descrições gerais ou

em descrições feitas para os grupos mais estudados, como as aranhas e/ou carrapatos. Em Laniatores, subordem a qual pertence *Acutisoma longipes*, poucas espécies tiveram a morfologia do ventrículo descrita, principalmente em situações adversas como o jejum. O mesmo pode ser constatado em relação ao ovário e a ovogênese para o grupo, no qual não existem trabalhos com este tipo de abordagem.

4 OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

A fisiologia básica de opiliões é pouco conhecida e descrições morfológicas de algumas estruturas internas se fazem necessárias. Assim, a ausência de informações específicas levam muitas vezes, a generalizações funcionais de um órgão em particular, descrito para aranhas, escorpiões e ácaros, os quais são aracnídeos já bem estudados.

Levando-se em consideração esta escassez de informações a respeito da biologia digestiva e reprodutiva deste grupo, bem como da morfologia do ventrículo, do ovário e da ovogênese, o presente estudo investigou as fêmeas sem ovos maduros, com ovos maduros e cuidando da prole de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* Roewer, 1913. Durante este último período estas fêmeas não se alimentam, ficando, portanto, em jejum absoluto. Assim sendo este trabalho visou:

- Descrever histológica, histoquímica e ultra-estruturalmente, de maneira comparativa, o ventrículo e o ovário de fêmeas de *A. (=G.) longipes*, durante os vários períodos da vida destes animais, visando mostrar as variações que ocorre nos mesmos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* Roewer, 1913 foram observadas no início da estação reprodutiva da espécie (Outubro a Fevereiro) nos anos de 2004, 2005, 2006 e 2007. Estas fêmeas encontravam-se nas seguintes fases: com ovos imaturos, com ovos maduros e cuidando da prole.

Os indivíduos das três fases foram coletados em cavernas graníticas úmidas do Parque Florestal do Itapetinga 46° 29' 46" W longitude, 26° 07' 24" S latitude, Atibaia, São Paulo na sua estação reprodutiva. Em cada uma das coletas, seis fêmeas de cada fase foram separadas para utilização de seus ventrículos e ovários nas análises de microscopia de luz e eletrônica.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. CLASSIFICAÇÃO DOS OVÓCITOS (segundo BALASHOV, 1963)

Os ovócitos encontrados em *A. longipes*, que podem ser classificados no estágio I conforme Balashov (1963) e Denardi et al. (2004) para carrapatos são pequenos e arredondados, o citoplasma é homogêneo com o núcleo ou vesícula germinativa com contorno irregular e grânulos e um grande nucléolo. Nessa fase os ovócitos são fortemente marcados pela reação de azul de toluidina ácida sendo tal marcação devido a grande quantidade de RNA em seu citoplasma.

No estágio II de desenvolvimento os ovócitos são vistos maiores que os anteriores, são redondos, o núcleo ainda é observado e o citoplasma apresenta finas granulações, marcando o início da incorporação do vitelo (BALASHOV, 1963; DENARDI et al., 2004).

Como já descrito por Balashov (1963) e Denardi et al. (2004) para carrapatos, os ovócitos de *A. longipes* no estágio III têm o citoplasma com

granulações maiores que o estágio II, o núcleo e nucléolo nem sempre são visíveis e já apresentam as características do cório e os mesmos tipos de marcações histoquímicas, assim como também acontece no estágio seguinte. No estágio IV as granulações são maiores, o cório já está formado e o núcleo raramente é observado.

Em *A. longipes* os ovócitos no estágio V são ainda maiores, as granulações ocupam todo citoplasma, podem ser evidenciadas diferentes camadas no cório, atingindo assim o grau máximo de desenvolvimento, conforme observado em carrapatos (BALASHOV, 1963; DENARDI et al., 2004).

5.2.2. MICROSCOPIA DE LUZ

Fêmeas de opiliões foram dissecadas em solução salina tamponada para insetos (7.5 g/L de NaCl, 2.38 g/L de KH_2PO_4 , 2.77 g/L de Na_2HPO_4 de H_2O destilada). Os ventrículos e ovários isolados foram fixados por uma semana em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio pH 7.4. Posteriormente, foram colocados em tampão fosfato de sódio pH 7.4 por 24 horas, desidratados em uma série de etanol de concentração crescente e incluídos em resina JB- 4 (Polysciences). Os cortes, com espessura de 5 μm foram realizados em histomicrotomo LEICA RM2145, recolhidos em lâminas de vidro e então foram submetidos às diferentes técnicas de microscopia de luz.

5.2.2.1. Análise Histológica

As secções foram coradas com hematoxilina/eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) por 10 e 5 minutos, respectivamente (rotina), montadas com bálsamo do Canadá e lamínula, examinadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM2000, acoplado a um sistema de captura de imagens. Para as análises das imagens foi utilizado o programa Leica IM50 – Image Manager.

5.2.2.2. Análise Histoquímica

As secções histológicas foram submetidas às reações histoquímicas. Para a detecção de estruturas ácidas dos tecidos foi utilizada o azul de toluidina pH 3.5 (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Para a detecção de proteínas totais, foi utilizado o azul de bromofenol, (PEARSE, 1960) e xylidine ponceau (MELLO; VIDAL, 1980). Glicoconjugados neutros foram detectados pela técnica do PAS (ácido periódico-Schiff) (McMANUS, 1946). A técnica do PAS e azul de bromofenol conjugados (COELLO, 1989) foi utilizada para a detecção simultânea de glicoconjugados neutros e proteínas totais. O método do picrosirius (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), o qual utiliza o corante direct red, foi utilizado para a detecção de colágeno.

As lâminas submetidas às reações foram então montadas com bálsamo do Canadá e lamínula, examinadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM2000, acoplado ao sistema de captura de imagens. Para as análises das imagens foi utilizado o programa Leica IM50 – Image Manager.

5.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

5.2.3.1. Análise Morfológica

5.2.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fêmeas de opiliões foram dissecadas em solução fixadora Karnovsky para MEV (glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.4). O ventrículo os ovários, isolados, foram fixados nessa mesma solução, por dois dias à temperatura ambiente. Em seguida, foram desidratados em uma série de soluções de acetona de concentração crescente (50%, 70%, 90%, 95%),

colocados em dois banhos de 5 minutos cada em acetona pura, secos no ponto crítico pelo aparelho Balzers CPD030, fragmentados com auxílio de um bisturi, recobertos com uma película de carbono/ouro em aparelho vaporizador Balzers CPD050 e examinados ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-P15 e/ou Philips SEM-505.

5.2.3.2. Análise Ultra-Estrutural

5.2.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

5.2.3.2.1.1. Convencional

Fêmeas de opiliões foram dissecadas em solução fisiológica salina para insetos. O ventrículo e os ovários foram fixados em glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.2 por 10 dias à 4°C. Posteriormente foram lavados no mesmo tampão (duas vezes durante 30 minutos), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 (duas horas, à temperatura ambiente), lavados em água destilada (duas vezes, por 5 minutos cada), contrastado em acetato de uranila 0.5% em solução aquosa (por 2 horas, à temperatura ambiente). Então foram desidratados em uma série de soluções de concentração crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 95%), colocados em dois banhos de acetona pura por 5 minutos, cada, infiltrados e incluídos em resina Epon-Araldite.

O material foi seccionado e os cortes semi-finos, com aproximadamente 0.5µm de espessura, foram corados com solução contendo azul de metileno 1% e azur II 1% em solução de borax 1%, para seleção dos melhores blocos. As secções ultra-finas, obtidas em ultra-micrótomo foram recolhidas em grades de cobre e contrastadas em acetato de uranila 1% em água e com citrato de chumbo 0.4%. As observações foram realizadas em Microscópio Eletrônico de

Transmissão CM 100 - Philips e documentadas com filme Eastman – Motion Picture Film 5302.

5.2.3.2.1.2. Citoquímica para Localização de Glicogênio - Afzelius (AFZELIUS,1992)

As grades contendo os cortes ultra-finos com material processado para a técnica de rotina em microscopia eletrônica de transmissão, de acordo com o item 5.2.2.1.1, porém sem a incubação em acetato de uranila 0.5%, foram tratadas com ácido tânico 1% (em água destilada) durante 30 minutos. Posteriormente, as grades foram lavadas com água destilada, contrastadas com acetato de uranila 4% (em água destilada) durante 60 minutos, lavadas em água destilada e examinadas sem qualquer outra contrastação, em Microscópio Eletrônico de Transmissão CM 100 - Philips e documentadas com filme Eastman – Motion Picture Film 5302.

6 RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

6.1.1. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* sem ovos maduros

6.1.1.1. Análise do Ventrículo

No ventrículo das fêmeas observa-se a organização em divertículos (Figura 1A), externamente recobertos por corpo gorduroso que aparece como uma camada ondulada (Figura 1B).

Os vacúolos do corpo gorduroso são arredondados (Figura 2A). Esta forma corresponde ao espaço onde estavam gotas de lipídeo.

O epitélio do ventrículo é composto por células alongadas (Figura 1C), apoiadas na lâmina basal e na camada muscular (Figura 2B). O citoplasma destas células contém vacúolos e vesículas, principalmente na porção apical (Figuras 1D, 2B, 2C). Estas vesículas destacam-se da célula e vão em direção ao lúmen (Figuras 2C, 2D).

6.1.1.2. Análise do Ovário

Na porção externa do ovário podem ser observados ovócitos aderidos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 3A).

O epitélio é formado por células cúbicas (Figura 3B), as quais apresentam-se com vesículas de secreção na porção apical, bem como vesículas sendo liberadas para o lúmen (Figuras 3C, 3D).

Ovócitos em estágios mais avançados de desenvolvimento ao lado de outros menos desenvolvidos (Figuras 4A, 4B) foram detectados no ovário. Ligando o ovócito ao ovário encontra-se o pedicelo (Figura 4B). Na extremidade do ovário,

os dutos laterais apresentam-se com região mais dilatada, que é chamada de útero (Figura 4C).

6.1.2. Fêmeas de *Acutisoma* (=Goniosoma) *longipes* com ovos maduros

6.1.2.1. Análise do Ventrículo

No ventrículo de fêmeas nesta fase observam-se características semelhantes às descritas para fêmeas da fase anterior (Figuras 5A, 5B), porém o corpo gorduroso parece conter maior acúmulo de gotas lipídicas (Figura 5C). O epitélio ventricular encontra-se apoiado sobre a lâmina basal (Figura 6A); apresenta grande quantidade de vacúolos (Figuras 6A, 6C) e acúmulos de grânulos por todo o citoplasma (Figuras 6B, 6C).

6.1.2.2. Análise do Ovário

Nesta fase, o ovário, assim como já acontecia na fase anterior, mostra-se com muitos ovócitos aderidos à sua parede externa, ovócitos estes em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 7A).

Enquanto alguns destes ovócitos estão no início ou em estágio mais avançado de desenvolvimento, outros estão em processo de reabsorção (Figura 7B). Os ovócitos em estágios mais desenvolvidos apresentam-se com acúmulo de grânulos densos em seu interior (Figuras 7C, 7D).

6.1.3. Fêmeas de *Acutisoma* (=Goniosoma) *longipes* cuidando da prole

6.1.3.1. Análise do Ventrículo

O ventrículo de fêmeas nesta fase, anatomicamente, é semelhante ao ventrículo das demais fases estudadas (Figura 8A).

O corpo gorduroso ao redor do epitélio ventricular apresenta-se menor, se comparado às fases anteriormente descritas, com células mais baixas que as demais fases (Figuras 8B, 8C). O epitélio ventricular com células alongadas (Figuras 8C, 8E), apoiadas na musculatura (Figura 8A). Estas células contêm vacúolos e também grânulos na sua porção mais apical (Figuras 8D, 8E).

6.1.3.2. Análise do Ovário

O ovário apresenta-se com muitos ovócitos aderidos (Figuras 9A, 9B). Em corte transversal observa-se que a região do duto do ovário é composta por células cúbicas, estando esse epitélio envolto por material acelular (Figura 9C).

Em continuação ao ovário observa-se a região do duto lateral (Figura 9D). Na região de união entre ovário e ovócito observa-se o pedicelo com células em arranjo semelhante a funis (Figuras 10A, 10B), como o prolongamento do epitélio, envolto por membrana, que parece ser contínua com o daquela do ovócito (Figura 10B). Alguns ovócitos em desenvolvimento são observados contendo uma “cicatriz” percorrendo sua parede externa (Figura 10C). Esta cicatriz parece ser ramo do sistema traqueal entre o ovócito e a membrana que o envolve. Outros ovócitos em processo de reabsorção não mais apresentam forma ovalada, sendo irregulares e com aparente perda de turgidez, que é característica dos ovócitos típicos (Figura 10D).

6.2. Histologia – coloração hematoxilina-eosina

6.2.1. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* sem ovos maduros

6.2.1.1. Análise do Ventrículo

O ventrículo da fêmea da espécie de opilião *Acutisoma longipes* possui epitélio, aparentemente, formado por população uniforme de células digestivas e

generativas (Figuras 11A-C). O epitélio é alto, com células alongadas e claviformes (Figura 11D) com núcleos predominantemente basais (Figura 11C). Essas células apresentam o citoplasma vacuolizado e com acúmulos de grânulos (Figuras 12A, 12B), o ápice é levemente dilatado e contém grandes vesículas de secreção (Figura 12B). A secreção é liberada sob a forma de vesículas, contendo grânulos eosinófilos, que brotam do ápice (Figuras 12A, 12B). Essas vesículas destacam-se da célula do epitélio e passam a ocupar o lúmen (Figura 12B). Um tipo de material granular que parece não ter afinidade pelos corantes está presente nas células epiteliais (Figuras 11B, 11C, 12B).

O epitélio está apoiado na lâmina basal, relativamente espessa (Figuras 11C, 12C). Na base desse epitélio encontram-se as células generativas em grupos isolados, assentadas sobre a lâmina basal, porém seus ápices não alcançam o lúmen do ventrículo (Figura 11C).

Em torno do ventrículo encontra-se o corpo gorduroso bastante conspícuo (Figuras 12C, 12D), formado por células poliédricas ou arredondadas, com núcleos esféricos e grande nucléolo (Figuras 12C, 12D). No corpo gorduroso está presente grande quantidade de gotas lipídicas (Figuras 12C, 12D). Porém a presença desses vacúolos é variável numa mesma secção histológica, onde se observa regiões com acúmulo destes e outras onde os mesmos são escassos (Figuras 12C, 12D).

6.2.1.2. Análise do Ovário

O ovário de fêmeas da espécie *Acutisoma longipes* apresenta-se como estrutura tubular (Figura 13), estendido posteriormente assumindo a forma de U.

O epitélio é delgado, simples e constitui-se de células cúbicas com núcleos arredondados (Figura 14A). Os ovócitos são vistos em diferentes estágios de desenvolvimento. Alguns ovócitos são pequenos, apresentam o núcleo ou vesícula germinativa, com grande nucléolo e citoplasma homogêneo (ovócito I),

outros ovócitos são maiores com pequenas granulações citoplasmáticas (ovócito II e III) (Figuras 13, 14B).

Estes ovócitos estão conectados ao ovário pelo pedicelo (Figuras 14C, 14D) que é formado de pequenas células com núcleos redondos. Na base do epitélio ovariano está presente a lâmina basal e logo abaixo desta, a musculatura lisa (Figura 14C).

6.2.2. Fêmeas de *Acutisoma* (=Goniosoma) *longipes* com ovos maduros

6.2.2.1. Análise do Ventrículo

O ventrículo dessas fêmeas é igual ao estágio anterior (Figuras 15A, 15B, 15D). Estas células apresentam o citoplasma com grande acúmulo de grânulos (Figura 15C) e vesículas digestivas (Figura 15B). O material granular aglomerado, que parece não ter afinidade pelos corantes é encontrado somente em algumas das células do ventrículo (Figuras 15C, 15D). O ápice das células digestivas mostra-se dilatado com núcleos apicais (Figura 15D). Na base do epitélio se observa grupos de células generativas (Figura 16A, 16B) e musculatura (Figura 16B). Em torno do ventrículo encontra-se o corpo gorduroso, composto de células arredondadas contendo muitas gotas lipídicas, núcleos grandes e notável nucléolo. Também se observa pequenos grânulos acidófilos no citoplasma dessas células (Figura 16C).

6.2.2.2. Análise do Ovário

O ovário nesta fase apresenta o epitélio simples com células cúbicas com núcleos ovais (Figuras 17A-C). No ápice dessas células observa-se a liberação de secreção para o lúmen (Figuras 17C, 17D). Os ovócitos são visto em diferentes estágios de desenvolvimento, inclusive observa-se ovogônias (Figuras 17A, 18A). Acúmulo de material granular, constituintes do vitelo, é evidente (Figura 17A);

entretanto também observa-se ovócitos sendo reabsorvidos (Figura 18B). Os ovócitos são conectados ao epitélio pelo pedicelo (Figura 18C), abaixo do qual vê-se células musculares (Figura 17C).

6.2.3. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* cuidando da prole

6.2.3.1. Análise do Ventrículo

O epitélio é mais baixo do que o do ventrículo de fêmeas dos dois estágios anteriores (Figura 19A). Observa-se poucas vesículas e grânulos no citoplasma (Figuras 19B, 19C). Células generativas em grupos isolados são vistas na porção basal do epitélio (Figura 19B), o qual se apóia na lâmina basal (Figura 19C) e se observam feixes de musculatura abaixo dessa lâmina (Figura 19D). O corpo gorduroso apresenta-se com células arredondadas e com poucas gotas lipídicas (Figura 19D).

6.2.3.2. Análise do Ovário

Em fêmeas com cuidados com a prole o ovário apresenta-se mais reduzido do que em estágios anteriormente analisados (Figura 20A), tem o epitélio formado de células cúbicas com núcleos elípticos (Figuras 20B, 20C). Observa-se pedicelos formados de células epiteliais e pelos quais estão conectados os ovócitos ao longo de todo ovário (Figuras 20A, 20B, 20D). No lúmen do ovário nota-se a secreção basófila (Figuras 20B-D). Encontram-se ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figuras 20A-C), inclusive em estágio avançado de reabsorção (Figura 20E). Externamente ao epitélio ovariano observa-se musculatura (Figuras 20B, 20C) e uma camada acelular e amorfa, a túnica própria (Figuras 20A, 20B).

6.3. Histoquímica

6.3.1. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* sem ovos maduros

6.3.1.1. Análise do Ventrículo

No material submetido à técnica do PAS, para glicoconjugados neutros, nota-se marcações positivas em aglomerados citoplasmáticos. A lâmina basal do ventrículo apresenta-se fortemente positiva, assim como a lâmina basal do corpo gorduroso. Células generativas em agrupamentos isolados reagem ao verde de metila utilizado como contra corante (Figuras 21A, 21B).

As secções submetidas à técnica de azul de bromofenol para proteínas totais apresenta-se com reação positiva apenas em grânulos de secreção do citoplasma de células epiteliais (Figuras 21C, 21D). Na reação para PAS e azul de bromofenol, simultaneamente, para detecção de glicoconjugados neutros e proteínas totais, observam-se reação positiva na lâmina basal, em aglomerados citoplasmáticos e em grânulos presentes no citoplasma, os quais têm caráter protéico, evidenciado pela reação com azul de bromofenol (Figuras 21E, 21F).

As células epiteliais apresentam-se com locais positivos à reação de azul de toluidina ácida, principalmente em um tipo de grânulos citoplasmáticos e vesículas de secreção na porção apical das células. Outros grânulos aparecem sem marcações para a técnica. A lâmina basal do epitélio do ventrículo apresenta-se com reação fracamente positiva (Figuras 22A-C). Nucléolos tanto das células epiteliais como do corpo gorduroso mostram-se evidentes com a técnica de xylidine ponceau (Figuras 22E, 22F). Com a técnica de xylidine ponceau, para proteínas totais, o corpo gorduroso e células epiteliais mostram-se negativos à reação, enquanto notam-se grânulos citoplasmáticos fortemente positivos (Figuras 22D-F). Com a técnica do picrosirius red apenas a lâmina basal do epitélio e a presente junto ao corpo gorduroso apresentou-se com reação fortemente positiva. Observam-se algumas marcações citoplasmáticas fracas (Figuras 22G, 22H).

Nucléolos de células epiteliais ou do corpo gorduroso mostram-se fortemente positivos à técnica.

6.3.1.2. Análise do Ovário

Para o PAS apenas a lâmina basal do epitélio ovariano apresenta-se com reação positiva. Nos ovócitos, a parede deste, ou cório, em torno dos ovócitos, nota-se reação positiva evidente, assim como parte das granulações citoplasmáticas desses ovócitos (Figuras 23A, 23B).

Para a técnica de azul de bromofenol observa-se reação positiva em regiões citoplasmáticas do epitélio ovariano, assim como na secreção do lúmen, porém com fraca intensidade. Ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento apresentam-se fortemente positivos à reação (Figuras 23C, 23D). Para a técnica simultânea de PAS e azul de bromofenol, observa-se reação positiva na lâmina basal do epitélio ovariano, em regiões citoplasmáticas e em granulações nos ovócitos, assim como no nucléolo presente na vesícula germinativa (Figuras 23E, 23F).

Para a técnica de azul de toluidina ácida, notam-se evidentes marcações citoplasmáticas apicais nas células epiteliais, assim como na secreção presente no lúmen. Os ovócitos, em estágios iniciais de desenvolvimento apresentam-se com reação fortemente positiva (Figuras 24A-C). As células do epitélio ovariano apresentam-se com regiões citoplasmáticas fortemente positivas ao xylidine ponceau. A secreção no lúmen também se apresenta com reação de mesma intensidade à técnica. Ovócitos no início do desenvolvimento apresentam reação fortemente positiva, assim como os nucléolos (Figuras 24D-F). Analisando-se o material com reação ao picrossirus red, observa-se a reação positiva para colágeno na lâmina basal em torno do epitélio ovariano e na *tunica propria* abaixo da lâmina basal (Figuras 24G, 24H).

6.3.2. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* com ovos maduros

6.3.2.1. Análise do Ventrículo

Tanto na lâmina basal do epitélio ventricular como naquela que circunda o corpo gorduroso, observa-se reação positiva para a detecção de glicoconjugados neutros. O mesmo ocorre com finas granulações no citoplasma das células epiteliais e das células do corpo gorduroso (Figuras 25A, 25B). Com a técnica de azul de bromofenol detecta-se proteínas tanto em grânulos de secreção das células epiteliais, onde a reação é fortemente positiva, como em granulações no citoplasma de células do corpo gorduroso. Em vesículas apicais não se nota tal reação (Figuras 25C-F).

Com a técnica de PAS e azul de bromofenol simultânea, obteve reação positiva na lâmina basal dos dois tecidos, nos grânulos de secreção presentes nas células epiteliais e naqueles presentes no citoplasma de células do corpo gorduroso (Figuras 25G, 25H).

Nas células epiteliais observa-se grânulos de secreção fortemente marcados pelo azul de toluidina, revelando o caráter ácido dessa secreção. Não observam outras marcações citoplasmáticas (Figuras 26A-C). Esses mesmos grânulos de secreção, localizados por toda a célula, principalmente na porção apical, apresentam-se com reação positiva à técnica de xylidine ponceau, para proteínas totais. Grande quantidade de granulações que não apresentam reação positiva ao xylidine ponceau estão presentes (Figuras 26D, 26E). Granulações com reação positiva também são observadas nas células do corpo gorduroso (Figura 26F), assim como observado com a técnica de azul de bromofenol (Figura 25D). A lâmina basal que acompanha o epitélio, e aquela que circunda o corpo gorduroso, apresentam-se com reação positiva à técnica do picrossirus red. Grânulos citoplasmáticos de células epiteliais são marcados positivamente, sendo a reação mais forte na periferia desses grânulos (Figuras 26F, 26G).

6.3.2.2. Análise do Ovário

Todo o epitélio ovariano apresenta células com citoplasma fortemente positivo, à reação de PAS. Observa-se também reação positiva em granulações dos ovócitos, sendo que a marcação mais forte ocorre em ovócitos em estágio mais avançado do desenvolvimento. O cório dos ovócitos também apresenta reação positiva (Figuras 27A-C). Células epiteliais do ovário apresentam grande quantidade de secreção apócrina com marcações positivas à reação de azul de bromofenol, indicando o caráter protéico da secreção (Figuras 27D, 27E). Ovócitos nos últimos estágios de desenvolvimento (ovócito IV e V) apresentam-se com granulações fortemente positivas (Figura 27C). A *tunica propria* apresenta-se fracamente marcada tanto para a reação de azul de bromofenol como para a reação simultânea de PAS e azul de bromofenol (Figura 27D, 27G). Com a reação simultânea de PAS e azul de bromofenol tanto o citoplasma como a secreção, no ápice das células apresentam-se com reação positiva a polissacarídeos e a proteínas (Figuras 27G, 27H). A secreção contida no lúmen também apresentou reação positiva a técnica. Células epiteliais apresentam-se com marcação fortemente positiva em seus ápices para azul de toluidina. Ovócitos iniciais também são fortemente marcados. A secreção presente no ápice de células epiteliais, em algumas regiões desse epitélio não se apresenta com reação positiva (Figuras 28A-C). Assim como detectado com a técnica de azul de bromofenol, a secreção apical de células epiteliais e a granulação presente nos ovócitos IV mostram-se com reação fortemente positiva ao xylidine ponceau. Ovócitos em estágio inicial apresentam reação positiva à técnica (Figuras 28D-F).

Na lâmina basal do epitélio e algumas regiões citoplasmáticas mostram-se positivas ao picrossirius. O cório do ovócito também apresenta reação positiva. Em ovócitos jovens pode-se observar, além do núcleo ou vesícula germinativa um outro núcleo acessório, sendo corado pela hematoxilina, usada como contra corante (Figuras 28G, 28H).

6.3.3. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* cuidando da prole

6.3.3.1. Análise do Ventrículo

Sob a técnica do PAS para glicoconjugados neutros nota-se forte marcação positiva na lâmina abaixo do epitélio, como também na lâmina basal que circunda o corpo gorduroso. As marcações positivas também são evidentes em regiões do citoplasma de células epiteliais, porém essas marcações são moderadas (Figuras 29A, 29B, 29C).

A contra coloração realizada com verde de metila, para DNA e RNA, mostra-se com forte marcação em grupos de células generativas (Figuras 29A-C).

A coloração de azul de bromofenol mostra-se com reação levemente positiva apenas na lâmina basal. Os núcleos das células generativas e das células do corpo gorduroso reagem fortemente à técnica (Figuras 29D, 29E). A reação, simultânea com PAS e azul de bromofenol evidencia uma marcação positiva na lâmina basal e em alguns poucos grânulos presentes nas células epiteliais. Granulações discretas nas células do corpo gorduroso em meio a gotas lipídicas também apresentam fraca reação positiva (Figuras 29F-H).

A técnica de azul de toluidina ácida revela-se com reação fracamente positiva no citoplasma das células epiteliais. Células generativas apresentam-se com reação positivamente moderada à técnica (Figuras 30A-C). Com a técnica do xylidine ponceau nota-se reação positiva mais forte em poucos grânulos citoplasmáticos. Reação positiva moderada observa-se em pequenas granulações nas células do corpo gorduroso, em meio a gotas lipídicas (Figuras 30D-F). Células epiteliais apresentam-se com marcações positivas em granulações citoplasmáticas, com a técnica do picrossirus red. A lâmina basal mostra-se marcada fortemente (Figuras 30G, 30H).

6.3.3.2. Análise do Ovário

O epitélio ovariano apresenta regiões citoplasmáticas fortemente marcadas pela reação de PAS. Tais marcações positivas à reação ocorrem na lâmina basal abaixo do epitélio circundando inclusive o pedicelo. A secreção presente no lúmen ovariano é intensamente marcada positivamente. Reação fracamente positiva é observada em ovócitos em estágio de reabsorção (Figuras 31A-C).

Todo o epitélio ovariano apresentou reação positiva à técnica do azul de bromofenol em regiões citoplasmáticas. Reação positiva pouco mais intensa ocorre em ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento e em granulações dos ovócitos em estágio mais avançado (Figuras 31D, 31E).

Com a técnica simultânea de coloração com PAS e azul de bromofenol, o epitélio mostra células com forte reação positiva ao PAS, assim como ocorre na secreção presente no lúmen. Granulações no citoplasma dos ovócitos também apresentam reação positiva tanto ao PAS como ao azul de bromofenol (Figuras 31F-H).

A técnica de azul de toluidina mostra-se com reação positiva principalmente em ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, enquanto ovócitos em reabsorção não apresentam marcação positiva. Os núcleos das células epiteliais também foram fortemente marcados (Figuras 32A-C).

Células do epitélio ovariano têm marcações moderadamente positivas à técnica de xylidine ponceau. A secreção, os ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento e aqueles em processo de reabsorção não apresentam reação positiva. A técnica para proteínas totais mostra-se mais forte para a reação apenas em ovócitos em estágios avançados de desenvolvimento e em nucléolos de ovócitos em estágios iniciais do mesmo (Figuras 32D-F). Reação positiva à técnica de picrossirus red é observada na lâmina basal do epitélio assim como no pedicelo e em nucléolos de células de ambos (Figuras 32G, 32H).

Os dados dos testes histoquímicos do ventrículo e ovário das fêmeas aqui estudadas estão também apresentados nas tabelas **1** e **2**.

6.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

6.4.1. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* sem ovos maduros

6.4.1.1. Análise do Ventrículo

As células do corpo gorduroso, que circundam todo o epitélio ventricular, possuem lipídeo como reserva, estocado em vesículas eletrôn-densa e eletrôn-lúcida (Figura 33A, 33B); seu núcleo esférico e grande, com nucléolo e muita heterocromatina (Figura 33B) e o citoplasma com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figura 33C). Na base destas células as invaginações da membrana plasmática basal são acentuadas (Figuras 33E, 33F, 34C). A lâmina basal destas células apresenta-se delgada (Figuras 33B, 33D). Na região de transição entre o epitélio ventricular e o corpo gorduroso observa-se tecido muscular e espessa lâmina basal que se mostra com dobras por toda a base desse epitélio (Figuras 33E, 33F). Nas células de tecido muscular observam-se muitas mitocôndrias (Figura 34A) e núcleo alongado (Figura 34B).

Na base do epitélio do ventrículo encontram-se as células generativas, e células excretoras com grandes núcleos circundados por esferocristais, ambas com grandes núcleos (Figuras 34D, 34E). No epitélio há também células secretoras com grandes vesículas eletrôn-densas (Figura 34F), mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Figura 35A). O epitélio ventricular é composto por diferentes células com citoplasma bastante diferenciado. Algumas células apresentam citoplasma repleto de vacúolos e grânulos centralmente eletrôn-densos, células estas com características de células digestivas ao lado de células secretoras que têm citoplasma mais homogêneo com grandes vesículas eletrôn-densas (Figuras 35C, 35D). As células do epitélio possuem ápice acentuadamente abaulado, microvilosidades que recobrem toda sua superfície (Figuras 35B, 35E, 35F). No citoplasma apical da região periférica de algumas células existe um sistema de túbulos (Figura 35B).

6.4.1.2. Análise do Ovário

Na parede externa do ovário pôde-se observar ovócitos esféricos aderidos a este pelo pedicelo (Figuras 36A, 36B), o qual contém células com citoplasma pouco elétron-denso e grandes núcleos (Figura 36C). Na região de contato entre ovócito e pedicelo podem ser observadas microvilosidades (Figura 36D). Em torno dos ovócitos existe material membranoso (Figura 36E). Os ovócitos apresentam-se com acúmulo de grânulos protéicos (Figuras 36E, 36F). Na porção mais central destes ovócitos está presente a vesícula germinativa com predomínio de cromatina descondensada (Figura 36F). O pedicelo é circundado por lâmina basal, assim como todo epitélio do ovário (Figura 36C). As células do pedicelo possuem núcleo eletron-lúcido com pouca cromatina condensada, citoplasma pouco eletron-denso e muitas interdigitações (Figuras 36G, 36H). Abaixo do pedicelo e circundando o epitélio encontram-se feixes descontínuos de musculatura (Figura 36H).

Quando comparado a núcleos do pedicelo, as células epiteliais têm seus núcleos com maior quantidade de cromatina condensada (Figura 37A); bem como seu citoplasma, o qual mostra-se com muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, acúmulo de glicogênio e interdigitações da membrana lateral (Figuras 37A, 37B). Algumas mitocôndrias possuem aspecto diferenciado, com cristas tubulares (Figura 37C). No citoplasma destas células, pode-se também observar figuras mielínicas (Figura 37E). No ápice das células estão presentes as microvilosidades (Figura 37F), assim como vesículas de secreção eletron-densas sendo liberadas para o lúmen (Figura 37G).

6.4.2. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* com ovos maduros

6.4.2.1. Análise do Ventrículo

O corpo gorduroso é composto de células ricas em material lipídico (Figura 38A). Essas células contêm um grande núcleo esférico com nucléolo desenvolvido e grumos de cromatina condensada (Figura 38B), invaginações da membrana plasmática basal são acentuadas (Figura 38C). Observa-se diferenças de eletrondensidades em citoplasmas de diferentes células (Figura 38D). Também é observada a delgada lâmina basal que circunda todo o tecido (Figura 38C). Na região de transição entre o epitélio ventricular e o corpo gorduroso observam-se características semelhantes às já descritas para fêmeas sem ovos maduros, como a espessa lâmina basal formando dobras abaixo do epitélio e a musculatura abaixo desta (Figuras 38E, 38F, 39A).

Na porção basal do epitélio encontram-se as células generativas com grandes núcleos (Figuras. 39C). No citoplasma basal das células epiteliais observa-se muitas invaginações da membrana plasmática (Figuras 39B, 39F). As células do epitélio também apresentam citoplasmas com diferentes eletrondensidades (Figuras 39C, 39F). Algumas destas células como as excretoras possuem acúmulo de lipídeo (Figuras. 39B, 39F), muitos esferocristais (Figuras 39C- E), e grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figura 40A); enquanto células digestivas apresentam grânulos centralmente eletrondensos e vacúolos citoplasmáticos apicais (Figuras 40A-C). No ápice dessas células observam-se muitas microvilosidades uniformes e esferocristais (Figuras 40C, 40D). Observam-se, também, esferocristais no lúmen (Figura 40E).

6.4.2.2. Análise do Ovário

Assim como no ovário de fêmeas sem ovos maduros, os ovócitos nesta fase são esféricos, estão aderidos à parede externa do ovário, apresentam-se com grânulos em seu interior e o cório desenvolvido (Figuras 41A, 41B, 41D). As células do pedicelo mostram-se com núcleo grande, citoplasma com eletrondensidades variadas (Figura 41C) e com acúmulo de grânulos (Figura 41D, 41E). Abaixo do epitélio está localizada a musculatura (Figura 41F). Nas células epiteliais observam-se núcleos grandes com nucléolo bem desenvolvido (Figuras 42A, 42B), muitas interdigitações (Figuras 42B, 42C), elementos do complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso (Figuras 42D, 42E). No seu ápice observam-se microvilosidades uniformes, assim como vesículas de secreção eletrondensa, rodeadas de microvilosidades sendo liberada para o lúmen (Figuras 42F, 42G). No lúmen pode-se observar um ovócito com morfologia diferente (ovalados) daqueles ovócitos aderidos à parede externa do ovário. Esses ovócitos contêm uma grande vesícula germinativa e acúmulo de grânulos (Figura 42H).

6.4.3. Fêmeas de *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* cuidando da prole

6.4.3.1. Análise do Ventrículo

Nesta fase nota-se que o corpo gorduroso apresentam-se com menor estoque de lipídeo do que nas fases anteriores. As células, grandes núcleos, vesículas eletrondensas e citoplasma mais vacuolizado (Figuras 43A, 43B). A lâmina basal e a musculatura entre o corpo gorduroso e o epitélio ventricular não diferem das fases anteriormente descritas (Figuras 43C, 43D, 43F).

Na base do epitélio observam-se células generativas com núcleos grandes, cromatina condensada e grandes nucléolos (Figuras 43C, 43E).

No citoplasma basal das células epiteliais observa-se grande quantidade de invaginações na membrana plasmática (Figura 43F). Tais células contêm grandes

núcleos, com cromatina condensada e nucléolo desenvolvido (Figura 44A). No citoplasma nota-se grandes vesículas, abundante retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vacúolos contendo grânulos eletrondensos, esferocristais e figuras mielínicas (Figuras 43B-F). O Complexo de Golgi, visto no citoplasma apical é reduzido (Figura 44F). Na porção apical da célula também é observado sistema de túbulos já conectado (Figuras 44F-H) e muitas microvilosidades voltadas para o lúmen, inclusive em regiões de maior proximidade entre células (Figura 44G).

6.4.3.2. Análise do Ovário

Assim como no ovário de fêmeas, sem ovos maduros, o citoplasma de células do pedicelo apresenta citoplasma com menor eletrondensidade e com poucas organelas e (Figura 45A). As células epiteliais têm seus núcleos com cromatina condensada (Figura 45B) quando comparada às células do pedicelo, dos demais estágios estudados. O citoplasma também é bastante eletrondenso apresentando inúmeros grânulos de eletrondensidades diferenciadas (Figura 45B). Também pode-se observar no citoplasma de células epiteliais áreas vacuolizadas, com aspecto de degeneração (Figuras 45B, 45C). No ápice das células epiteliais pode-se observar as microvilosidades (Figura 45D).

6.5. Citoquímica - localização de glicogênio (Afzelius)

6.5.1. Fêmeas de *Acutisoma (=Goniosoma) longipes* sem ovos maduros

6.5.1.1. Análise do Ventrículo

A morfologia do ventrículo apresenta-se semelhante à já descrita na análise ultra-estrutural, no entanto, nem o corpo gorduroso que acompanha o ventrículo rodeando seu epitélio nem o próprio epitélio apresentam reações positivas ao glicogênio (Figuras 46A-F).

6.5.1.2. Análise do Ovário

Nas células do epitélio do ovário, assim como nas células do pedicelo e do ovócito não mostram locais positivos para glicogênio (Figuras 47A-D).

6.5.2. Fêmeas de *Acutisoma (=Goniosoma) longipes* com ovos maduros

6.5.2.1. Análise do Ventrículo

Principalmente ao redor de vesículas lipídicas das células do corpo gorduroso, observa-se reações fortemente positivas para o glicogênio (Figuras 48A-D). Por todo o citoplasma das células do corpo gorduroso e também próxima ao retículo endoplasmático rugoso observam-se partículas de glicogênio (Figuras 48E, 48F).

No epitélio ventricular não há ocorrência de marcação positiva para reação de glicogênio (Figuras 48G, 48H).

6.5.2.2. Análise do Ovário

Tanto células do pedicelo como do epitélio do ovário não apresentam marcação positiva para o glicogênio (Figuras 49A-D).

6.5.3. Fêmeas de *Acutisoma (=Goniosoma) longipes* cuidando da prole

6.5.3.1. Análise do Ventrículo

Células do corpo gorduroso e do epitélio ventricular não apresentam reação positiva para glicogênio (Figuras 50A-F).

6.5.3.2. Análise do Ovário

As células do epitélio do ovário e do pedicelo foram negativas para o glicogênio (Figuras 51A-D).

Tabela 1: Resultados da histoquímica do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma* (= *G0niosoma*) *longipes* sem ovos, com ovos maduros e cuidando da prole.

		VENTRÍCULO		
		FÊMEA SEM OVOS MADUROS	FÊMEA COM OVOS MADUROS	FÊMEA CUIDANDO DA PROLE
Células do Epitélio	Citoplasma	pas ++ ab - pb ++ at +++ xp - pr -	pas - ab - pb - at +++ xp - pr -	pas - ab - pb - at - xp - pr +++
	Vesículas	ab - at +++	(ausente)	(ausente)
	Grânulos	pas - ab ++ pb ++ at ++ xp +++ pr -	pas +++ ab +++ pb +++ at +++ xp +++ pr +++	pas - ab - pb ++ at - xp +++ pr +++
	Núcleo	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab +++ pb ++ at ++ xp - pr -
	Nucléolo	pas - ab - pb - at - xp - pr +++	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab - pb - at +++ xp - pr -
Células Generativas		pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab + pb ++ at +++ xp - pr -
Lâmina Basal		pas ++ ab - pb +++ at ++ xp ++ pr +++	pas +++ ab ++ pb +++ at + xp +++ pr +++	pas +++ ab ++ pb +++ at + xp ++ pr +++
Células do Corpo Gorduroso	Grânulos	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas +++ ab ++ pb +++ at - xp +++ pr -	pas + ab - pb + at - xp +++ pr -
	Núcleo	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - ab - pb ++ at ++ xp - pr -	pas - ab +++ pb ++ at ++ xp ++ pr -
	Nucléolo	pas - ab - pb - at ++ xp - pr ++	pas - ab ++ pb ++ at +++ xp - pr +++	pas - ab - pb - at +++ xp - pr -
Lâmina Basal		pas ++ ab - pb + at - xp - pr +++	pas - ab - pb + at - xp - pr +++	pas ++ ab ++ pb ++ at - xp - pr +++

pas= PAS; ab= azul de bromofenol; pb= PAS e azul de bromofenol; at= azul de toluidina; xp= xylidine ponceau; pr= picrosirius red.

Tabela 2: Resultados da histoquímica do ovário de *Acutisoma* (=Goniosoma) *longipes* sem ovos, com ovos maduros e cuidando da prole.

		OVÁRIO		
		FÊMEA SEM OVOS MADUROS	FÊMEA COM OVOS MADUROS	FÊMEA CUIDANDO DA PROLE
Secreção no Lúmen		pas - ab +++ pb +++ at +++ xp +++ pr -	pas - ab +++ pb +++ at ++ xp +++ pr -	pas +++ ab - pb +++ at +++ xp +++ pr -
Células do Epitélio	Citoplasma	pas - ab ++ pb ++ at +++ xp ++ pr -	pas +++ ab + pb +++ at + xp ++ pr ++	pas +++ ab +++ pb +++ at +++ xp +++ pr ++
	Grânulos	pb +++ xp - pr -	ab - at - xp - pr ++	pb +++ at +++ pr -
	Núcleo	pas - ab +++ pb +++ at +++ xp ++ pr -	pas - ab + pb - at ++ xp + pr -	pas - ab - pb - at +++ pr -
	Nucléolo	pas - ab +++ pb ++ xp - pr -	pas - ab - pb - at +++ xp +++ pr -	pas - ab - pb - pr +++
Lâmina Basal		pas + ab - pb +++ at + xp - pr +++	pas +++ ab - at + xp - pr +++	pas +++ ab - pb ++ at - xp - pr +++
Células do Pedicelo	Grânulos	pas ++ ab - pb +++ at - xp - pr -	pas - ab - pb - at - pr -	pb - at - xp - pr -
	Núcleo	pas - ab ++ pb + at +++ xp ++ pr -	pas - ab + pb - at +++ xp ++ pr -	pas - pb ++ at +++ xp + pr -
	Nucléolo	pas - ab +++ xp - pr -	pas - ab - pb - at - xp - pr -	pas - pb - at - xp - pr ++
Túnica Própria		pas - ab - pb - at + xp - pr +++	ab + pb + at +	ab + at +
Ovócito	Cório	pas +++ ab + pb ++ at + xp - pr -	pas +++ ab + at - xp + pr ++	pas - ab + pb ++ at + xp ++ pr +++
	Grânulos de Vitelo	pas +++ ab +++ pb +++ at +++ xp +++ pr ++	pas +++ ab +++ at +++ xp +++ pr +++	pas ++ ab ++ pb +++ at +++ xp +++ pr -
	Vesícula Germinativa	ab + pb +++ at + xp ++ pr -	pas - ab - at + pr +	ab + pb + at ++ xp +
	Nucléolo	pas +++ pb +++ xp +++ pr -	pas - ab - pb - pr +++	ab +++ pb +++ at - xp +++

pas= PAS; ab= azul de bromofenol; pas/ab= PAS e azul de bromofenol; at= azul de toluidina; xp= xylidine ponceau; pr= picrosirius red.

FIGURAS

Figura 1- Micrografias eletrônicas de varredura do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Visão geral do ventrículo (**v**). Barra= 200 μ m. **B)** Superfície externa do ventrículo com corpo gorduroso (**cg**). Barra= 50 μ m. **C)** Corte transversal do ventrículo evidenciando epitélio (**ep**) e lúmen (**lu**). Barra= 25 μ m. **D)** Detalhe do epitélio (**ep**) do ventrículo e do corpo gorduroso (**cg**). Barra= 50 μ m.

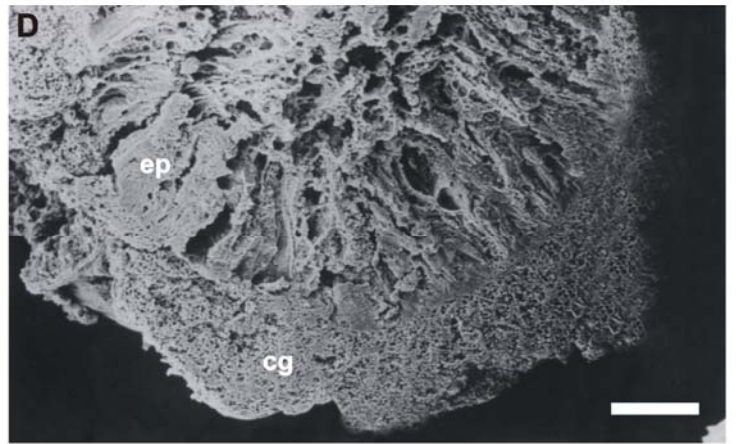
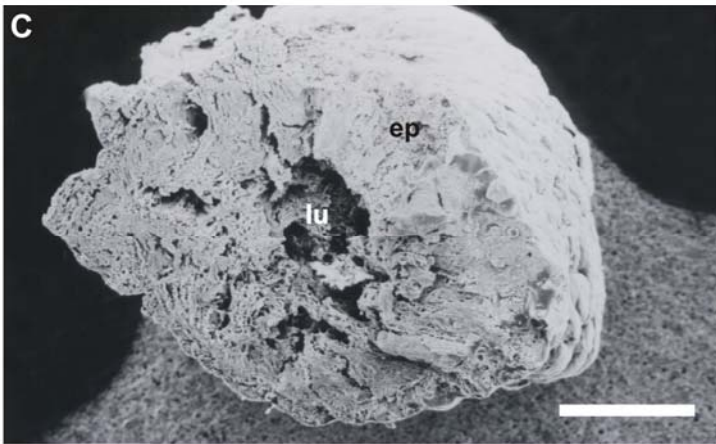
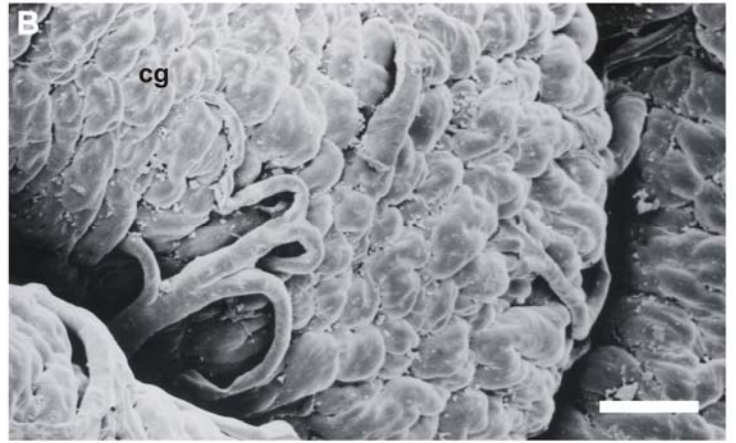


Figura 2- Micrografias eletrônicas de varredura do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Detalhe do corpo gorduroso (**cg**) rico em vacúolos (**va**). Barra= 10 μ m. **B)** Epitélio (**ep**) ventricular envolto por musculatura (**mu**), onde também observa-se vesículas (**ve**). Barra= 50 μ m. **C)** Epitélio (**ep**) com vesículas (**ve**). Barra= 20 μ m. **D)** Detalhe do ápice de células do epitélio (**ep**) com vesículas (**ve**) no lúmen (**lu**) do órgão. Barra= 10 μ m.

cg= corpo gorduroso.

mu= musculatura.

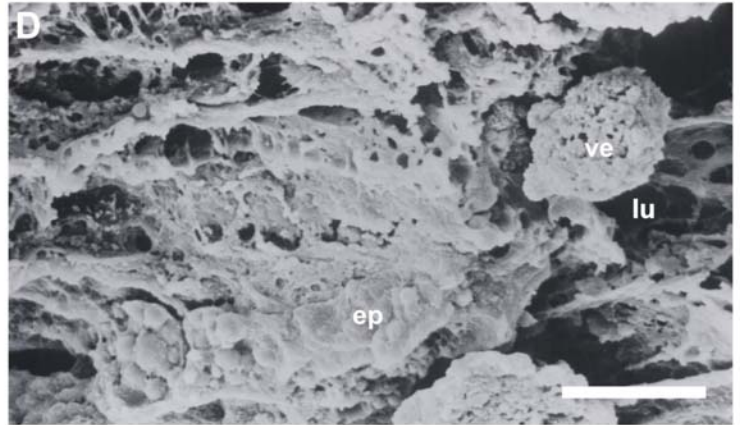
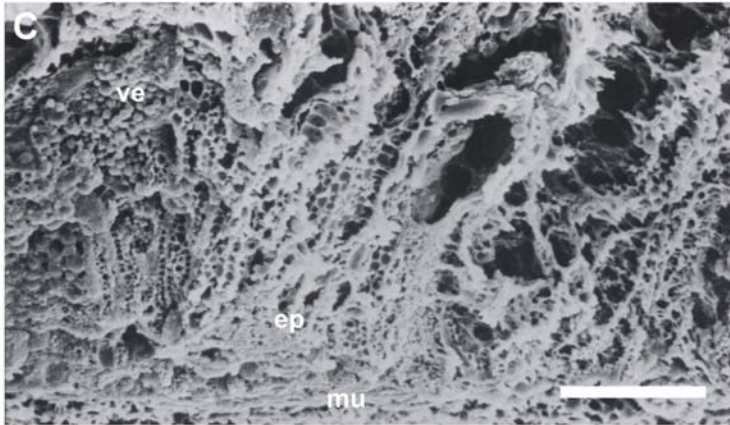
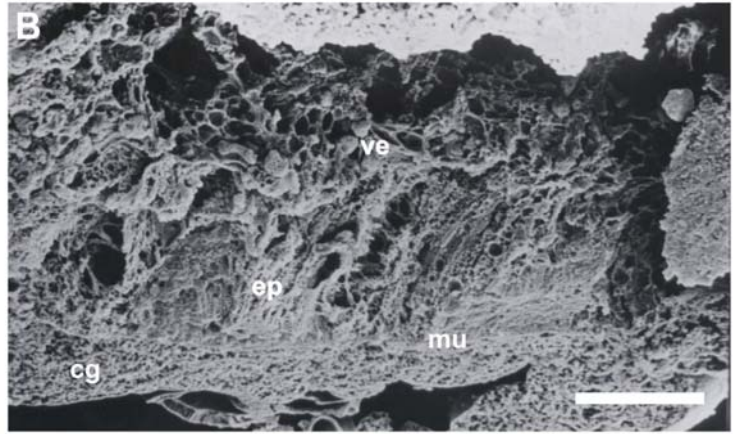
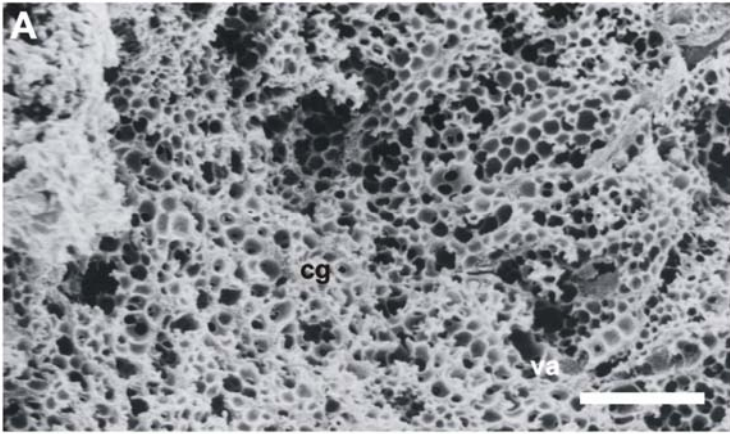


Figura 3- Micrografias eletrônicas de varredura do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Visão geral do ovário (**ov**) com ovócitos (**ovo**) na sua porção externa. Barra= 400µm. **B)** Corte transversal do ovário (**ov**) evidenciando o epitélio (**ep**) e seu lúmen (**lu**). Barra= 50µm. **C)** Detalhe do citoplasma de células do epitélio (**ep**) e vesículas (**ve**) projetadas para o lúmen (**lu**). Barra= 10µm. **D)** Detalhe do lúmen (**lu**) para onde projetam-se as vesículas (**ve**) do ápice das células do epitélio (**ep**). Barra= 100µm.

ovo= ovócito.

d= duto lateral.

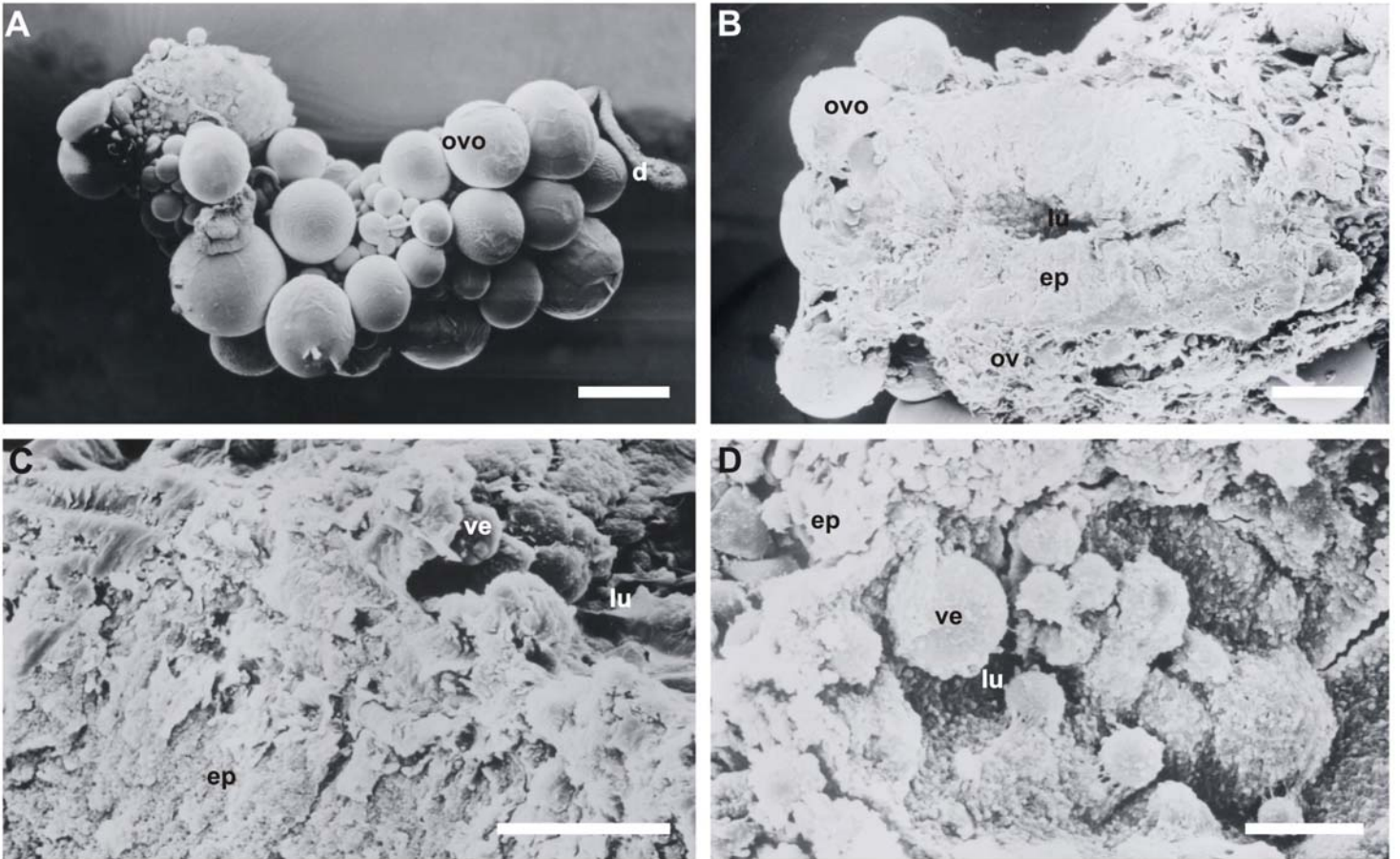


Figura 4- Micrografias eletrônicas de varredura do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Ovócitos (**ovo**) do lado externo do ovário. Barra= 30µm. **B)** Diferentes estágios de desenvolvimento de ovócitos (**ovo**) conectados ao ovário pelo pedicelo (**pe**). Barra= 50µm. **C)** Útero (**u**) com ovócitos (**ovo**) próximo a este. Barra= 100µm.



Figura 5- Micrografias eletrônicas de varredura do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Visão geral do ventrículo (**v**). Barra= 400 μ m. **B)** Corte transversal do ventrículo evidenciando epitélio (**ep**) e lúmen (**lu**). Barra= 100 μ m. **C)** Detalhe do epitélio (**ep**) circundado por musculatura (**mu**) e corpo gorduroso (**cg**) externo ao epitélio. Barra= 40 μ m.

lu= lúmen.

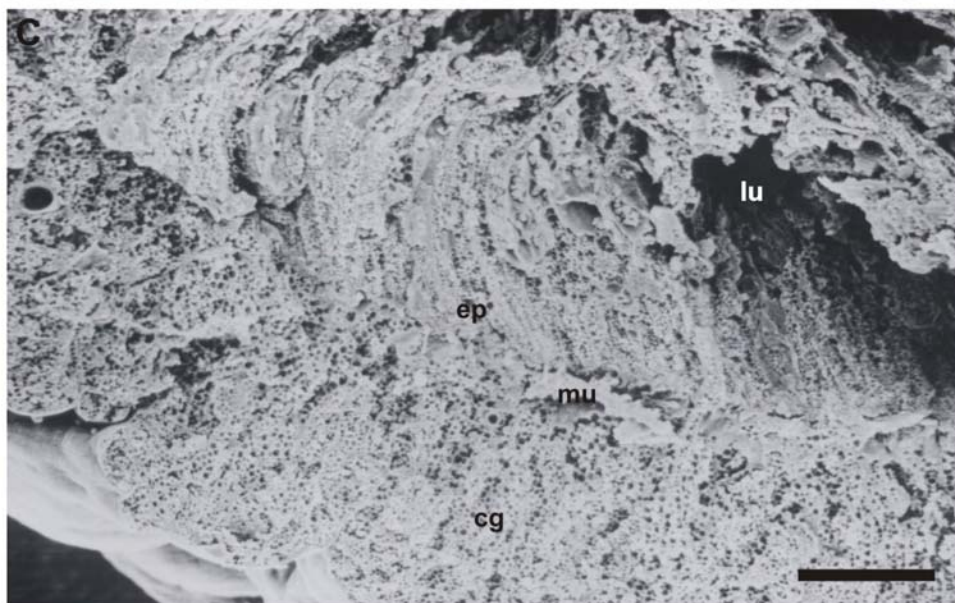
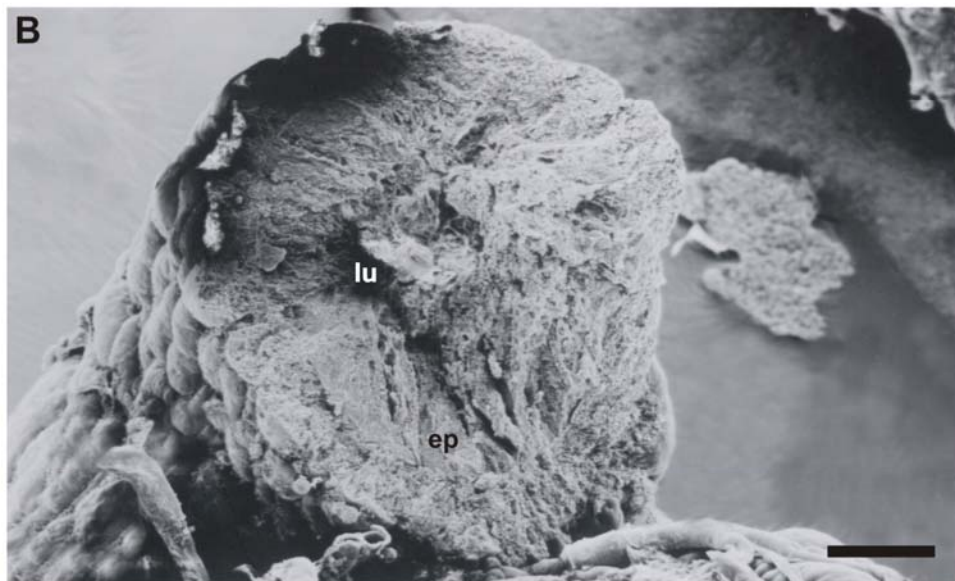


Figura 6- Micrografias eletrônicas de varredura do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Detalhe da região de transição entre o corpo gorduroso (**cg**) e o epitélio (**ep**) que contém vacúolos (**va**). Nessa região observa-se a musculatura (**mu**). Barra= 4 μ m. **B)** Epitélio (**ep**) com grânulos (**gr**). Barra= 10 μ m. **C)** Ápice de células do epitélio (**ep**) com muitas vesículas (**ve**) próximas ao lúmen (**lu**) do órgão. Barra= 20 μ m.

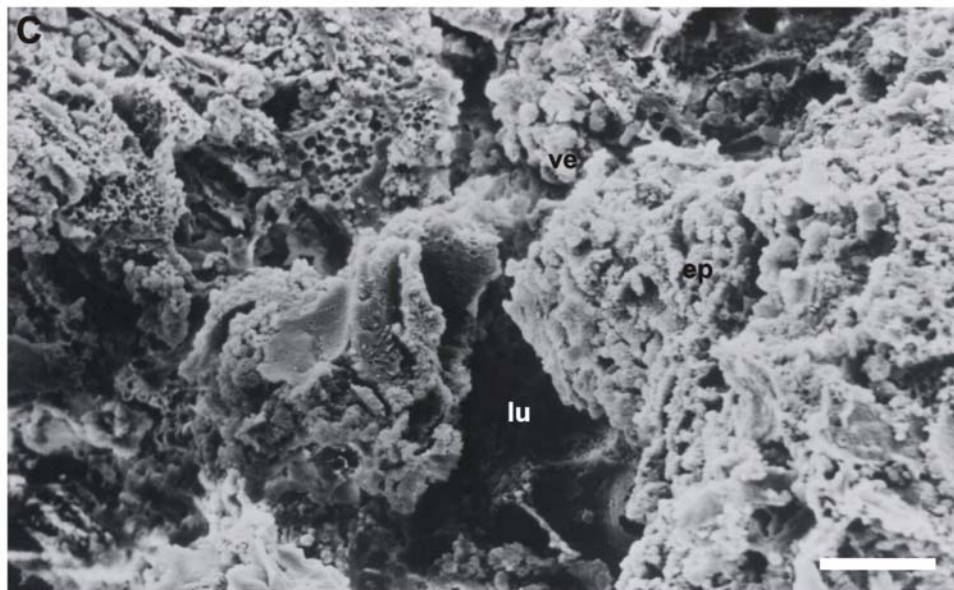
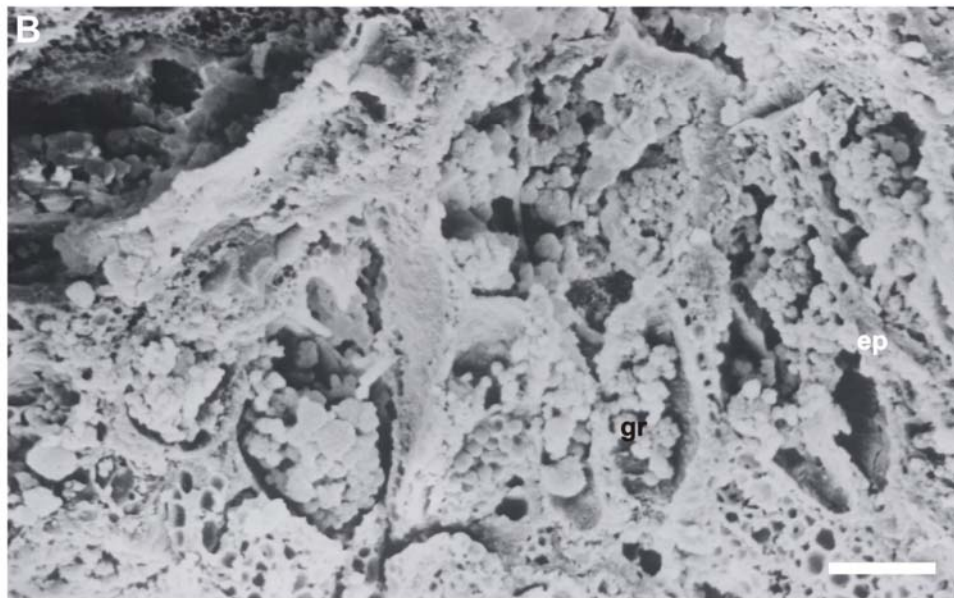
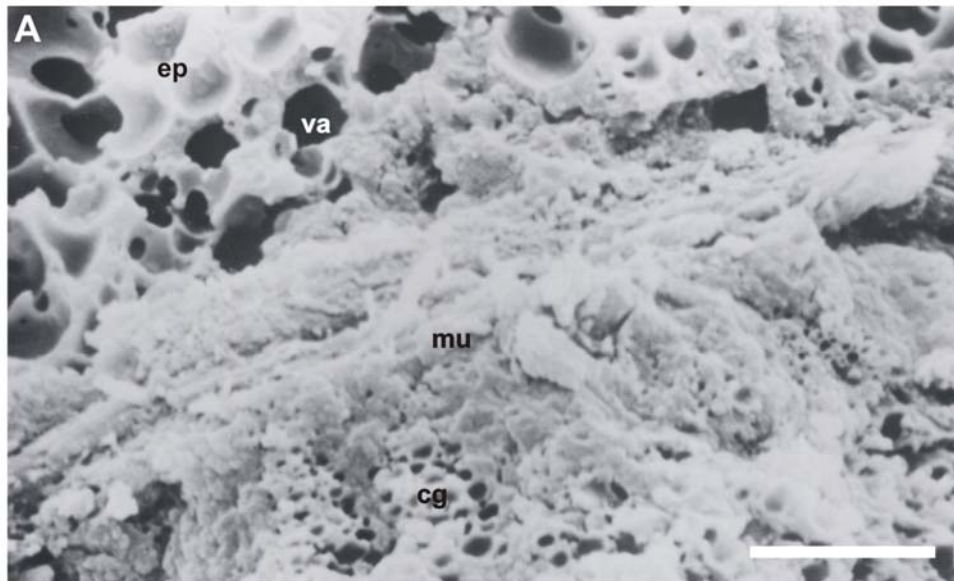


Figura 7- Micrografias eletrônicas de varredura do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A e B)** Visão geral do ovário (**ov**) com ovócitos (**ovo**) na sua porção externa. Ovócitos em estágio de reabsorção (**ovor**) podem ser observados. Barras= 50µm e 20µm, respectivamente. **C)** Corte transversal de ovócito (**ovo**) mostrando o acúmulo de grânulos (**gr**) no seu citoplasma. Barra= 200µm. **D)** Detalhe do citoplasma de ovócitos (**ovo**) circundado pelo cório (**co**) e repleto de grânulos (**gr**). Barra= 10µm.

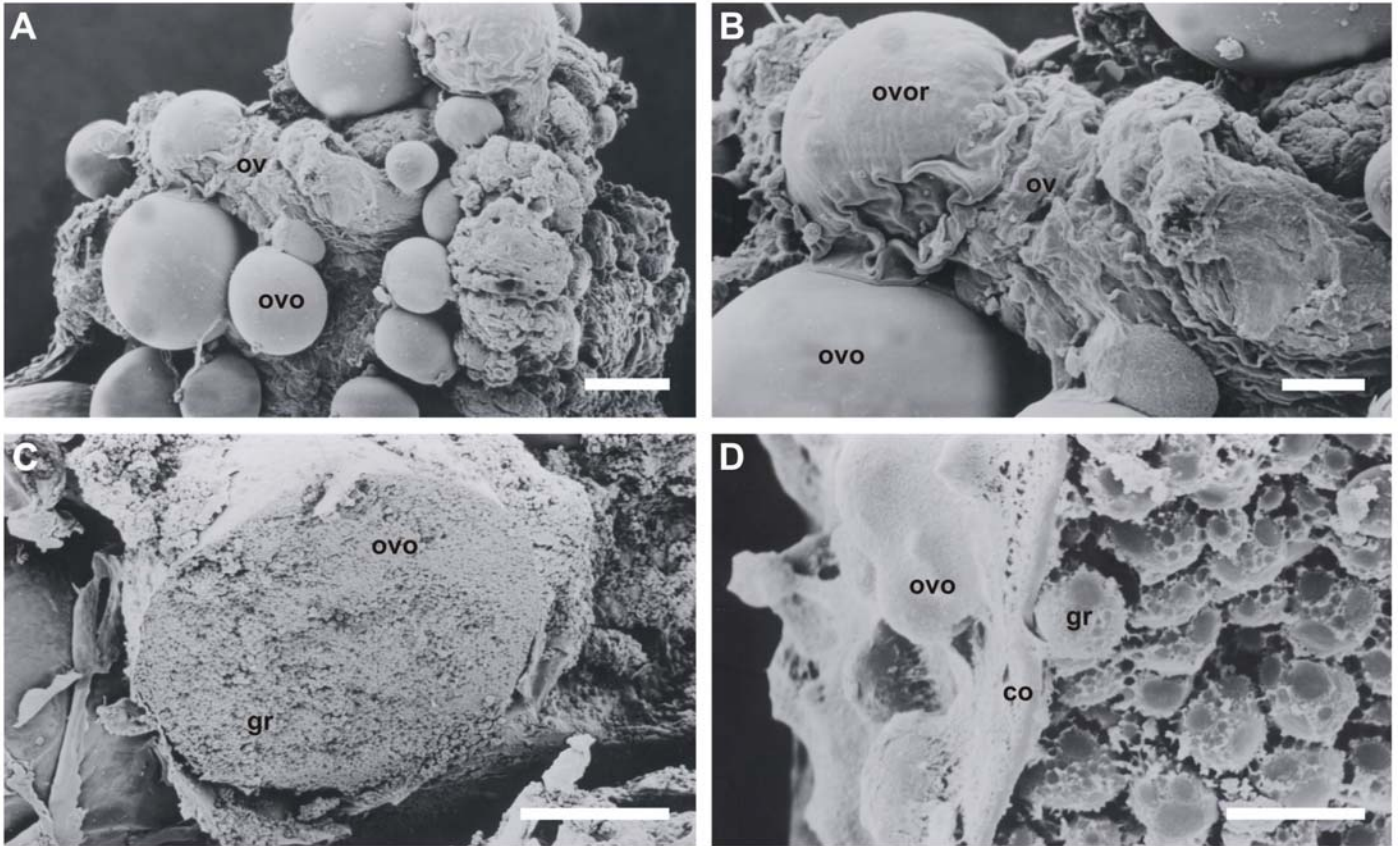


Figura 8- Micrografias eletrônicas de varredura do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole. **A)** Visão geral do ventrículo (**v**). Barra= 400 μ m. **B)** Corte transversal do ventrículo evidenciando epitélio (**ep**) circundado por musculatura (**mu**) e corpo gorduroso (**cg**). Barra= 100 μ m. **C)** Detalhe do epitélio (**ep**) e corpo gorduroso (**cg**) externo ao epitélio. Barra= 25 μ m. **D)** Detalhe do ápice das células do epitélio (**ep**) contendo vacúolos (**va**) e grânulos (**gr**). Barra= 2 μ m. **E)** Montagem geral de células do epitélio (**ep**) com vesículas (**ve**) muitos vacúolos (**va**) na porção apical das células. Barra= 10 μ m.

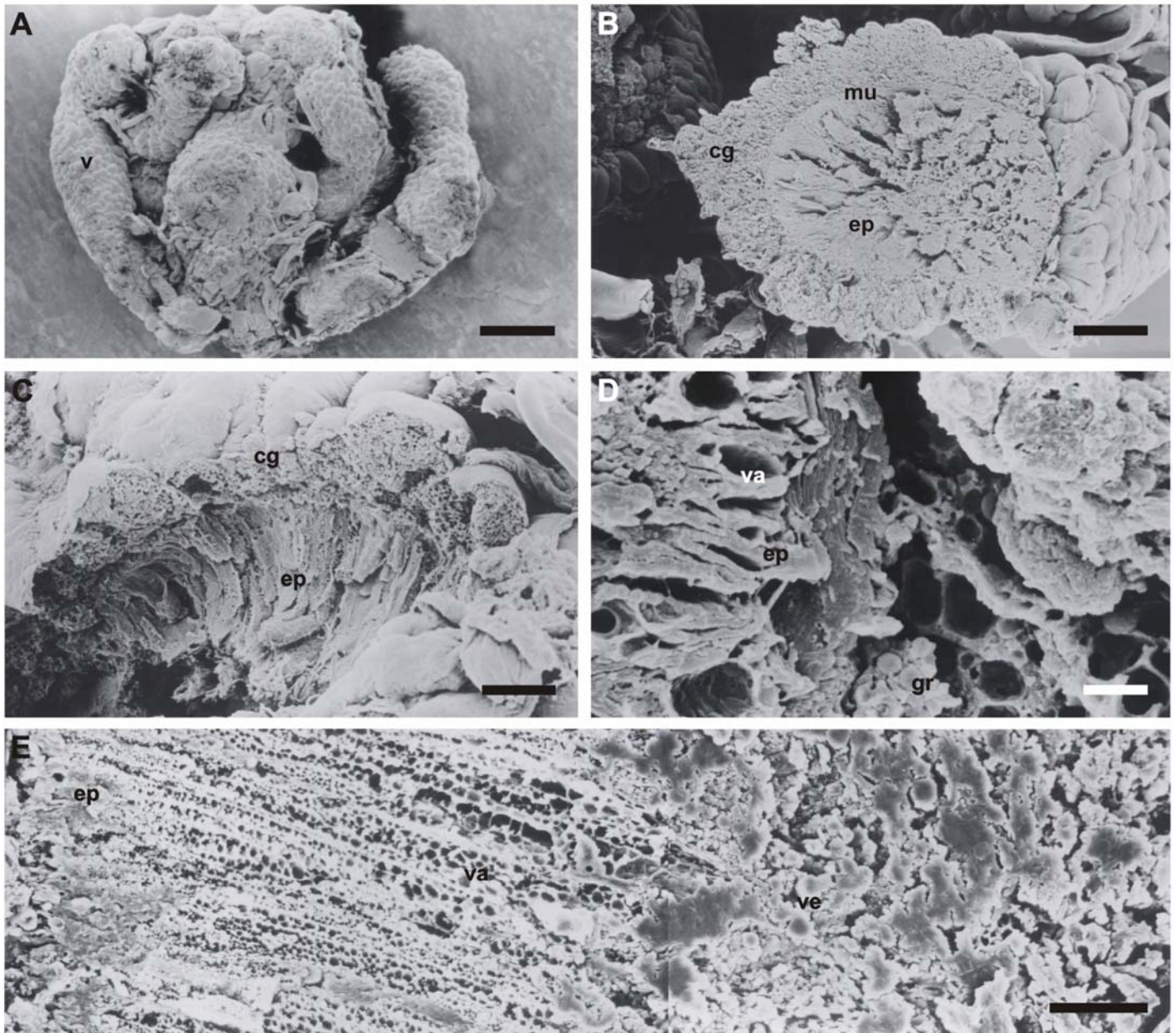


Figura 9- Micrografias eletrônicas de varredura do ovário de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole. **A e B)** Visão geral do ovário (**ov**) com ovócitos (**ovo**) na sua porção externa. Barras= 250µm. **C)** Corte transversal do ovário (**ov**) evidenciando o epitélio (**ep**) e seu lúmen (**lu**). Barra= 50µm. **D)** Região lateral do ovário onde se observa um duto lateral (**d**). Barra= 250µm.

d= duto lateral.

ovo= ovócito.

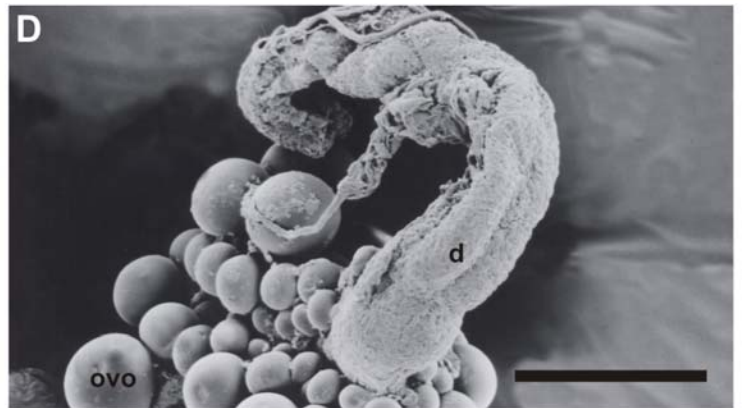
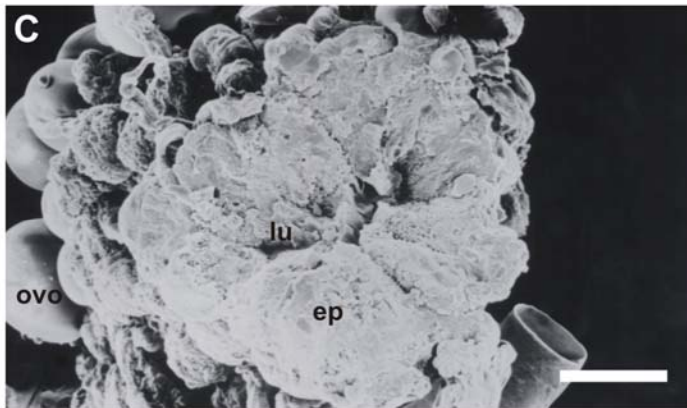
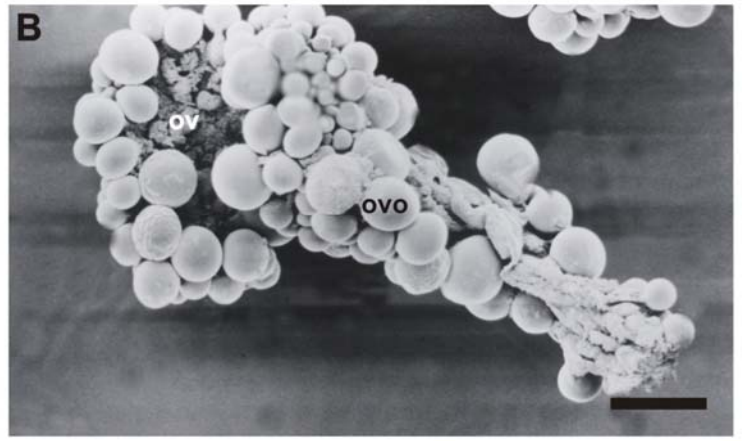
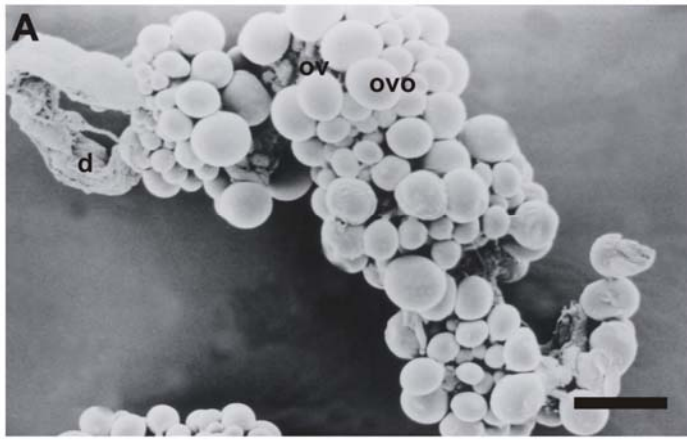


Figura 10- Micrografias eletrônicas de varredura do ovário de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole. **A e B)** Detalhes do pedicelo (**pe**) que conecta o ovócito (**ovo**) ao epitélio (**ep**) do ovário. Barras= 10µm e 5µm, respectivamente. **C)** Detalhe de ovócito (**ovo**) conectado ao pedicelo (**pe**) e apresentando cicatriz (**seta**). Barra= 25µm. **D)** Detalhe de ovócito em reabsorção (**ovor**). Barra= 25µm.

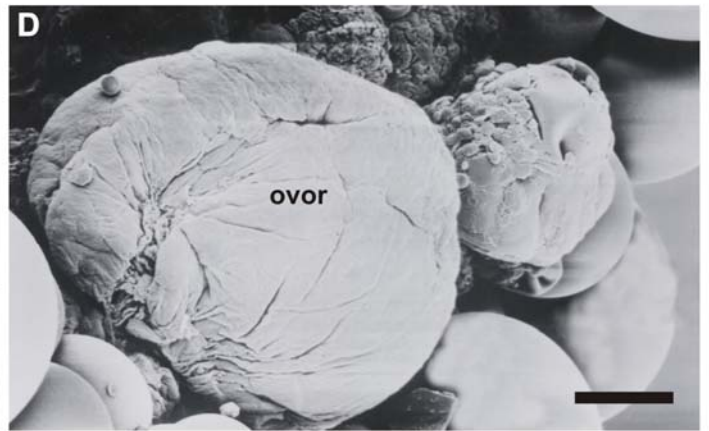
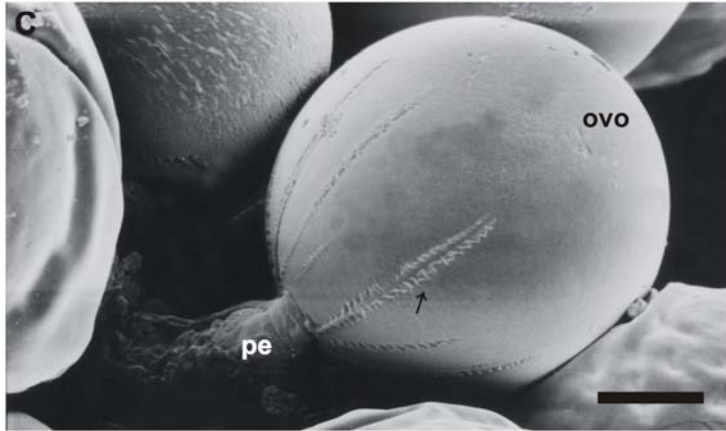
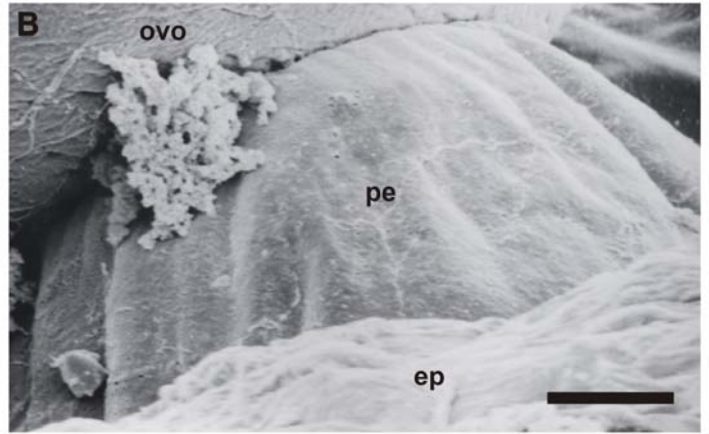
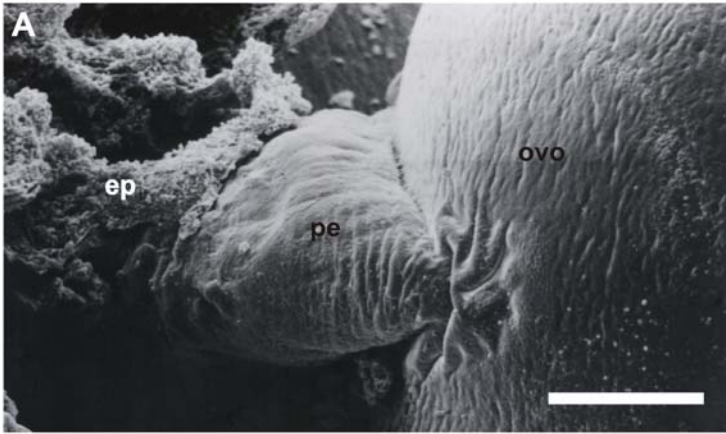


Figura 11- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A e B)** Visão geral do ventrículo cortado transversalmente, onde se observa os diferentes tecidos: epitélio (**ep**) e corpo gorduroso (**cg**) que circunda o ventrículo. Nas vilosidades que se estendem ao lúmen (**lu**) observam-se vesículas (**ve**). Granulações citoplasmáticas não identificadas e não coradas estão acumuladas no citoplasma. **C)** Detalhe do epitélio alto, com células generativas (**cge**) agrupadas e localizadas na porção basal desse, e apoiadas na lâmina basal (**lb**). Dois tipos de grânulos citoplasmáticos são observados: os densos (**gr**) e os que não se coram (*). **D)** Células digestivas (**cd**) alongadas contendo no citoplasma grânulos (**gr**) com diferentes densidades e granulações sem coloração (*). No ápice dessas células observam-se vesículas (**ve**). Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cge= células generativas.

cg= corpo gorduroso.

n= núcleo.

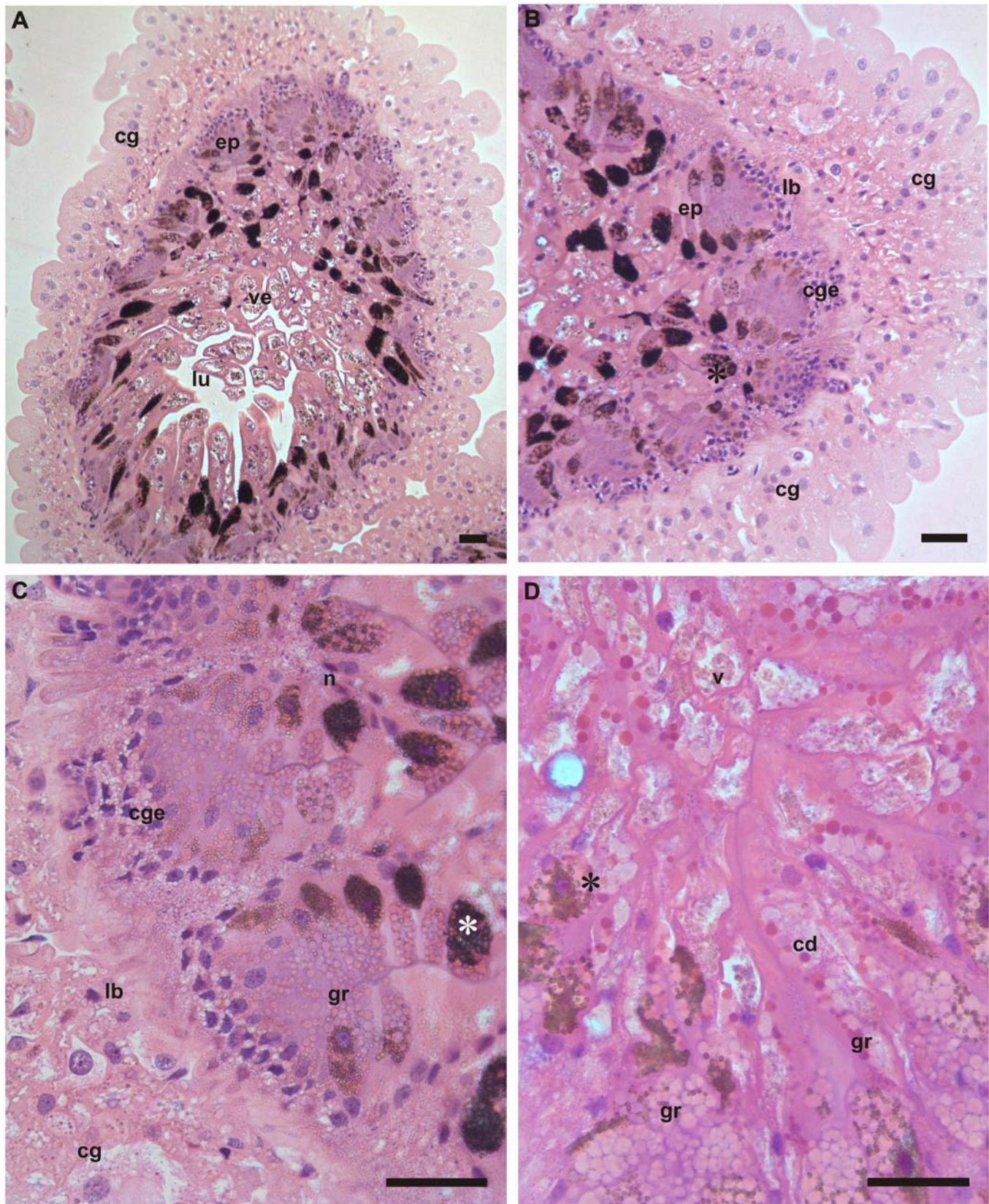


Figura 12- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Células digestivas (**cd**) apresentando acúmulo de grânulos (**gr**) no citoplasma e também outro tipo de material granular sem coloração (*****) e vesículas (**ve**) sendo liberadas para o lúmen (**lu**). **B)** Detalhe do ápice das células epiteliais com material não corado (*****) e grande quantidade de grânulos (**gr**) contidos em vesículas (**ve**). **C e D)** Corpo gorduroso (**cg**) contendo células arredondadas, com núcleos (**n**) esféricos, grande nucléolo (**nu**) e gotas lipídicas (**l**). Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

ep= epitélio.

l= lipídeo.

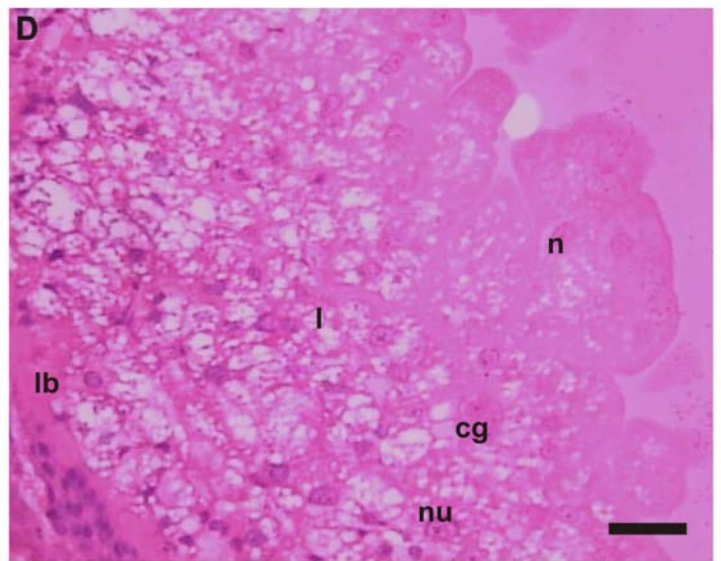
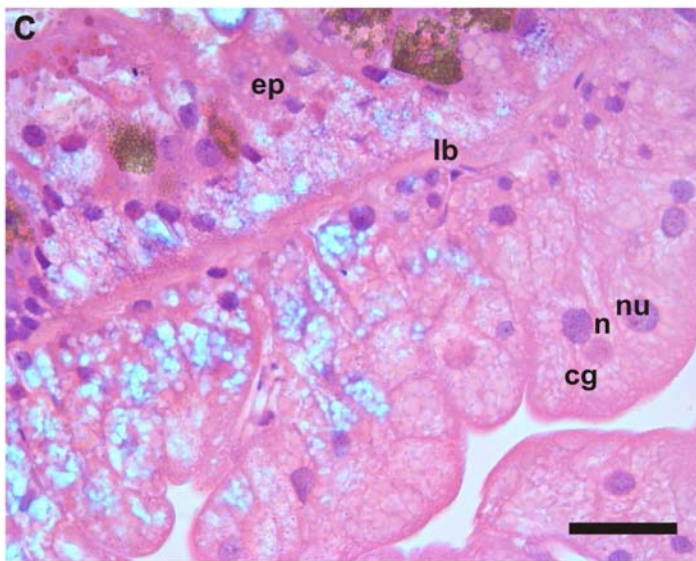
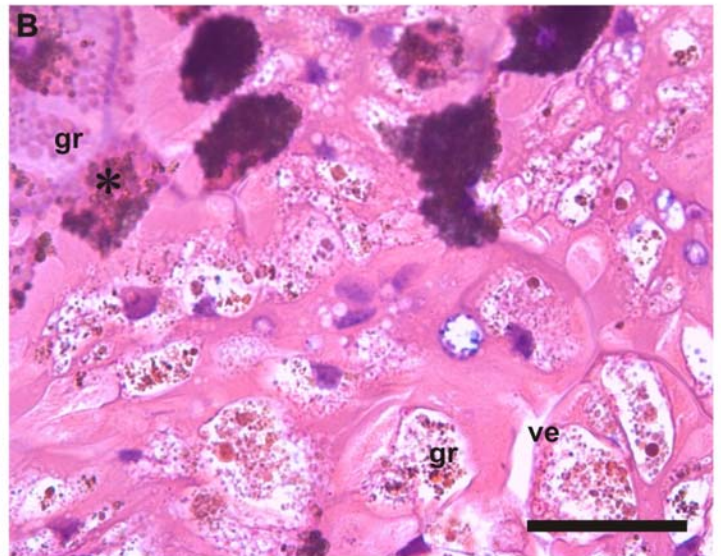
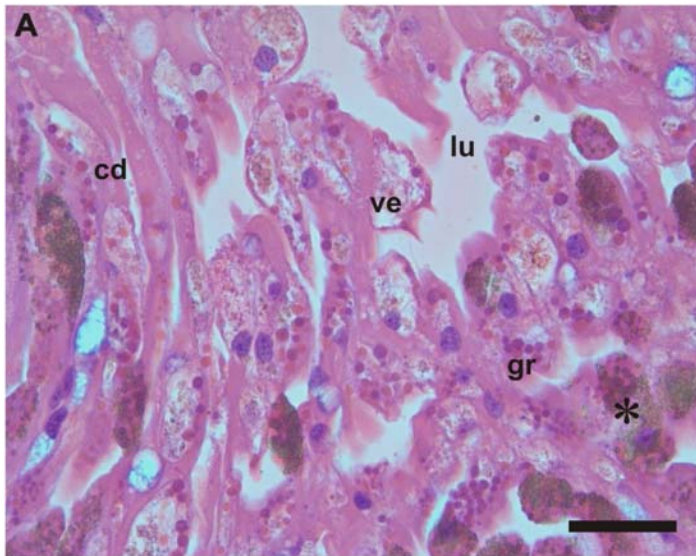


Figura 13- Fotomicrografia da secção histológica do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. Visão geral do ovário (**ov**) e ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (**ovo I**, **ovo II** e **ovo III**), contendo a vesícula germinativa (**vg**) um grande nucléolo (**nu**), e conectados pelo pedicelo (**pe**). No lúmen (**lu**) está presente a secreção (**s**). Barras = 50µm.

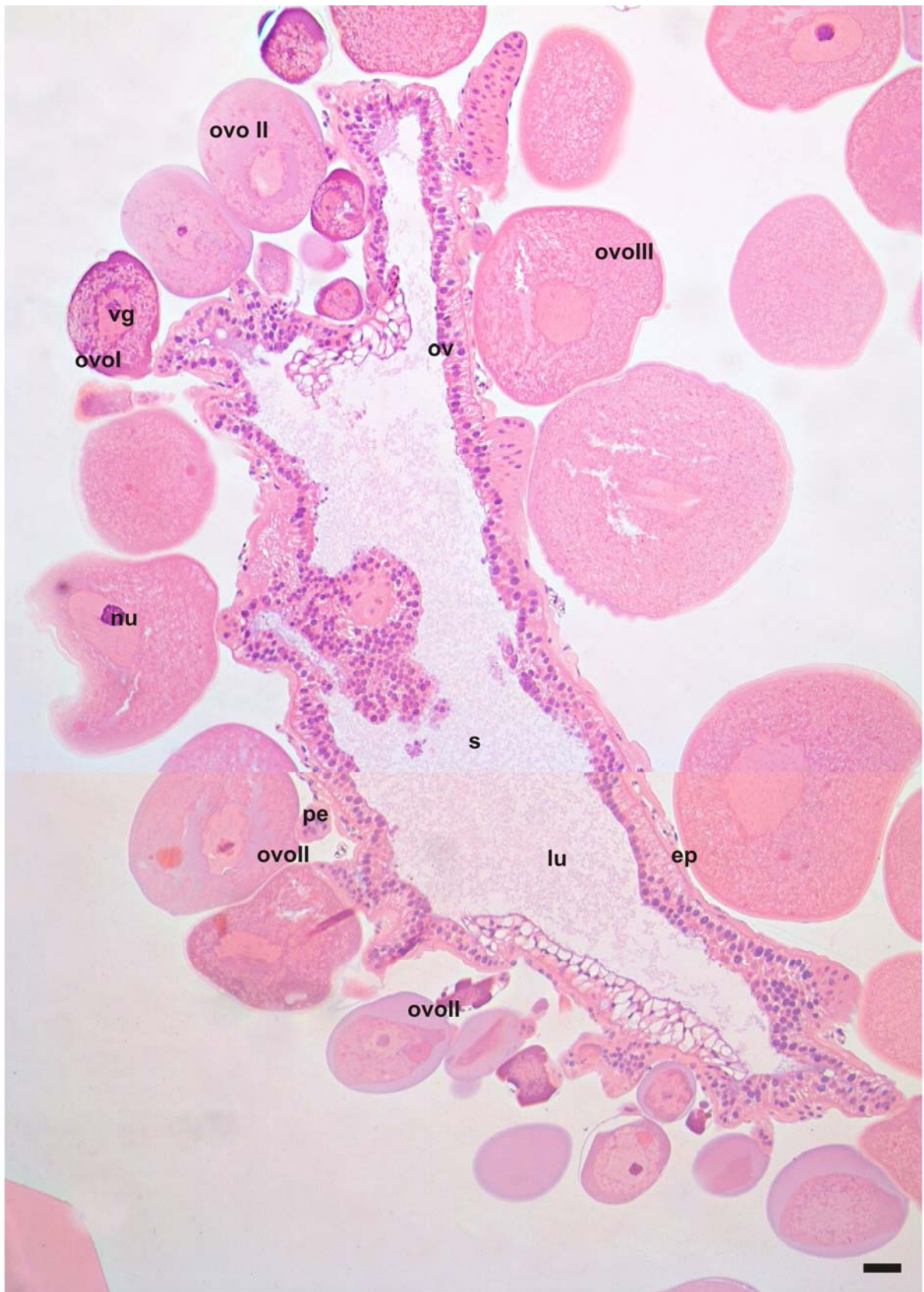


Figura 14- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Epitélio (**ep**) ovariano com núcleos (**n**) esféricos. No epitélio observa-se o pedicelo (**pe**). **B)** Detalhe de ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (**ovo I** e **ovo II**). **C)** No epitélio (**ep**) observam-se células contendo porções citoplasmáticas basófilas em torno de núcleos e pedicelos (**pe**). Em torno do epitélio observa-se musculatura (**mu**). **D)** Detalhe de um pedicelo (**pe**) projetado para o exterior do ovário (**ov**).

Barras = 50µm.

ovo= ovócito.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

mu= musculatura.

vg= vesícula germinativa.

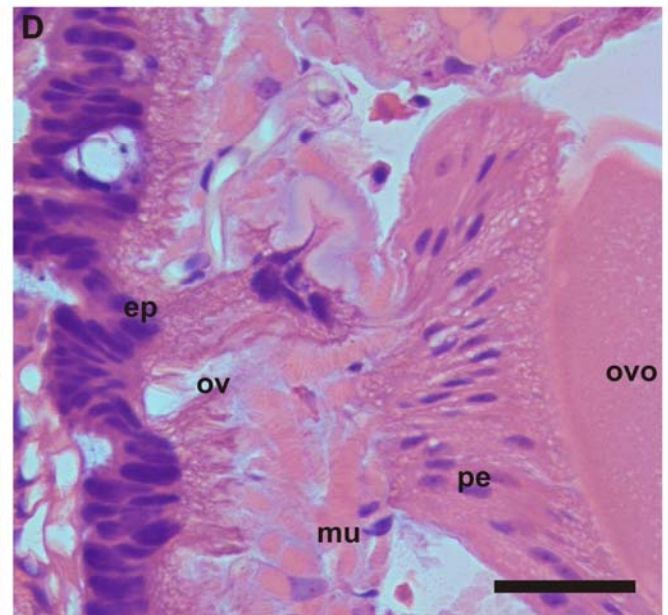
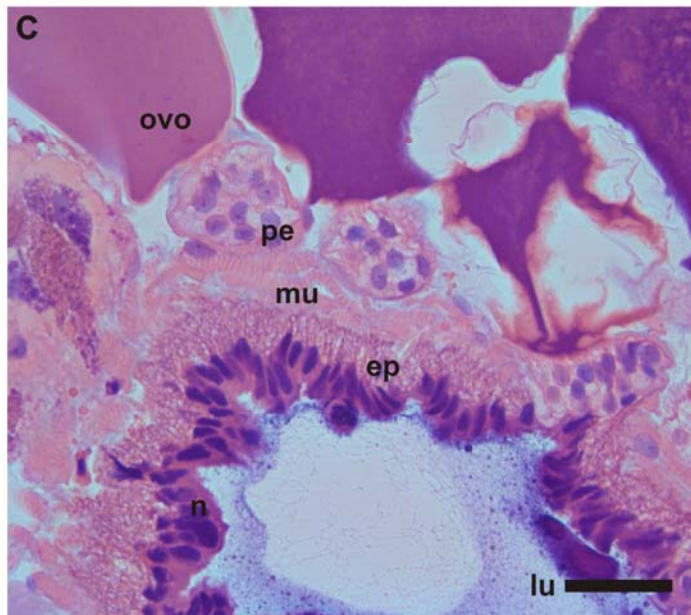
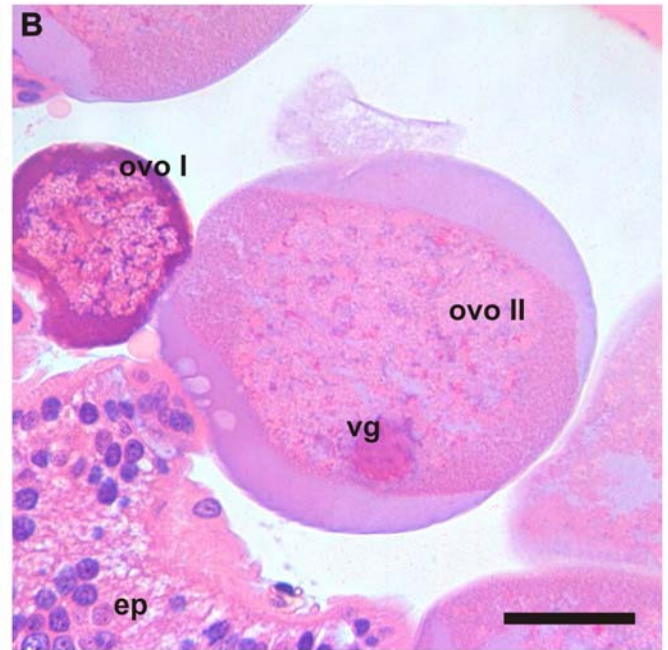
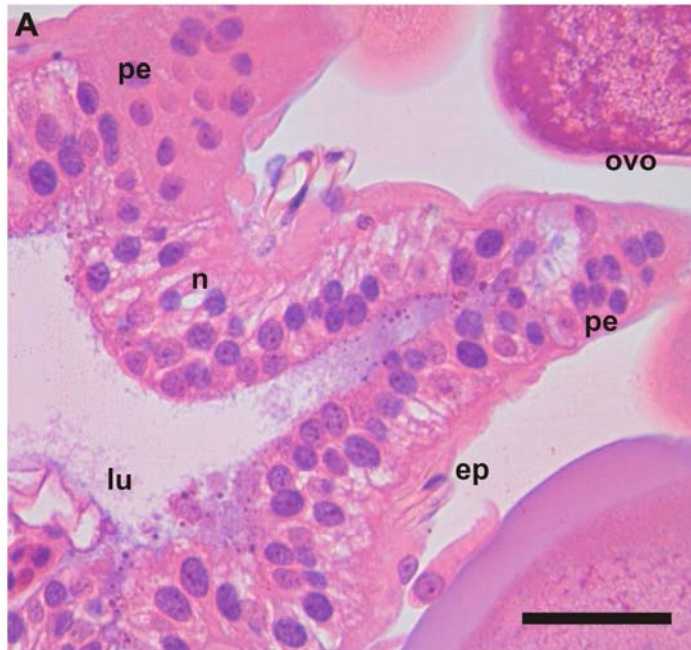


Figura 15- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Visão geral (em corte) do ventrículo, onde se observa os diferentes tecidos, o epitélio (**ep**) e o corpo gorduroso (**cg**) que o circunda. **B)** Porção apical das células do epitélio apresentando acúmulo de grânulos (**gr**) no citoplasma. **C).** Detalhe do epitélio, onde se observa grânulos densos e outros não corados (*). **D)** Porção apical das células do epitélio (**ep**) em detalhe mostrando núcleos (**n**) com grande nucléolo (**nu**). Barras = 50µm.

lu= lúmen.

lb= lâmina basal.

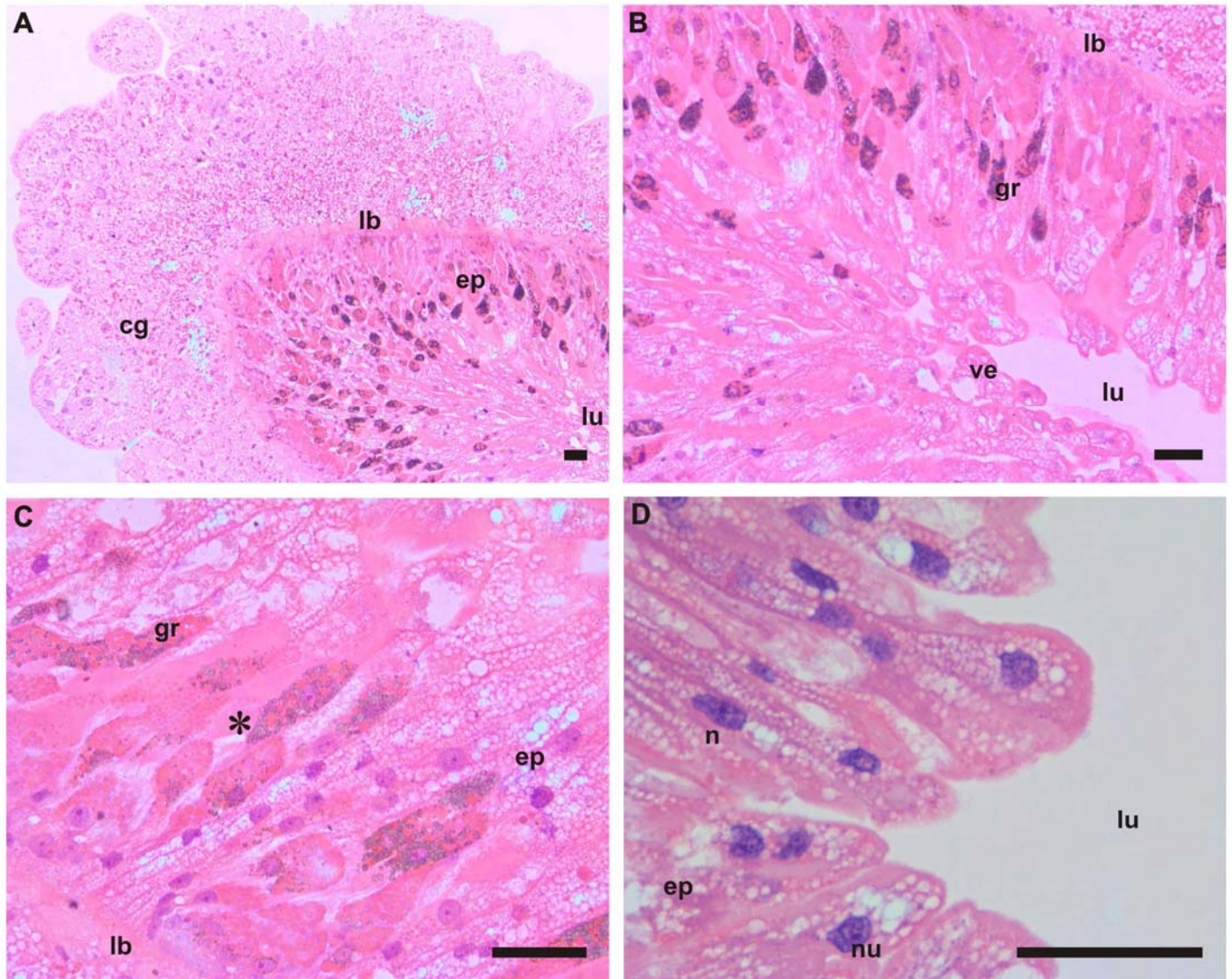


Figura 16- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Células do epitélio (**ep**) apresentam acúmulo de grânulos (**gr**) no citoplasma. Na porção basal do epitélio são observadas as células generativas (**cge**) apoiadas na lâmina basal (**lb**). Também se observa a musculatura (**mu**) em torno do epitélio e abaixo da lâmina basal. O corpo gorduroso (**cg**) que circunda todo o ventrículo é formado de células com núcleos (**n**) esféricos e grande nucléolo (**nu**). **B)** Detalhe da musculatura que circunda todo o ventrículo, e que é vista em corte longitudinal (**mul**) e transversal (**mut**). **C)** Corpo gorduroso (**cg**) com células contendo núcleos (**n**) esféricos, grande nucléolo (**nu**) e gotas lipídicas (**l**). Pequenos grânulos (**gr**) corados são observados no citoplasma dessas células. Barras = 50µm.

l= gotas lipídicas.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

cge= células generativas.

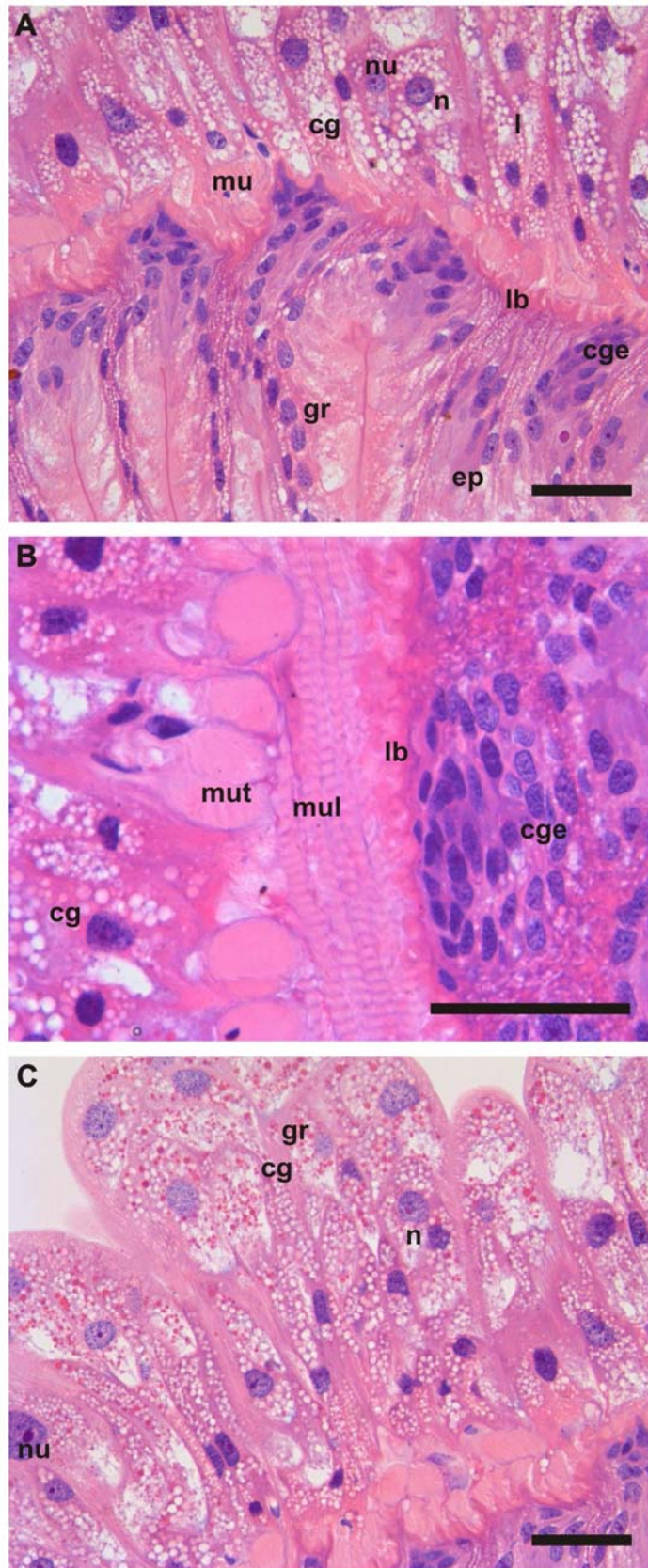


Figura 17- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Ovário, no qual são observados alguns ovócitos em diferentes estágios (**ovo III** e **ovo IV**). Os ovócitos possuem a vesícula germinativa (**vg**) e um grande nucléolo (**nu**). Pode-se observar a formação do cório (**co**) nos ovócitos mais maduros. **B)** Epitélio (**ep**) com células cúbicas, formando o pedicelo (**pe**) com ovócitos (**ovo**) conectados. **C)** Detalhe do epitélio com núcleos (**n**) esféricos. No lúmen (**lu**) está presente secreção (**s**) de natureza levemente ácida. Em torno do epitélio ovariano estão presentes feixes de musculatura (**mu**). É evidente ovogônias (og) junto ao ovário. **D)** Porção apical das células do epitélio contendo gotas de secreção sendo liberadas para o lúmen (**lu**). Barras = 50µm.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

n= núcleo.

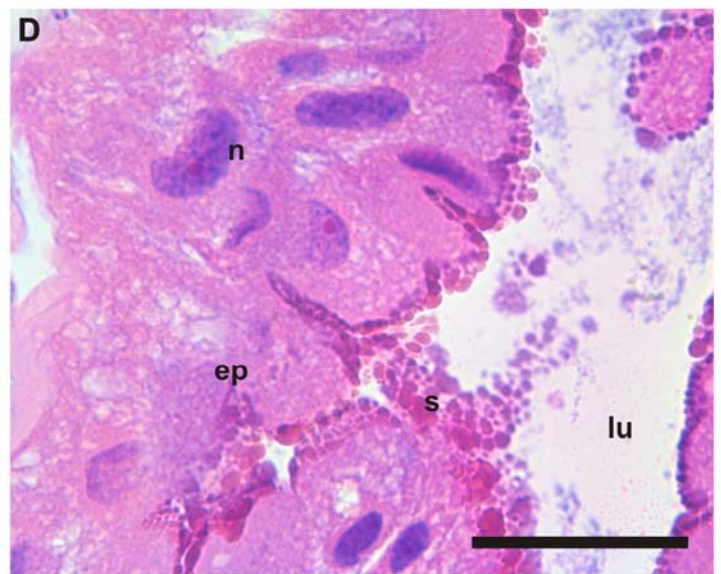
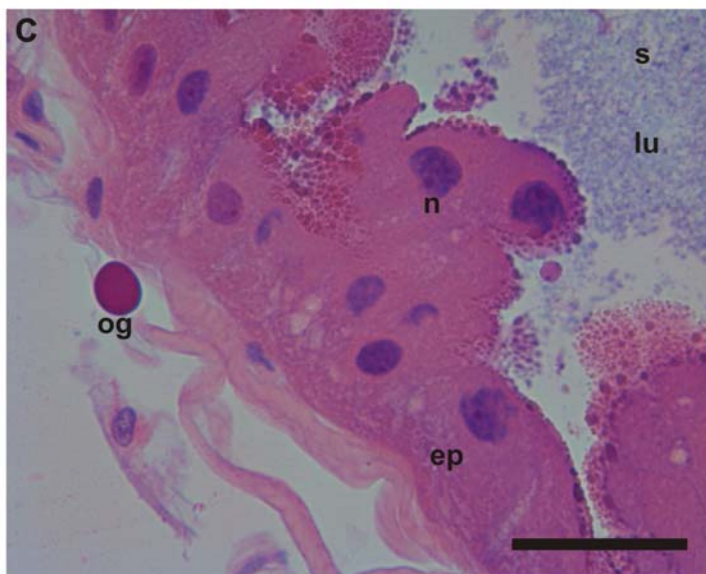
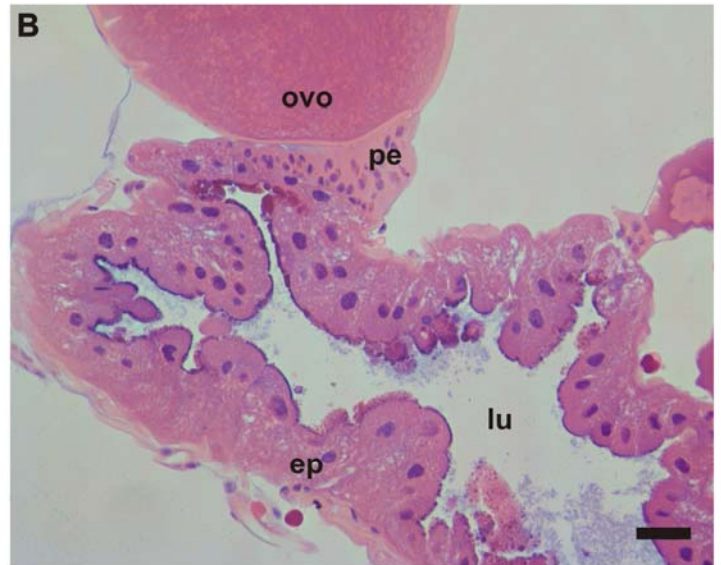


Figura 18- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Epitélio (**ep**) com células cúbicas e ovócitos (**ovo I**) e ovogônias (**og**) conectadas. **B)** São observados ovócitos em estágio de reabsorção (**ovr**), onde ainda está presente o cório (**co**). **C)** Detalhe do epitélio (**ep**) com o pedicelo (**pe**) conectando o ovócito (**ovo**). Barras = 50µm.

lu= lúmen.

nu= nucléolo.

vg= vesícula germinativa.

ovo III= ovócito III.

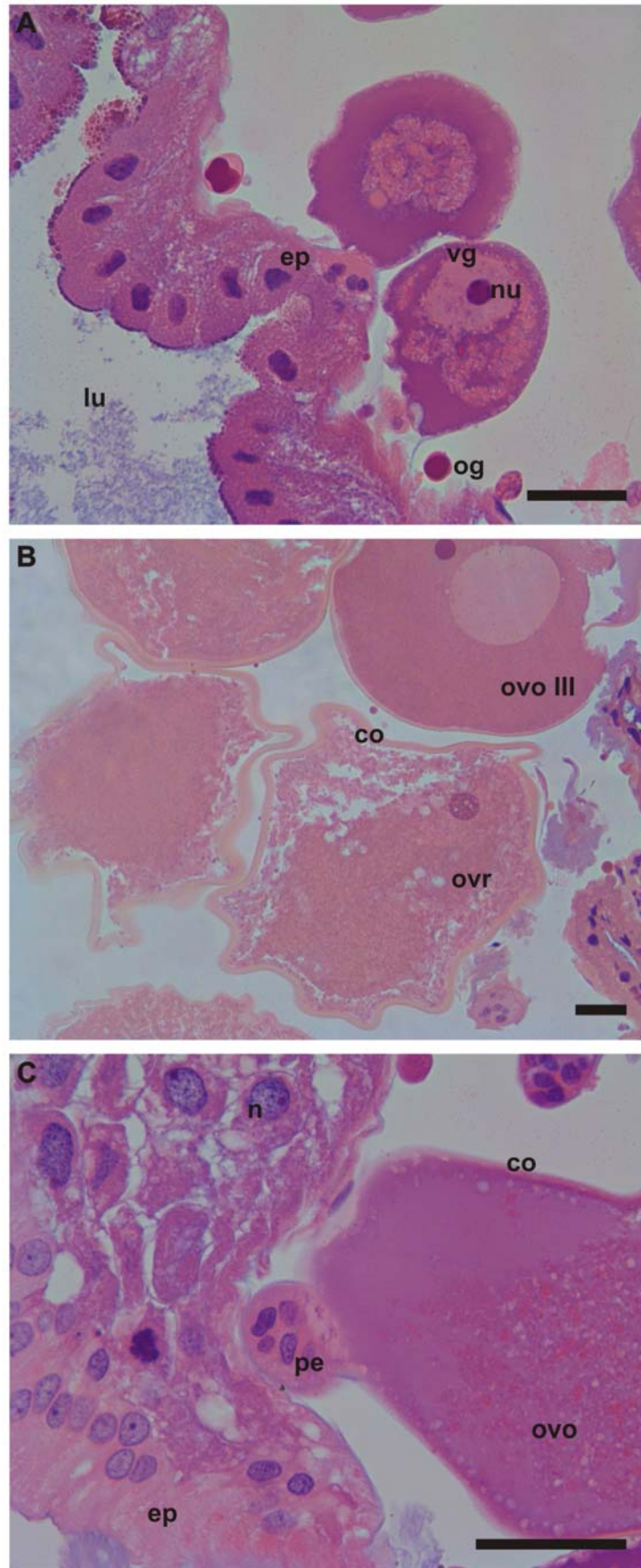


Figura 19- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com prole, coradas com hematoxilina-eosina. **A)** Epitélio (**ep**) apresentando retração em relação à fase anterior. **B)** Detalhe do epitélio (**ep**) com grupos de células generativas (**cge**) na porção basal desse. **C)** O epitélio aparece em cortes longitudinal, transversal e oblíquo, evidenciando a organização em vilosidades do órgão. **D)** Detalhe dos feixes musculares em torno do epitélio do ventrículo. Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

cge= células generativas.

mu= musculatura.

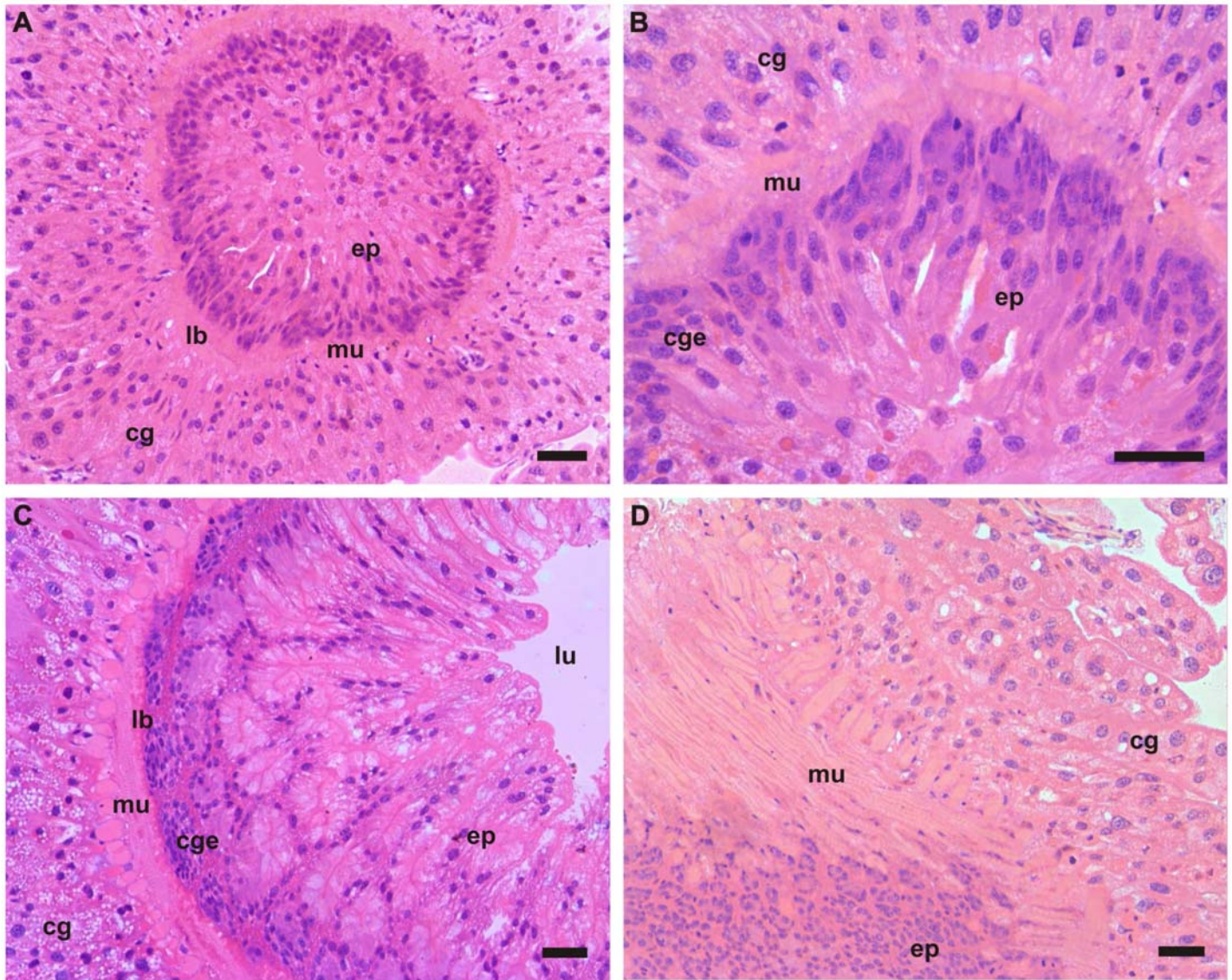


Figura 20- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, com prole, coradas com hematoxilina-eosina. **A e B)** O ovário nesta fase encontra-se mais retraído com um estreito lúmen (**lu**). Em torno do epitélio (**ep**), estão presentes a musculatura (**mu**), e abaixo desta a túnica própria (**tp**). Observam-se os pedicelos (**pe**) que se projetam para o exterior do ovário. **C)** Detalhe do ovário com o lúmen (**lu**) estreito, no qual é observada a secreção basófila (**s**). O epitélio (**ep**) baixo com células cúbicas e núcleos (**n**) esféricos é rodeado por musculatura (**mu**). **D)** Epitélio (**ep**) com pedicelo (**pe**) conectando o ovócito (**ovo II**) que contem material granular e a vesícula germinativa (**vg**). **E)** Detalhe de ovócito (**ovr**) sendo reabsorvido.

Barras = 50µm.

ovo I= ovócito I.

ep= epitélio.

n= núcleo.

tp= túnica própria.

co= cório.

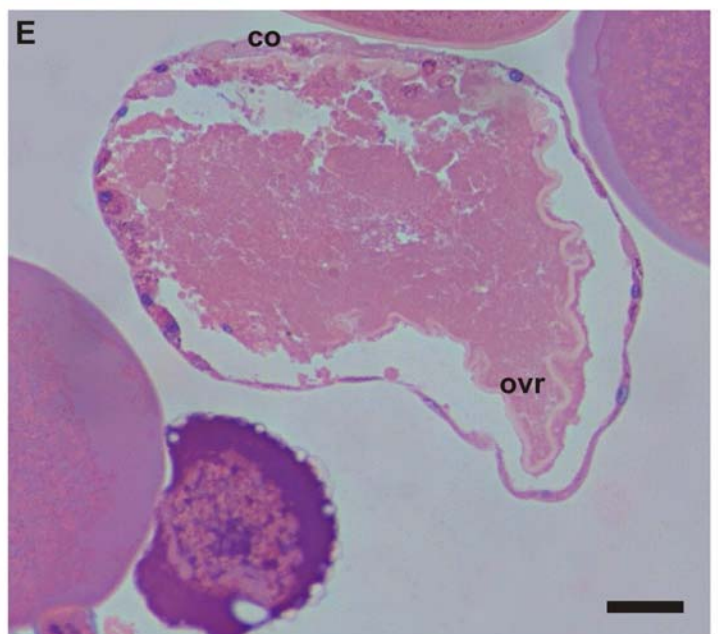
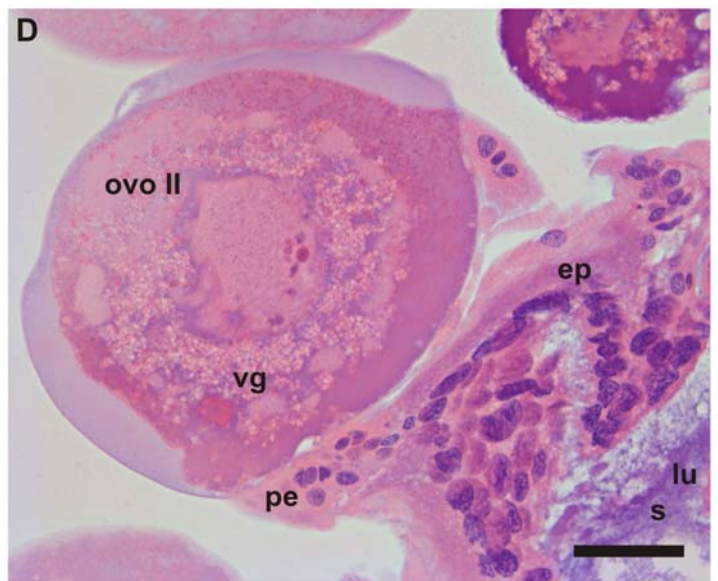
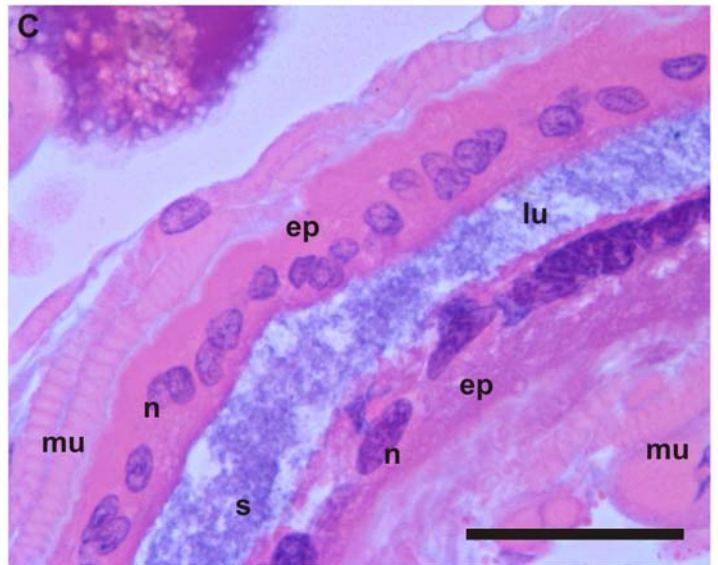
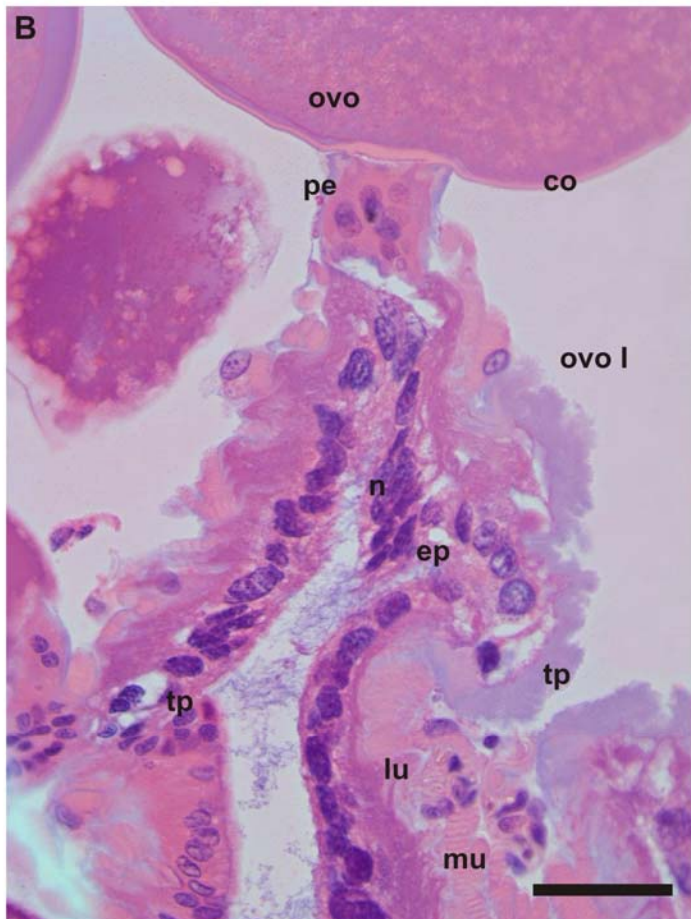


Figura 21- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A e B)** Reação de PAS com contra coloração de verde de metila. A reação fortemente positiva ao PAS é observada na lâmina basal (**lb**) do epitélio (**ep**) assim como na lâmina basal do corpo gorduroso (**cg**). Marcações positivas (**setas**) também são encontradas em regiões citoplasmáticas do epitélio. Os grupos de células generativas (**cge**) apresentaram-se fortemente coradas pelo verde de metila. **C e D)** Reação ao azul de bromofenol. Somente grânulos (**gr**) citoplasmáticos das células do epitélio apresentaram reação positiva à técnica. **E e F)** Reação de PAS e azul de bromofenol simultâneos. Reação positiva ao PAS é observada em regiões citoplasmáticas (**setas**) e na lâmina basal (**lb**). Grânulos (**gr**) apresentam-se levemente positivos a reação de azul de bromofenol. Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

n= núcleo.

ep= epitélio.

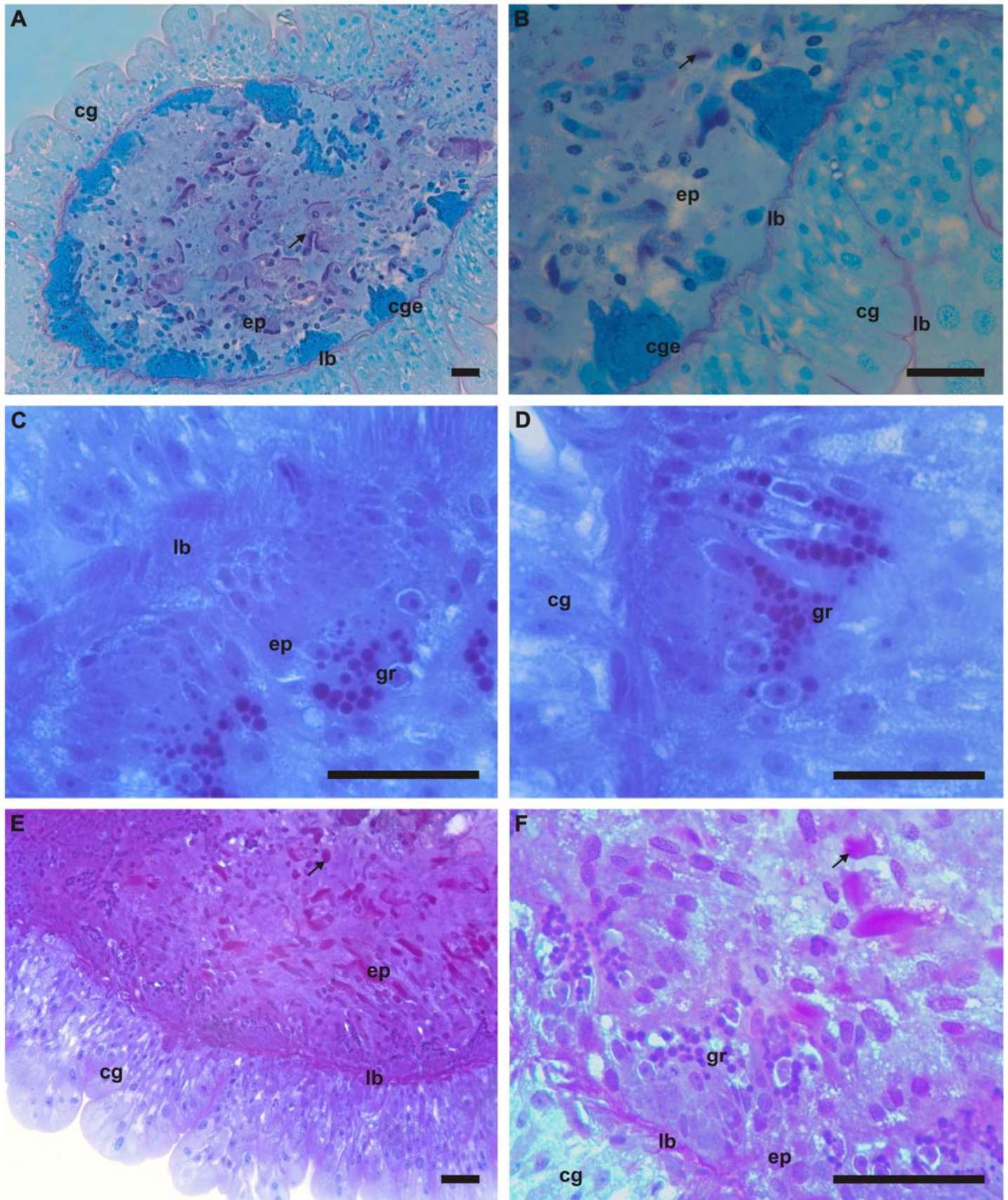


Figura 22- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica de azul de toluidina ácida. **A e B)** À esta técnica os grânulos (**gr**) citoplasmáticos apresentam reação fortemente positiva, enquanto a lâmina basal (**lb**) apresenta reação positiva moderada. Reação positiva é encontrada no interior de vesículas (**ve**) no ápice das células. Os grânulos (*) contidos no citoplasma não apresentam reação positiva. **C)** O material contido no núcleo (**n**), como o nucléolo (**nu**) apresenta forte reação positiva. **D-F)** Técnica de xylidine ponceau. O material submetido à técnica apresentou forte reação positiva somente em grânulos (**gr**) citoplasmáticos. **G e H)** Técnica do picrossírus red. A esta técnica a reação ocorreu fortemente positiva na lâmina basal (**lb**) do corpo gorduroso (**cg**) assim como naquela do epitélio (**ep**) e região de contato entre epitélio e corpo gorduroso. O núcleo (**n**) tanto de células do epitélio como do corpo gorduroso tiveram seus nucléolos (**nu**) fortemente marcados. Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

n= núcleo.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

mu= musculatura.

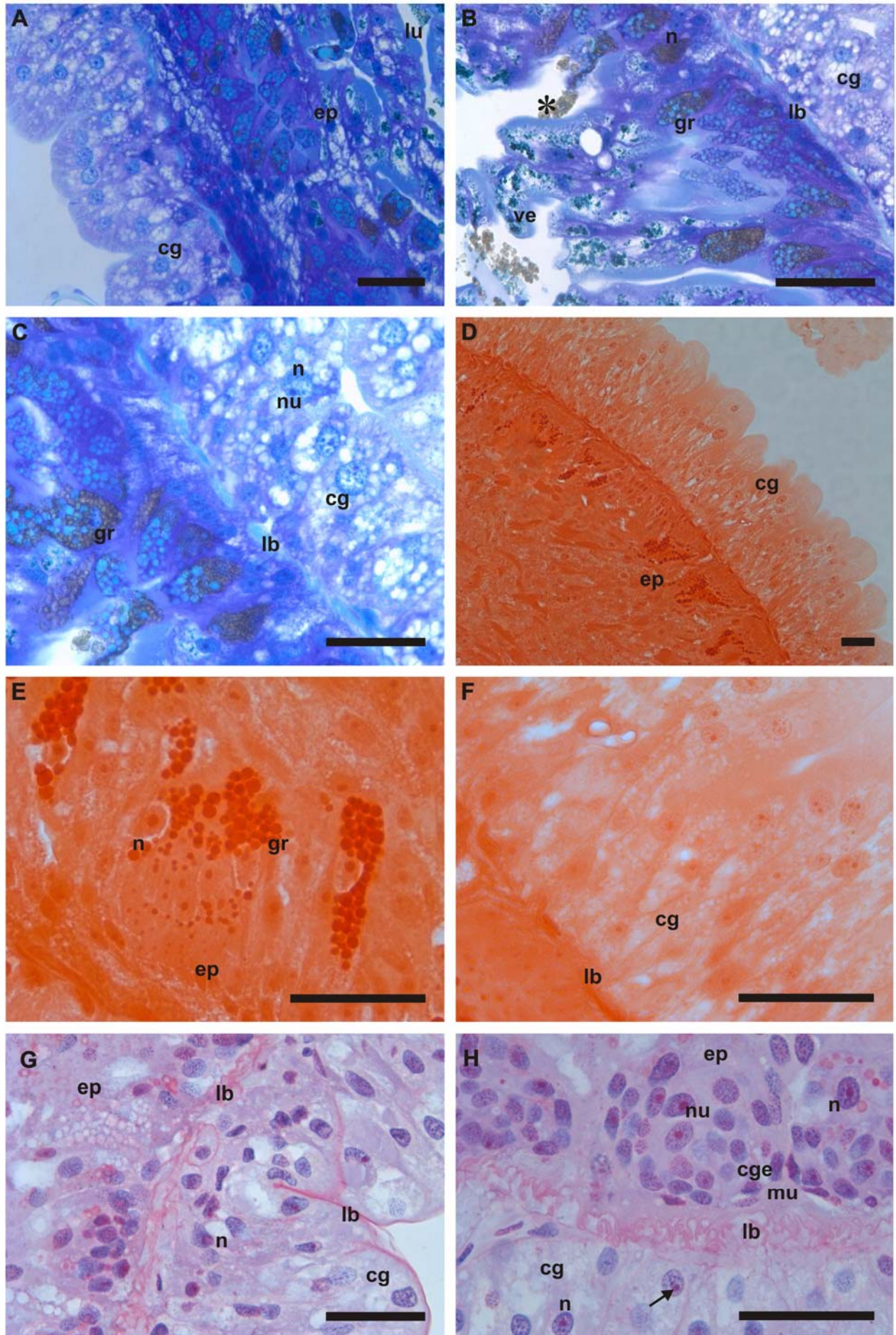


Figura 23- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A e B)** Técnica PAS e contra coloração com verde de metila. Reação positiva à técnica foi observado no cório (**co**) dos ovócitos (**ovo II** e **ovo III**) e na lâmina basal (**seta**) do epitélio do ovário. **C e D)** Técnica azul de bromofenol. A reação mais forte é observada em regiões citoplasmáticas (**seta**) das células do epitélio (**ep**) e em ovócitos jovens (**ovo I**). Reação mais moderada é vista na secreção (**s**) presente no lúmen (**lu**). Outras regiões do epitélio como o pedicelo (**pe**) apresentam reação fracamente positiva nos núcleos (**n**) das células deste. Reação fortemente positiva é observada em nucléolos (**seta**). **E e F)** Técnica PAS e azul de bromofenol simultâneos. Observa-se reação fortemente positiva na lâmina basal (**lb**) em torno do epitélio (**ep**) e em granulações (**setas**) presentes na secreção (**s**) no lúmen (**lu**), em regiões do citoplasma de células do epitélio (**ep**), vesícula germinativa (**vg**) de ovócitos e no nucléolo (**nu**). Barras = 50µm.

ov= ovário.

vg= vesícula germinativa.

n= núcleo.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

co= cório.

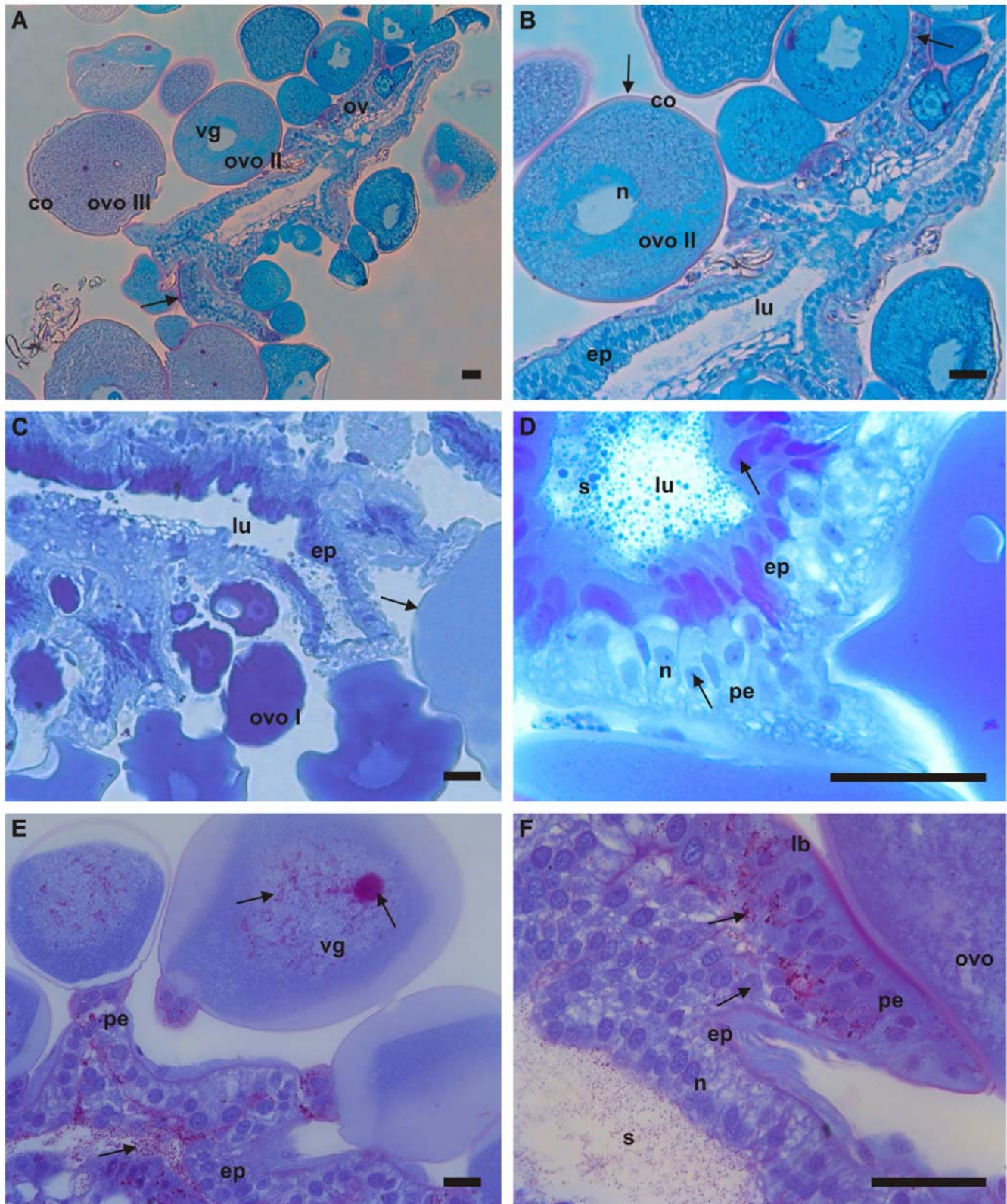


Figura 24- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica azul de toluidina ácida. Reações positivas são observadas na porção apical das células do epitélio (**ep**) onde estão os núcleos (**n**). A reação observada na lâmina basal (**lb**) é fracamente positiva. Outras regiões do epitélio como o pedicelo (**pe**) não apresenta reação. A secreção (**s**) presente no lúmen (**lu**) e nos ovócitos jovens (**ovo I**) tem reação fortemente positiva. **D-F)** Técnica xylidine ponceau. Regiões citoplasmáticas apicais do epitélio (**ep**) e núcleos (**n**) apresentam reação positiva moderada à técnica. Reação moderada também é observada na secreção do lúmen (**lu**). Reação fortemente positiva é observada somente em ovócitos iniciais (**ovo I**). **G e H)** Técnica do picrossirus red. É observada reação positiva somente na lamina basal (**lb**) abaixo do epitélio (**ep**) e fortemente positiva na túnica própria (**tp**). Barras = 50µm.

ov= ovário.

vg= vesícula germinativa.

lu= lúmen.

pe= pedicelo.

ovo II= ovócito II.

ovo III= ovócito III.

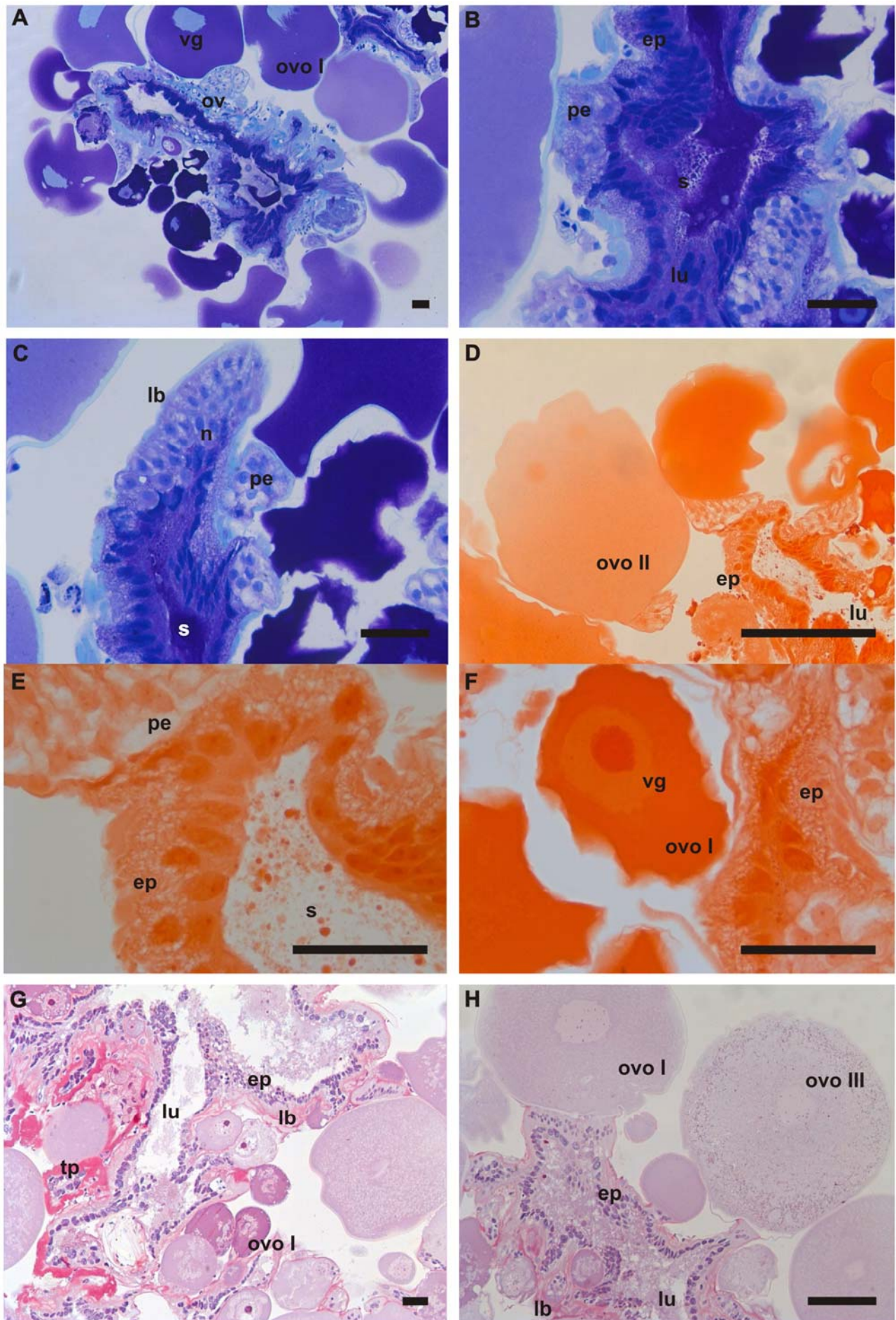


Figura 25- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A e B)** Reação de PAS com contra coloração de verde de metila. A reação fortemente positiva ao PAS é observada na lâmina basal (**lb**) do epitélio (**ep**) assim como na lâmina do corpo gorduroso (**cg**). Marcações positivas (**setas**) também são encontradas em grânulos em regiões citoplasmáticas das células do epitélio e do corpo gorduroso. **C-F)** Reação de azul de bromofenol. Em grânulos (**gr**) citoplasmáticos das células do epitélio a reação é fortemente positiva à técnica. Tanto na lâmina basal (**lb**) como em grânulos (**seta**) no corpo gorduroso (**cg**) ocorrem marcações positivas. Na porção apical das células epiteliais (**ep**), em vesículas (**ve**) não houve reação positiva. **G e H)** Reação de PAS e azul de bromofenol simultâneas. Reação positiva ao PAS ocorre nas lâminas basais (**lb**) do epitélio (**ep**) e corpo gorduroso (**cg**), assim como nos núcleos (**seta**) deste último. Grânulos (**gr**) em células do epitélio (**ep**) e pequenos grânulos (**seta**) nas células do corpo gorduroso apresentam-se positivos a reação do azul de bromofenol. Barras = 50µm.

n= núcleo.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

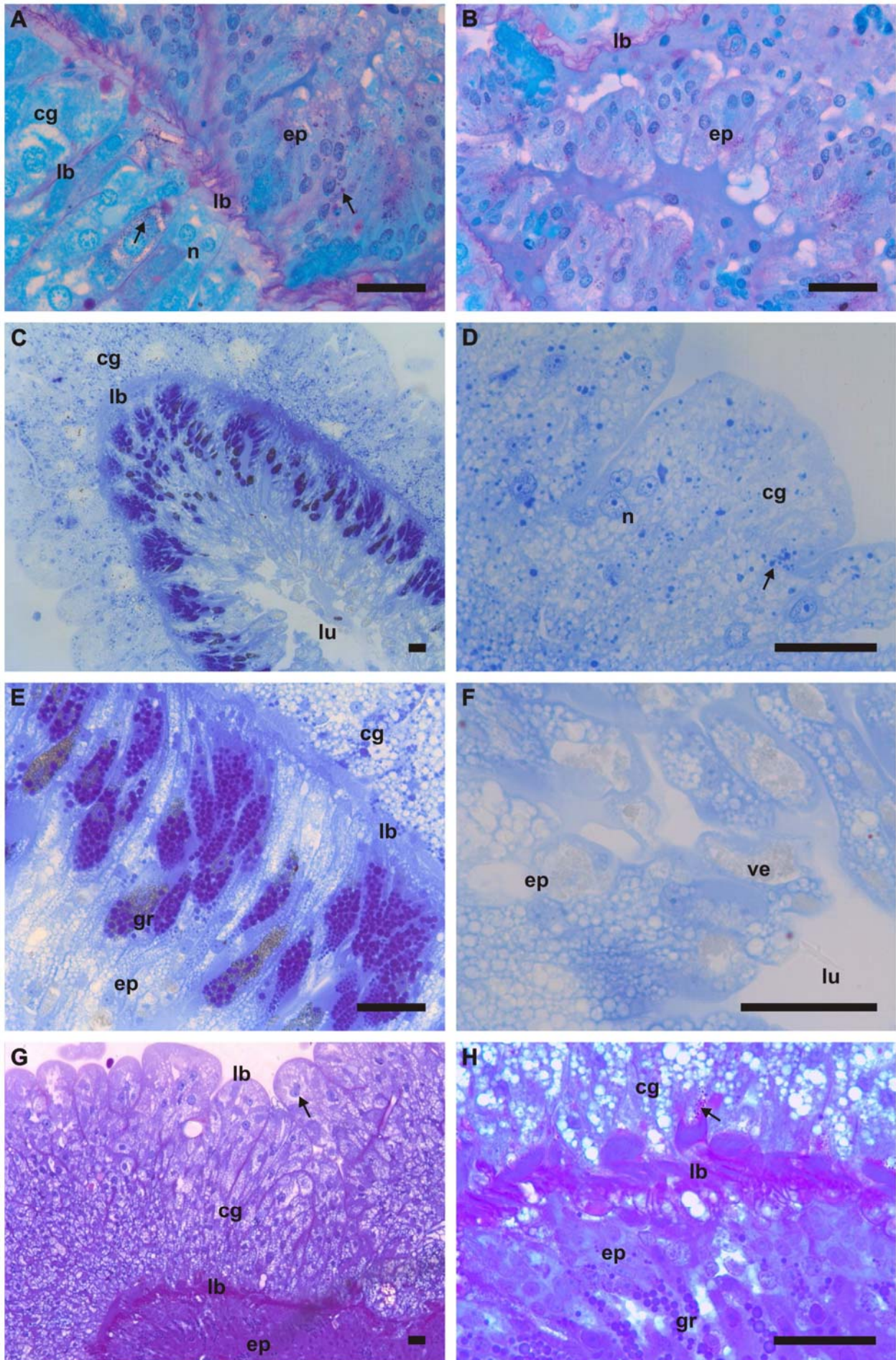


Figura 26- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica de azul de toluidina ácida. Nesta técnica os grânulos (**gr**) citoplasmáticos apresentam reação fortemente positiva, enquanto a lâmina basal (**lb**) apresenta reação moderadamente positiva. Os nucléolos (**nu**) apresentam forte marcação em células do corpo gorduroso (**cg**). **D-F)** Técnica de xylidine ponceau. O material submetido à técnica apresentou forte reação positiva somente em grânulos (**gr**) citoplasmáticos distribuídos pela célula do epitélio (**ep**). O material granular (*****) mostra-se negativo à reação. No corpo gorduroso (**cg**) grânulos (**seta**) são positivos à reação. **G e H)** Técnica do picrossirius red. Nesta técnica a reação ocorreu fortemente positiva na lâmina basal (**lb**) do corpo gorduroso (**cg**) assim como na lâmina basal (**lb**) abaixo do epitélio (**ep**). O núcleo (**n**) de células do epitélio e do corpo gorduroso (**cg**) teve seus nucléolos (**nu**) fortemente marcados. Alguns grânulos (**gr**) mostram-se marcados no citoplasma de células epiteliais.

Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

n= núcleo.

lu= lúmen.

cge= células generativas.

ep= epitélio.

l= lipídeo.

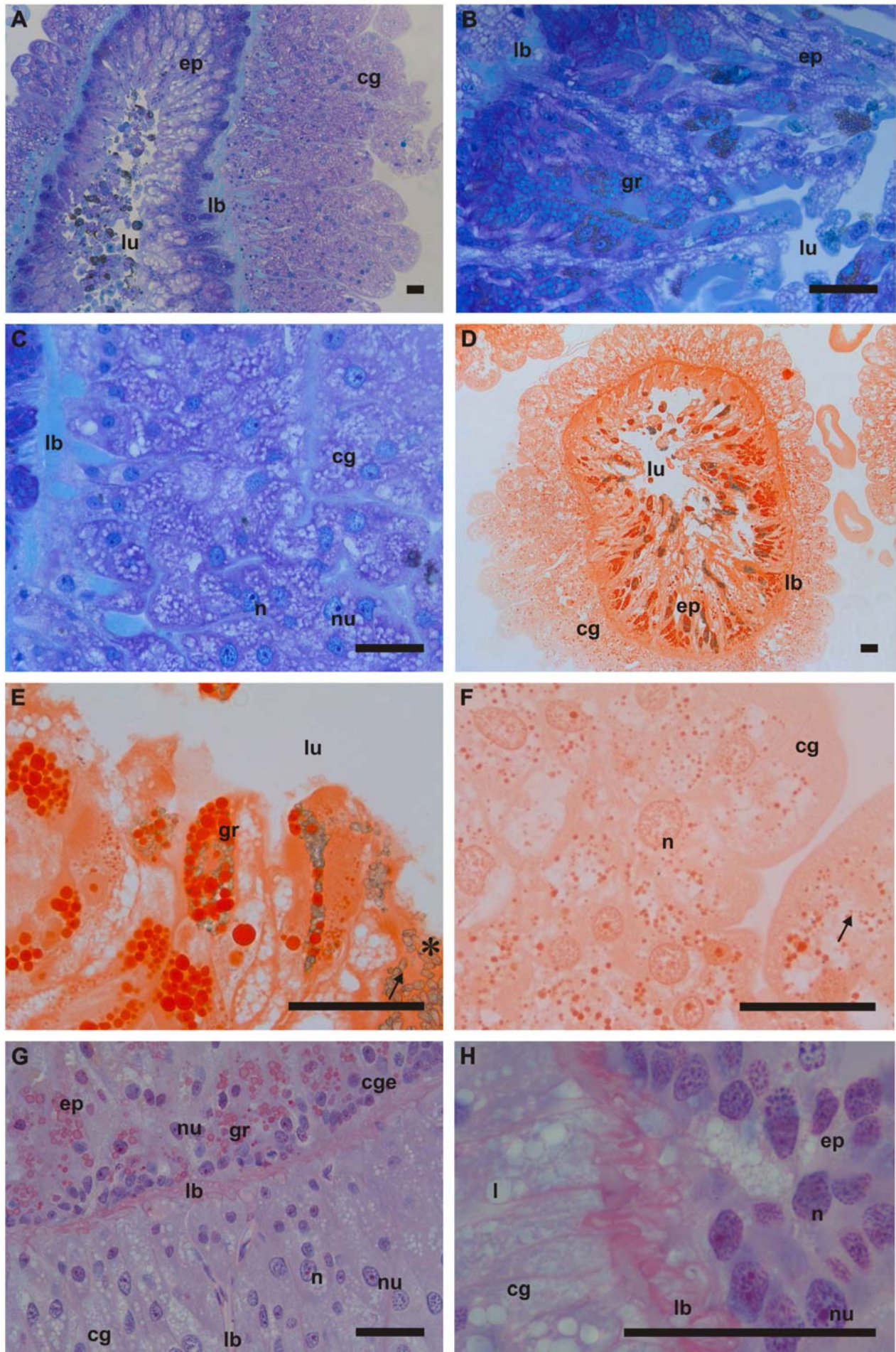


Figura 27- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica PAS e contra coloração com verde de metila. Todo o citoplasma de células do epitélio (**ep**) do ovário apresenta forte reação positiva à técnica, assim como é observado em ovócitos maduros (**ovo V**), em grânulos (**gr**) no interior de ovócitos em desenvolvimento (**ovo II**), no cório (**setas**) desses ovócitos e na lâmina basal (**lb**) abaixo do epitélio. **D-F)** Técnica azul de bromofenol. **D e E)** Reação positiva moderada é vista na secreção (**s** e **seta**) no ápice das células do epitélio (**ep**). **F)** A reação mais forte é vista em grânulos (**gr**) de ovócitos em estágio avançado (**ovo IV**), porém a região do cório (**seta**) é fracamente positiva. **G e H)** Técnica PAS e azul de bromofenol simultâneas. Observa-se reação fortemente positiva ao PAS por todo o citoplasma das células do epitélio (**ep**) e na secreção do lúmen (**lu**). Reação positiva ao azul de bromofenol é vista na secreção (**s**) no ápice das células do epitélio (**ep**) e fracamente positiva na túnica própria (**tp**). Barras = 50µm.

vg= vesícula germinativa.

n= núcleo.

lu= lúmen.

pe= pedicelo.

tp= *tunica propria*

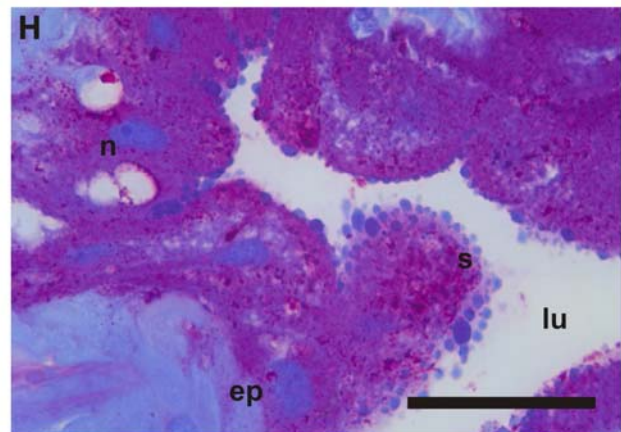
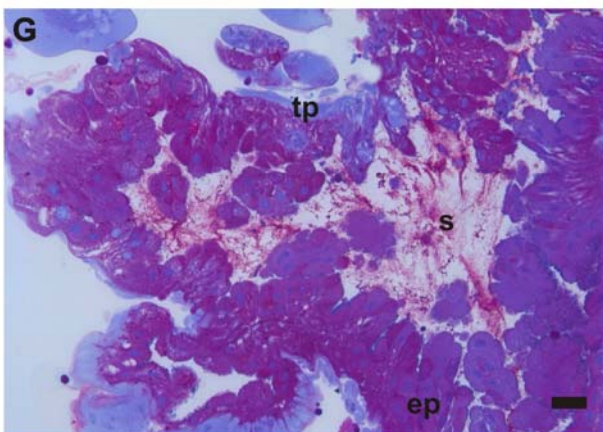
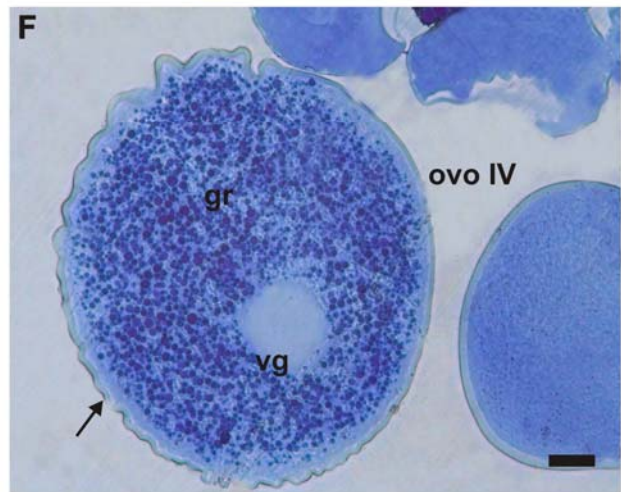
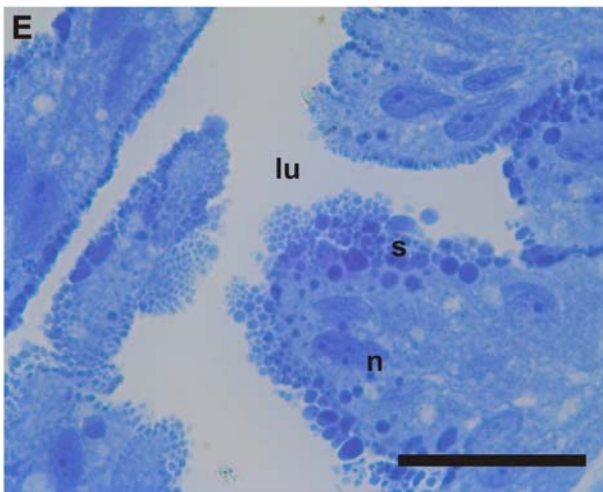
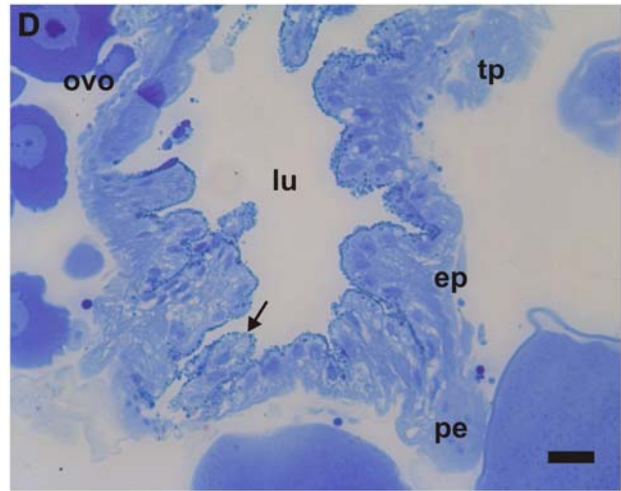
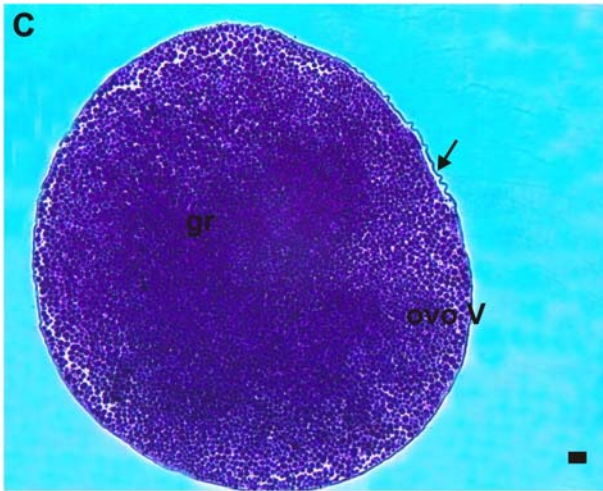
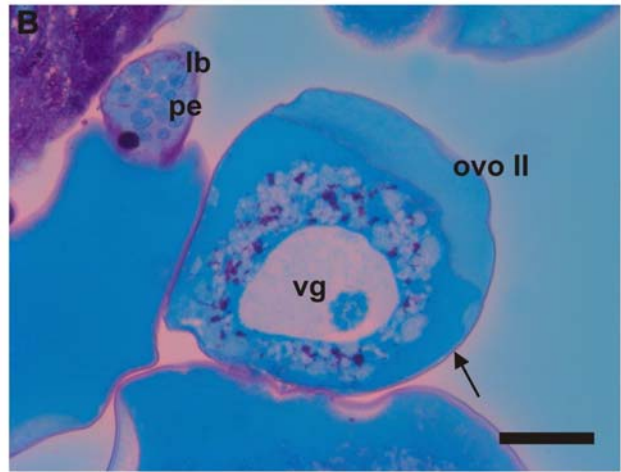
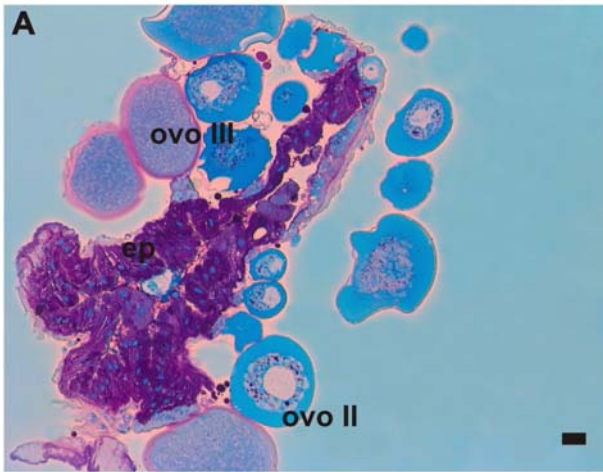


Figura 28- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica azul de toluidina ácida. Reações positivas são observadas na porção apical das células do epitélio (**ep**) onde estão os núcleos. Outras regiões do epitélio como o pedicelo (**pe**) apresenta reação fortemente positiva nos núcleos (**seta**). Em ovócitos jovens (**ovo I** e **ovo II**) a reação é fortemente positiva. A secreção (**s**) no ápice das células tem reação positiva, corando-se em esverdeado, graças à metacromasia do azul de toluidina. **D-F)** Técnica xylydine ponceau. **D** e **E)** A secreção (**seta**) na porção apical das células do epitélio (**ep**) apresenta reação positiva, assim como nos núcleos (**n**), onde a reação é fracamente positiva e nos nucléolos (**seta**) onde a mesma é fortemente positiva. **F)** Reação fortemente positiva é observada somente em ovócitos iniciais (**ovo I**) e em grânulos de ovócitos (**ovo IV**) em estágio avançado. No cório (**co**) não há reação positiva. **G** e **H)** Técnica do picrossirus red. É observada reação positiva na lâmina basal (**seta**) do epitélio (**ep**) e ao redor do pedicelo (**pe**), como em porções citoplasmáticas (**seta**), no cório (**co**) do ovócito jovem (**ovo I**), que tem a vesícula germinativa (**vg**) com grande nucléolo (**nu**) marcado e núcleo acessório (**na**). Barras = 50µm.

n= núcleo.

ep= epitélio.

lu= lúmen.

pe= pedicelo.

seta= marcação positiva.

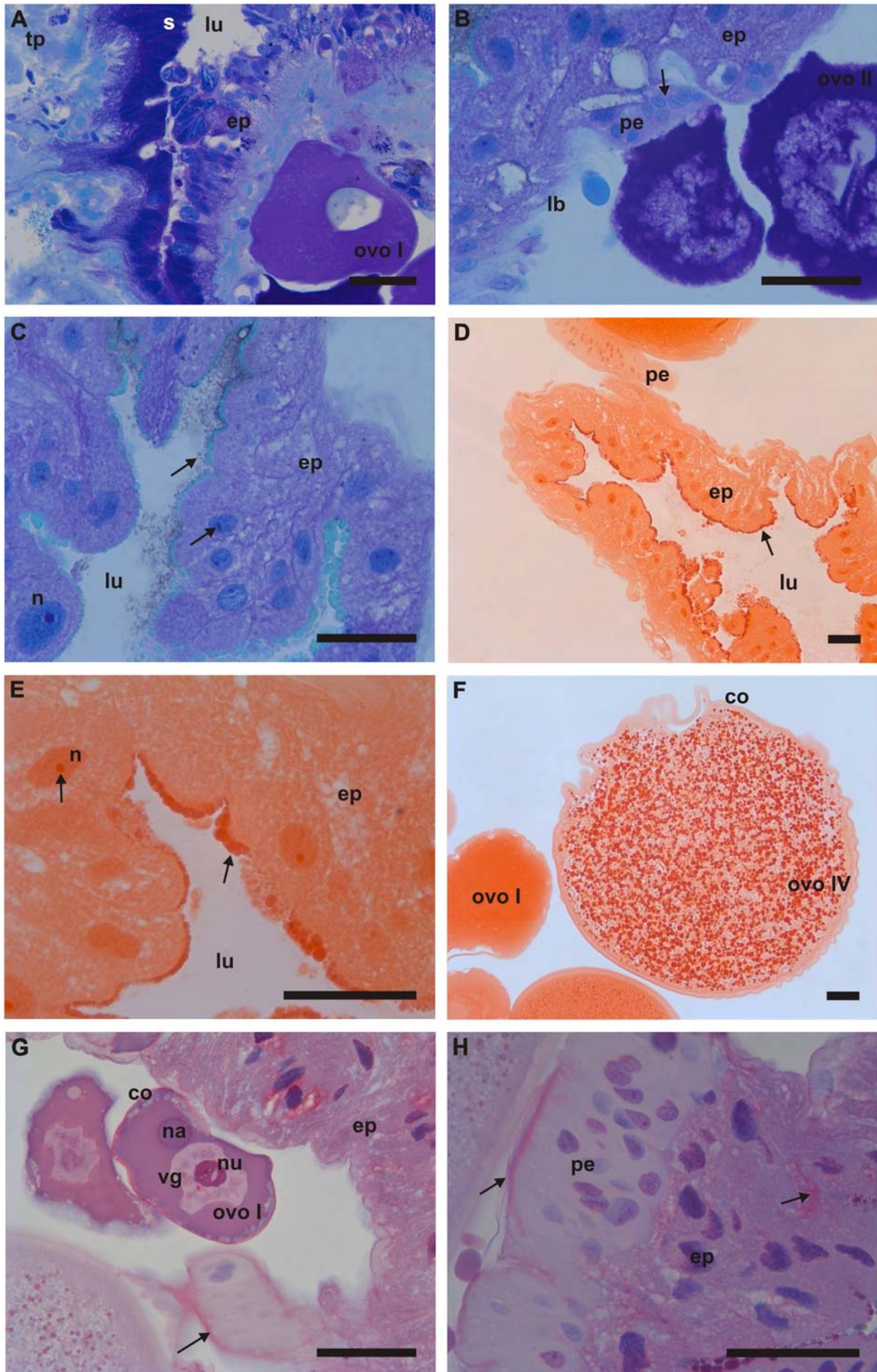


Figura 29- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Reação de PAS com contra coloração de verde de metila. A reação fortemente positiva ao PAS é observada na lâmina basal (**lb**) do epitélio (**ep**) assim como na lâmina do corpo gorduroso (**cg**, **seta**). Grupos de células generativas (**cge**) apresentaram-se fortemente coradas pelo verde de metila. **D e E)** Reação de azul de bromofenol. Reação levemente positiva ocorreu na lâmina basal (**lb**) e em núcleos de células generativas (**cge**) e de células do corpo gorduroso (**cg**). **F-H)** Reação de PAS e azul de bromofenol simultâneos.. Reação positiva ao PAS ocorre nas lâmina basais (**lb**) do epitélio (**ep**) e do corpo gorduroso (**cg**). Grânulos (**gr**) em células do epitélio (**ep**), assim como os núcleos (**seta**) e diminutas granulações (**seta**) no citoplasma de células do corpo gorduroso (**cg**) apresentam-se positivos a reação de azul de bromofenol. Células generativas (**cge**) também apresentam reação positiva para a técnica. Barras = 50µm.

n= núcleo.

lu= lúmen.

ep= epitélio.

l= lipídeo.

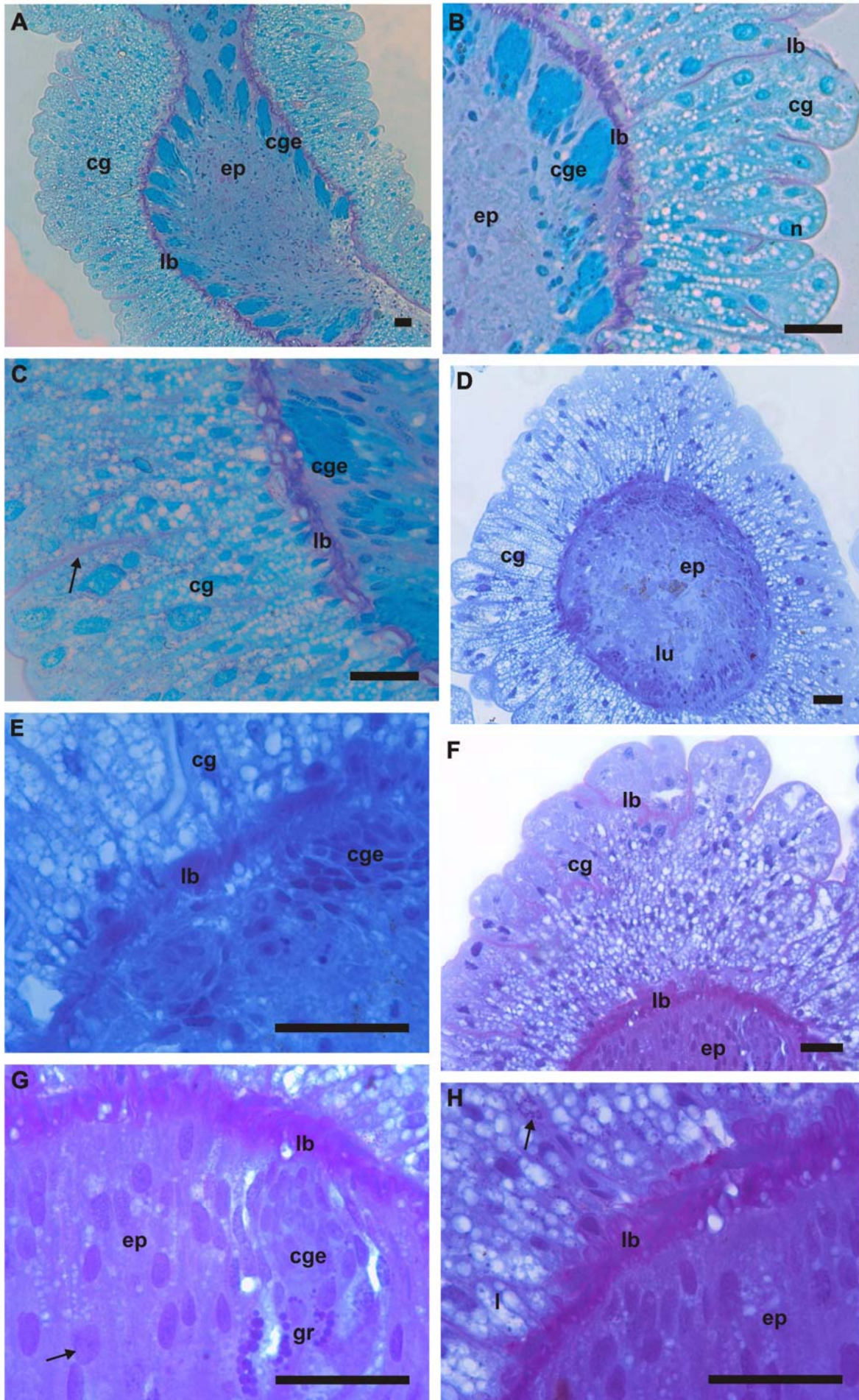


Figura 30- Fotomicrografias das secções histológicas do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica de azul de toluidina ácida. **A-C)** Reação fortemente positiva à técnica são evidentes somente nos núcleos e citoplasma de células generativas (**cge**) e núcleos (**n**) de células do corpo gorduroso (**cg**), que apresentam nucléolo (**seta**) com forte reação positiva. Para esta técnica tanto os grânulos (**gr**) citoplasmáticos quanto a lâmina basal (**lb**) não apresentam reação positiva. **D-F)** Técnica de xylidine ponceau. Reação positiva e moderada pode ser observada em pequenos grânulos (**seta**) do corpo gorduroso (**cg**). **G e H)** Técnica do picrosirius red. Nesta técnica a reação foi fortemente positiva na lâmina basal (**lb**). Alguns grânulos (**seta**) aparecem marcados no citoplasma de células epiteliais. Barras = 50µm.

lb= lâmina basal.

cg= corpo gorduroso.

lu= lúmen.

cge= células generativas.

ep= epitélio.

l= gotas lipídicas.

gr= grânulos.

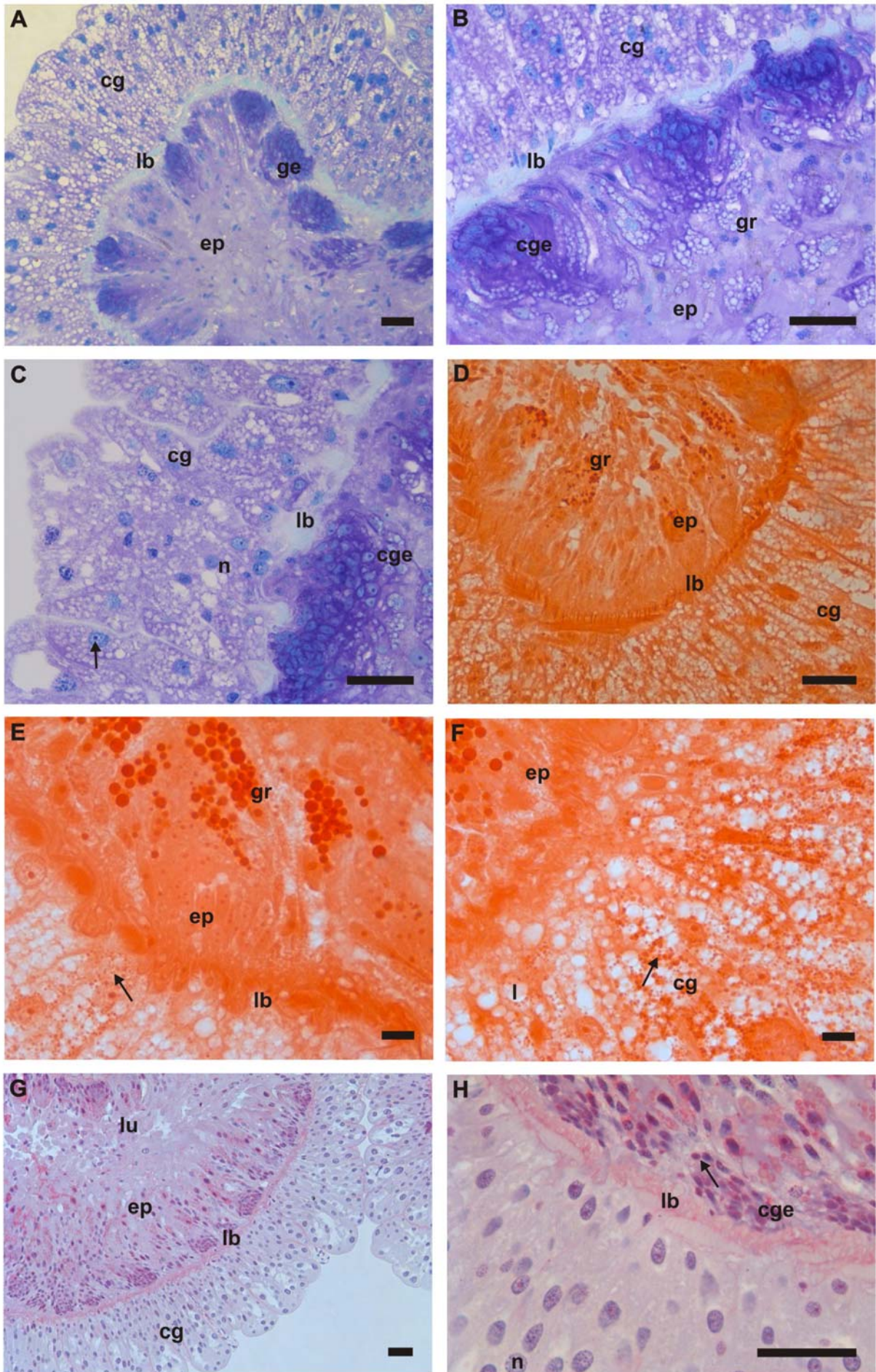


Figura 31- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica do PAS e contra coloração com verde de metila. Todo o citoplasma de células do epitélio (**ep**) do ovário apresenta forte reação positiva à técnica, assim como ocorre na lâmina basal (**seta**) do ovário. A secreção (**s**) no lúmen (**lu**) apresenta-se fortemente positiva à reação. Ovócitos em estágio de reabsorção (**ovr**) apresentam reação positivamente moderada. **D e E)** Técnica azul de bromofenol. O ovário (**ov**) apresenta fraca reação positiva à técnica, assim como ocorre na túnica própria (**tp**). Ovócitos (**ovo I** e **ovo III**) apresentam reação positiva moderada e seu nucléolo (**nu**) é fortemente marcado. **F-H)** Técnica PAS e azul de bromofenol simultâneos. Observa-se reação fortemente positiva ao PAS, por todo o citoplasma das células do epitélio (**ep**), com exceção do pedicelo (**pe**). Neste último a reação ao PAS é fortemente positiva na lâmina basal (**seta**), assim como ocorre com a secreção (**s**) presente no lúmen (**lu**) do ovário. Regiões do citoplasma (**seta**) das células do epitélio apresentam reações fortemente positivas ao azul de bromofenol. Em ovócitos em desenvolvimento (**ovo III**) granulações (**seta**) apresentam reação positiva aos dois compostos da técnica. Barras = 50µm.

n= núcleo.

pe= pedicelo.

mu= musculatura.

ovo= ovócitos.

ep= epitélio.

vg= vesícula germinativa.

nu= nucléolo.

ovo I= ovócito jovem.

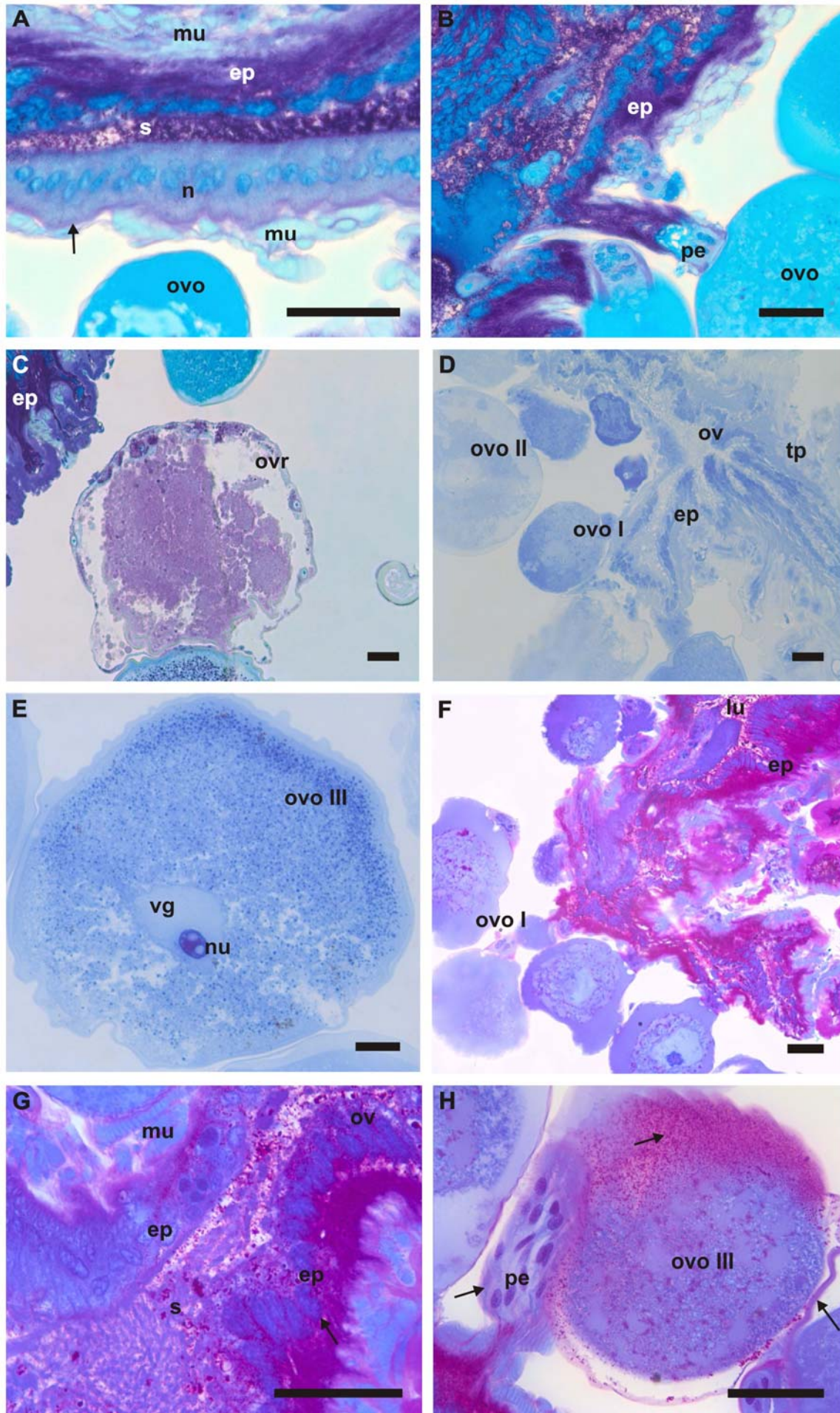


Figura 32- Fotomicrografias das secções histológicas do ovário de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole, submetidas à técnicas histoquímicas. **A-C)** Técnica azul de toluidina ácida. Reações positivas são observadas na porção apical das células do epitélio (**ep**) onde estão os núcleos. No pedicelo (**pe**) marcações moderadamente são observadas nos núcleos (**n**) e moderadamente positiva na vesícula germinativa (**vg**). Em ovócitos jovens (**ovo I**) a reação é fortemente positiva, assim como também o é a secreção (**s**) no lúmen. Ovócitos em reabsorção (**ovr**) apresentam fraca reação positiva à técnica. No cório (**co**) a marcação também é fraca e de cor esverdeada, devido à metacromasia do azul de toluidina. **D-F)** Técnica xylidine ponceau. Reação fortemente positiva à técnica é observada em grânulos de ovócitos (**ovo IV**) em estágio avançado, como também no nucléolo (**nu**) de ovócitos jovens (**ovo II**). Em regiões citoplasmáticas (**seta**) de células do epitélio (**ep**) a reação é moderadamente positiva. No cório (**co**) não há reação positiva, assim como não há reação em ovócitos em reabsorção (**ovr**). **G e H)** Técnica do picrossirus red. É observada reação positiva na lâmina basal (**lb**) do epitélio (**ep**) e ao redor do pedicelo (**pe**). Os nucléolos (**seta**) das células do epitélio são marcados fortemente enquanto que os (**seta**) das células do pedicelo (**pe**) são marcados moderadamente. Barras = 50µm.

n= núcleo.

ep= epitélio.

pe= pedicelo.

ovo II= ovócito II.

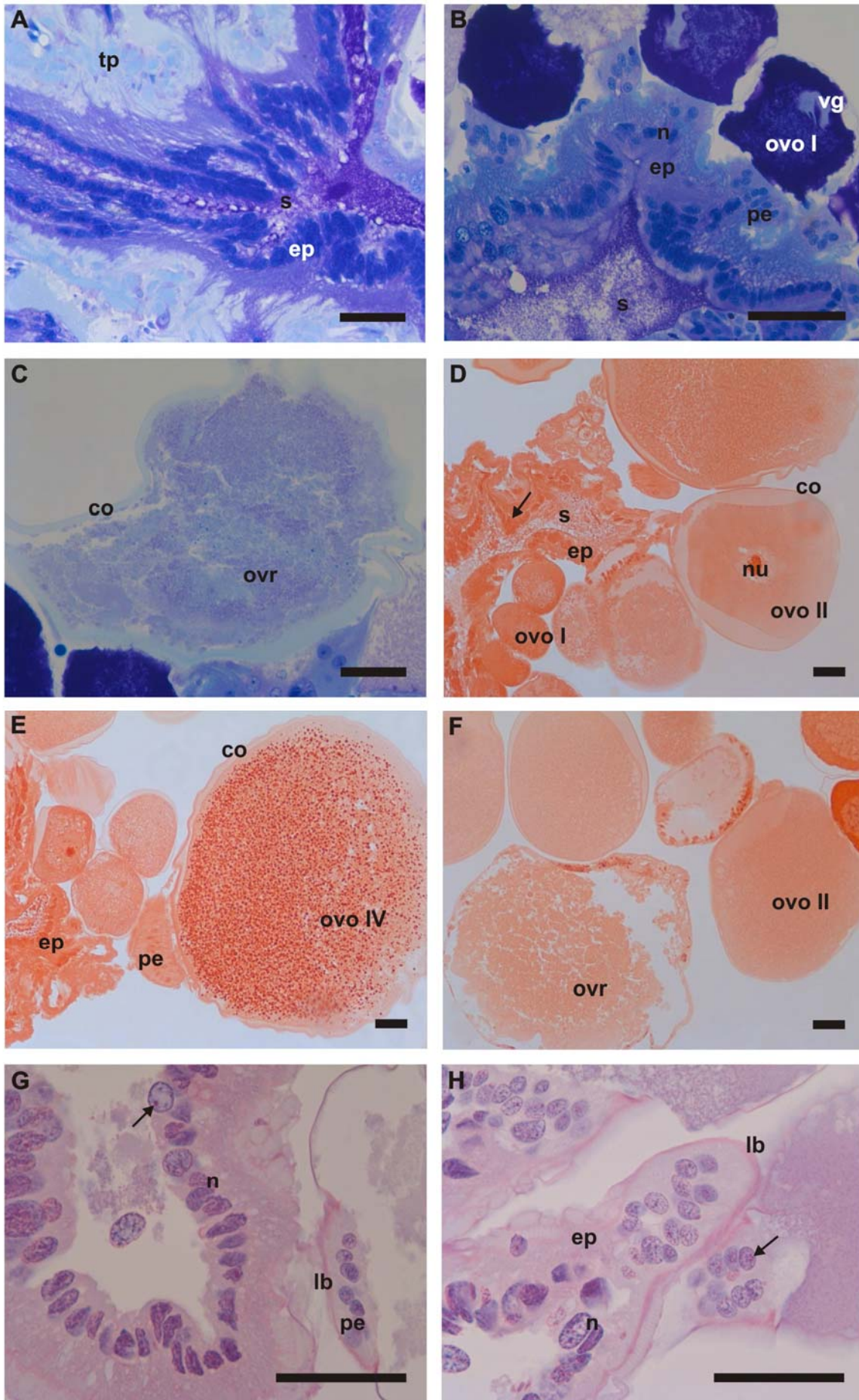


Figura 33- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Células do corpo gorduroso (**cg**) com acúmulo de lipídeos (**l**) e vesículas (**ve**) eletrôn-densas. Barra= 10µm. **B)** Detalhe do corpo gorduroso mostrando as invaginações (**in**) da membrana basal. Barra= 10µm. **C)** Detalhe do citoplasma de células do corpo gorduroso com muito retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e mitocôndrias (**mi**). Barra= 1µm. **D)** Detalhe das invaginações (**in**) da membrana plasmática basal e lâmina basal. (**lb**). Barra= 2µm. **E)** Corpo gorduroso (**cg**) próximo à transição para o epitélio (**ep**) ventricular. Barra= 3µm. **F)** Região de transição do corpo gorduroso (**cg**) para o epitélio (**ep**), com a lâmina basal (**lb**) espessa e bastante eletrôn-densa. Abaixo da lâmina observa-se a musculatura (**mu**). No epitélio são evidentes as invaginações (**in**) da membrana plasmática basal. Barra= 2µm.

l= lipídeo.

n= núcleo.

ve= vesículas secretoras.

cg= corpo gorduroso.

mu= musculatura.

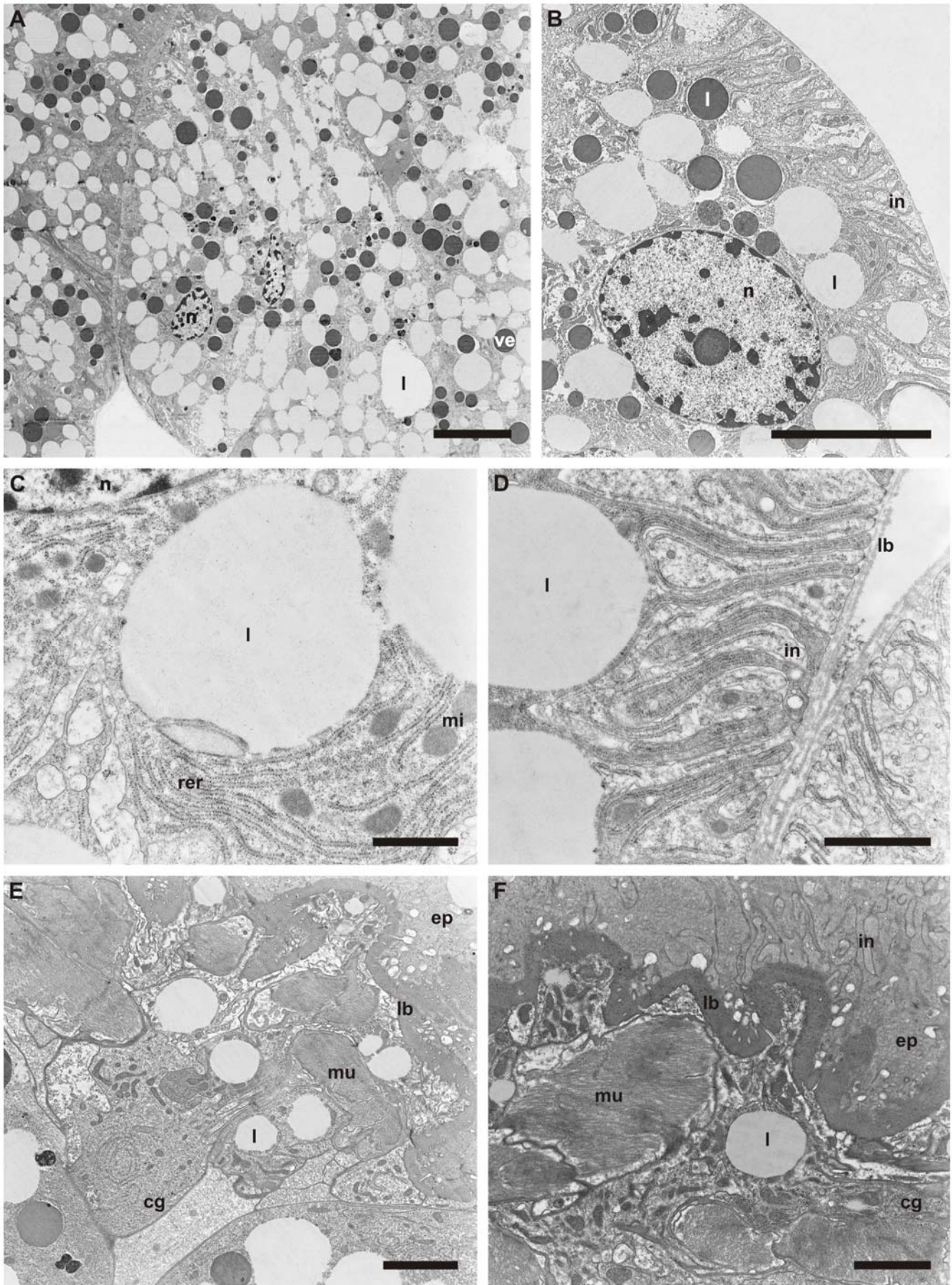


Figura 34- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo das fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A e B)** Detalhe da musculatura (**mu**) com muitas mitocôndrias (**mi**) e núcleo (**n**) alongado em volta do, epitélio. Barras= 1µm. **C)** Porção basal do epitélio (**ep**) com invaginações (**in**) da membrana basal. Barra= 1µm. **D)** Região basal do epitélio ventricular com células generativas (**cge**) e células excretoras (**ce**) com acúmulo de esferocristais (**ef**). Barra= 10µm. **E)** Detalhe do núcleo (**n**) de células excretoras (**ce**) rodeado de esferocristais (**ef**). Barra= 2µm. **F)** Células excretoras (**ce**) ao lado de células secretoras (**cs**) contendo vesículas (**ve**) eletrôn-densas. Barra= 4µm.

lb = lâmina basal.

nu= nucléolo.

ve= vesículas secretoras.

ef= esferocristais.

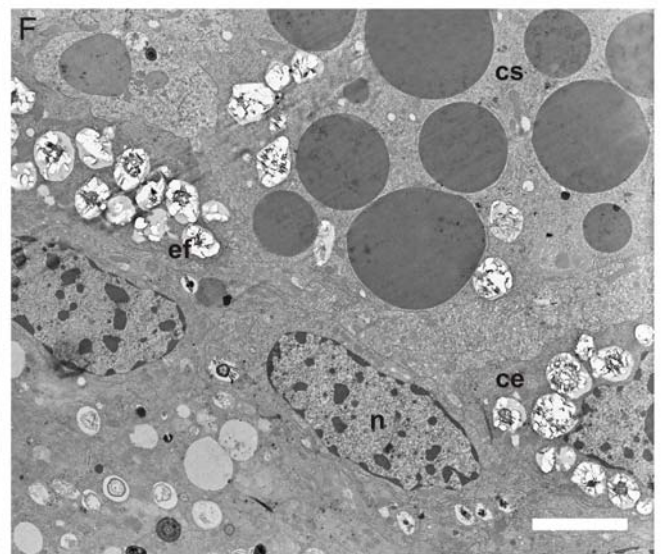
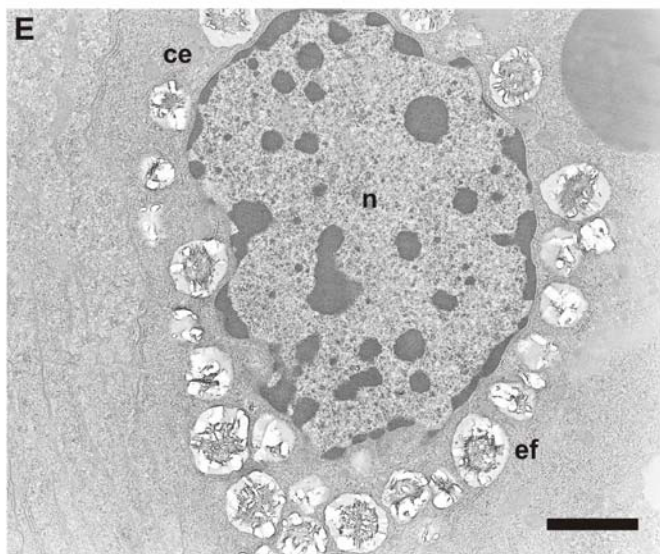
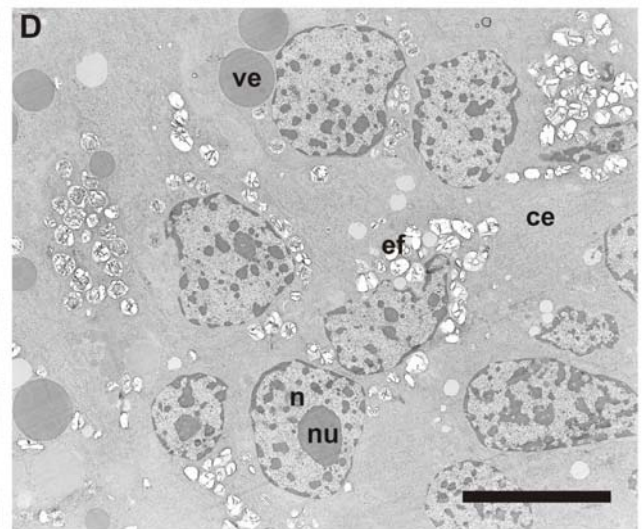
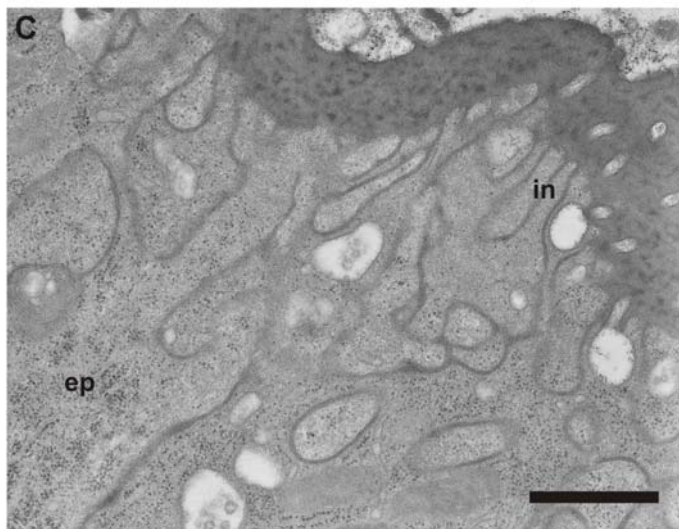
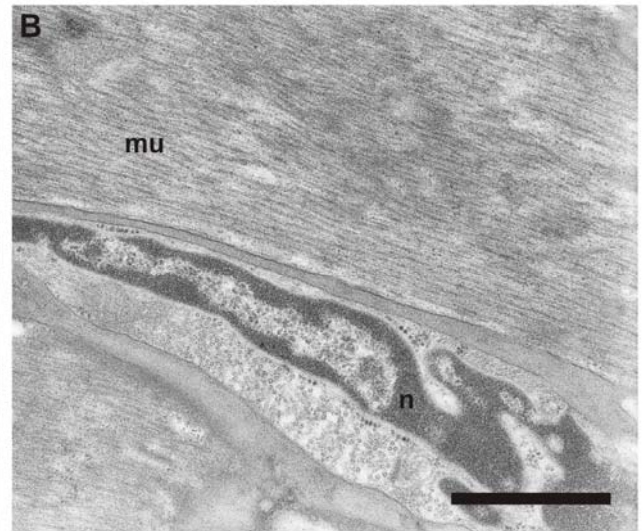
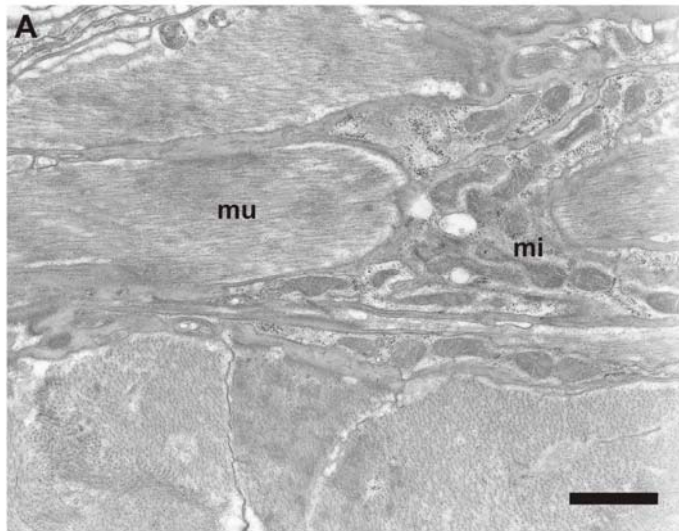


Figura 35- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo das fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Células epiteliais com retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e mitocôndrias (**mi**). Barra= 1µm. **B)** Contato entre duas células epiteliais ambas com sistema de túbulos (**st**). Barra= 1µm. **C)** Célula digestiva (**cd**) contendo vacúolos (**va**) e muitos grânulos (**gr**) centralmente eletrondensos. Barra= 2µm. **D)** Células epiteliais com ápices abaulados onde se observa células digestivas (**cd**) grânulos (**gr**) vacúolos digestivos (**va**) e células secretoras (**cs**) com vesículas eletrondensas. Barra= 4µm. **E e F)** Detalhe da região do lúmen (**lu**) do ventrículo mostrando microvilosidades (**mv**) das células epiteliais e o glicocálice (**gli**) por entre elas. Barra= 1µm.

ep= epitélio.

mv= microvilosidades.

gr= grânulos.

lu= lúmen.

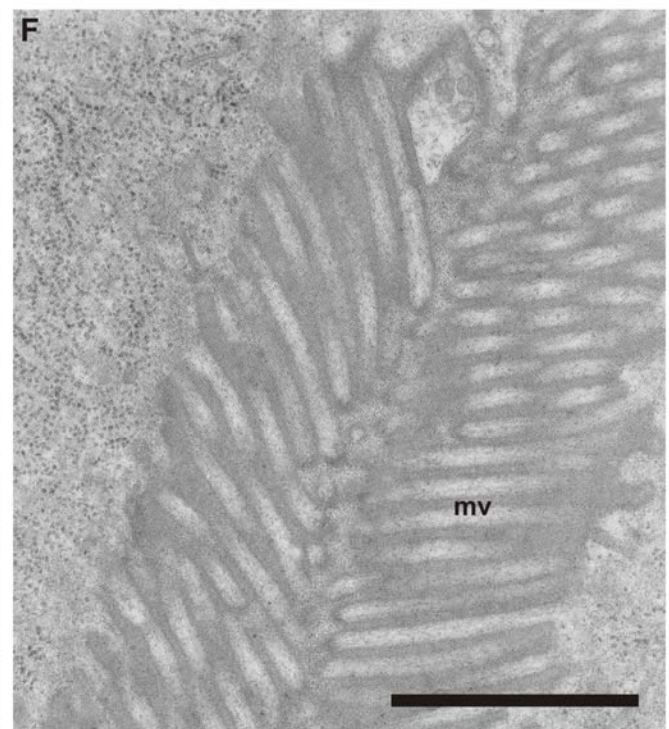
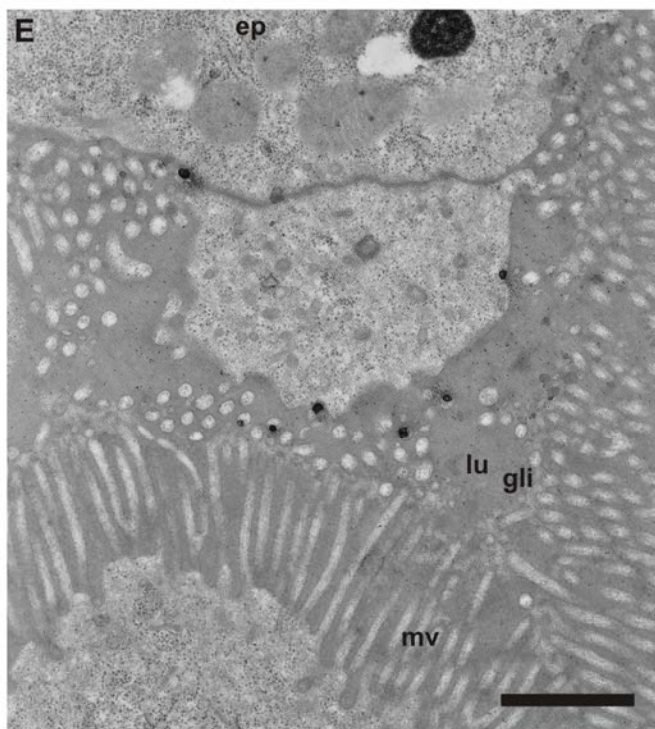
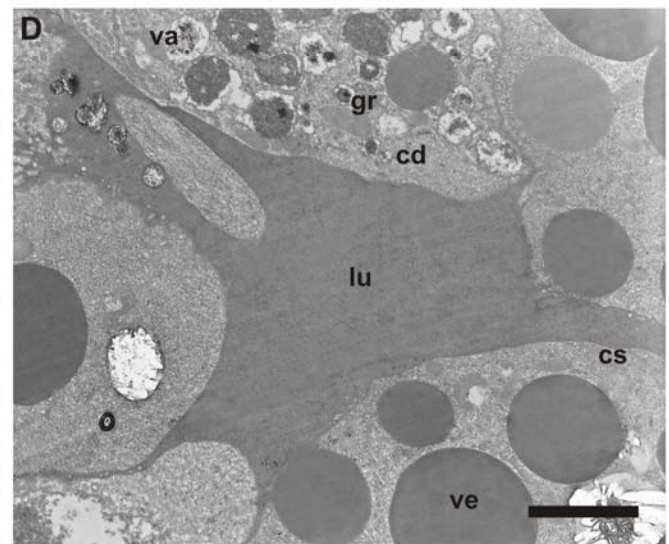
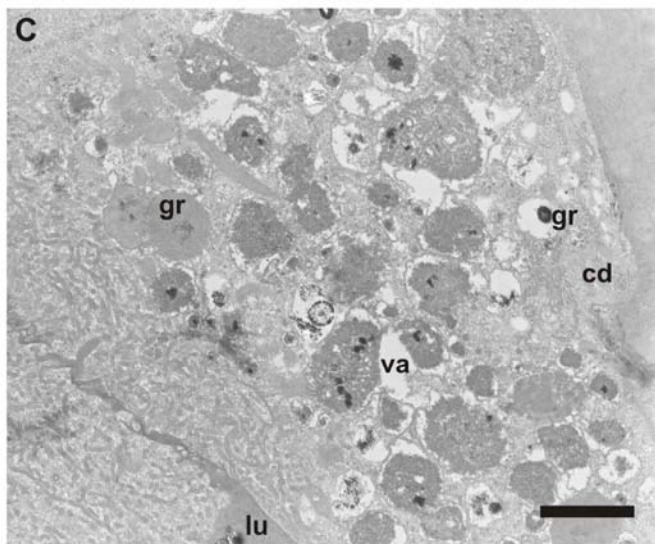
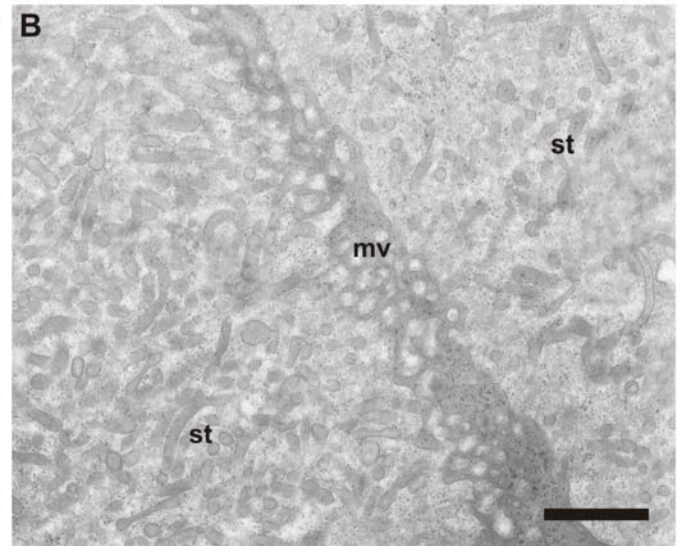
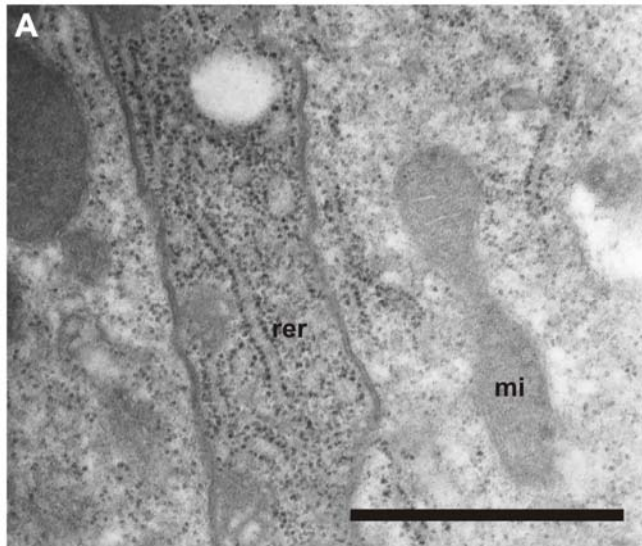


Figura 36- Micrografias eletrônicas de transmissão do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Ovócitos (**ovo**) na porção externa do ovário. Barra= 10µm. **B)** Região do pedicelo (**pe**) com ovócito (**ovo**) aderido e com células contendo citoplasma (**c**) pouco elétron-denso. Observam-se microvilosidades (**mv**) na região de contato entre pedicelo e ovócito. Barra= 1 µm. **C)** Células do pedicelo (**pe**) com núcleos (**n**), recobertas por lâmina basal (**lb**). Barra= 6µm. **D)** Detalhe da região de contato entre ovócito (**ovo**) e pedicelo (**pe**), onde observam-se microvilosidades (**mv**). Barra= 0.5 µm. **E)** Região externa ao ovário com ovócito (**ovo**) projetando-se para o exterior recoberto pelo cório e membranas (**m**). Barra= 2µm. **F)** Detalhe da vesícula germinativa (**vg**) do ovócito. Barra= 2µm. **G)** e **H)** Detalhe de células do pedicelo (**pe**) com núcleos (**n**) eletron-lúcidos e muitas interdigitações (**it**) da membrana plasmática (**mp**). Circundando o pedicelo (**pe**) observa-se musculatura (**mu**). Barras= 1µm e 3µm, respectivamente.

n= núcleo.

mi= mitocôndria.

vg= vesícula germinativa.

pe= pedicelo.

co= cório.

nu= nucléolo

c= citoplasma

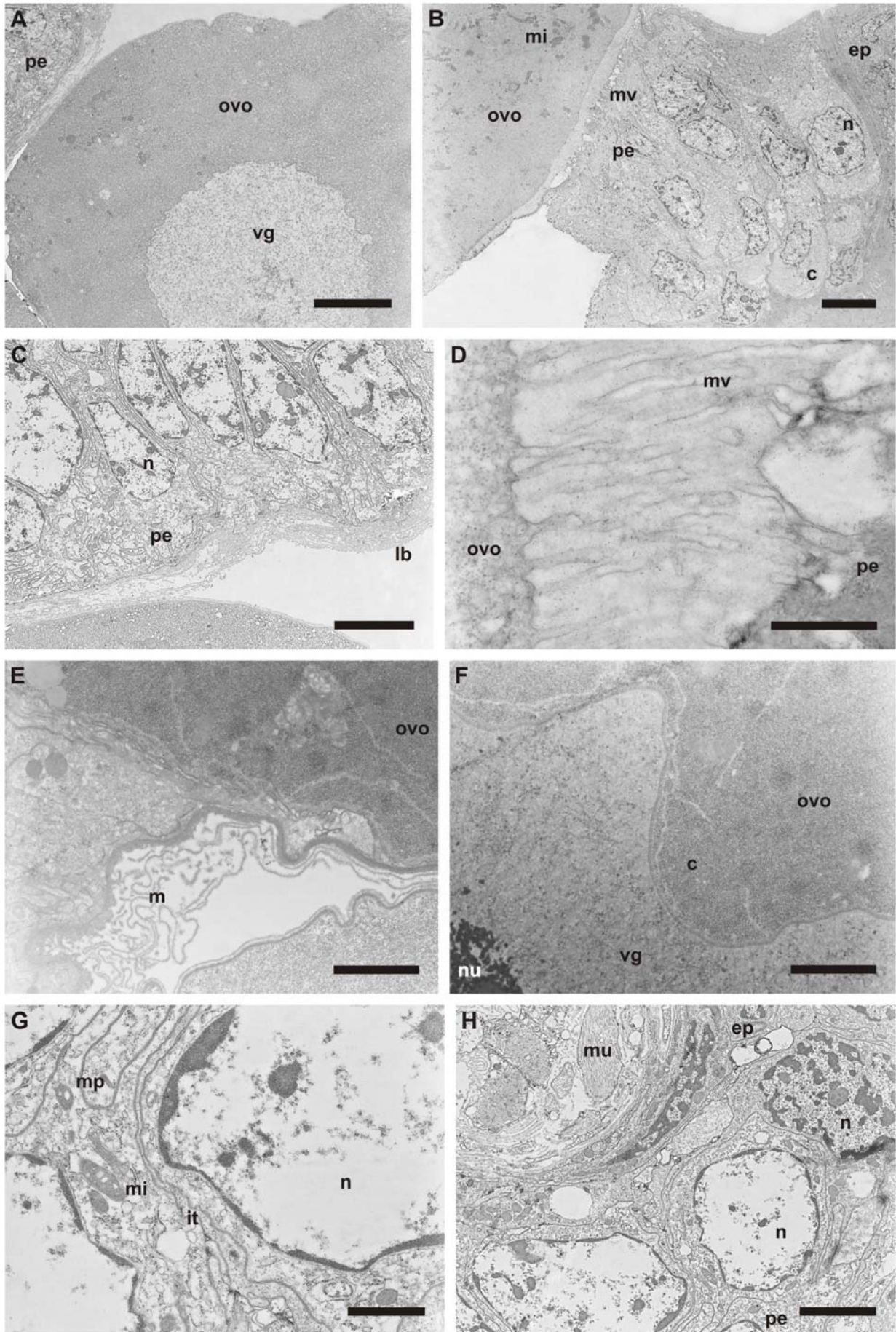


Figura 37- Micrografias eletrônicas de transmissão do ovário de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A)** Epitélio (**ep**) eletrôn-denso com grandes núcleos (**n**) com cromatina condensada. Barra= 3 μ m. **B)** Citoplasma de células do epitélio (**ep**) com muitas mitocôndrias (**mi**), glicogênio α (**gl α**) e β (**gl β**) e interdigitações (**it**) das membranas laterais. Barra= 0,25 μ m. **C)** Observa-se nas células do epitélio mitocôndrias com cristas vesiculares (**miv**). **D)** Observa-se nas células epiteliais grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e ribossomos livres (**rl**). **E)** Citoplasma de células epiteliais com a presença de figuras mielínicas (**fm**). **F e G)** Porção apical das células epiteliais com microvilosidades (**mv**) e secreção (**s**) eletrôn-densa. **C - G)** Barras = 1 μ m

ep= epitélio.

mp= membrana plasmática.

mi= mitocôndria.

lu= lúmen.

n= núcleo.

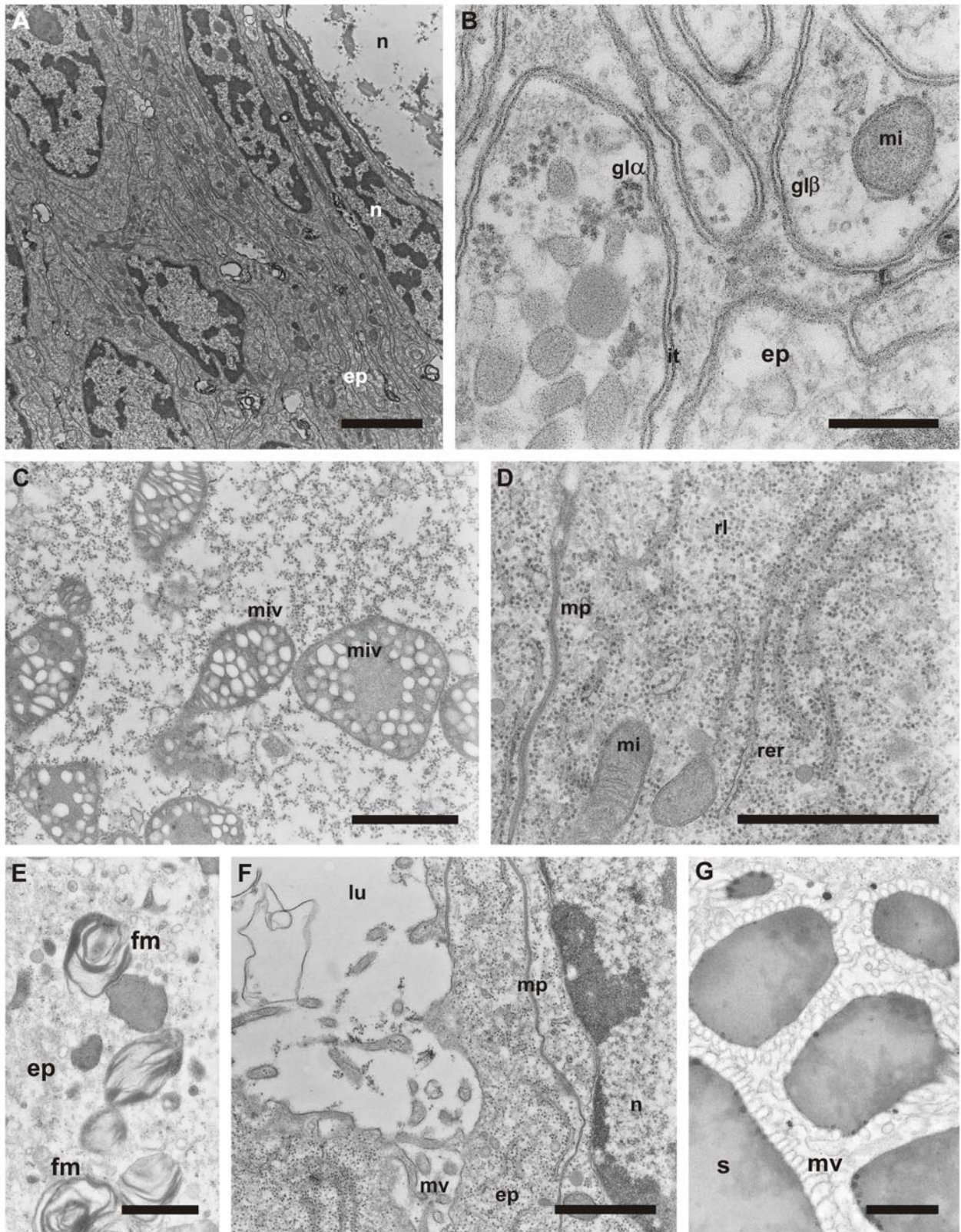


Figura 38- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Células do corpo gorduroso (**cg**) com acúmulo de lipídeos (**l**). Barra= 20µm. **B)** Detalhe de células do corpo gorduroso mostrando o grande núcleo (**n**) e nucléolo (**nu**) bem desenvolvido. Barra= 10µm. **C)** Detalhe de invaginações (**in**) da membrana basal (**lb**). Observa-se também a lâmina basal (**lb**). Estas células possuem muitas mitocôndrias (**mi**) e retículo endoplasmático rugoso (**rer**). Barra= 1µm. **D)** Detalhe de citoplasma com eletron-densidades distintas em células do corpo gorduroso (**cg**) que acumulam lipídeo (**l**). Barra= 2µm. **E)** Corpo gorduroso (**cg**) próximo à transição para o epitélio (**ep**) ventricular onde se observa a lâmina basal (**lb**) com invaginações. Barra= 1µm. **F)** Detalhe da região de transição do corpo gorduroso (**cg**) para o epitélio (**ep**), com a lâmina basal (**lb**) bastante eletron-densa. Abaixo da lâmina observa-se a musculatura (**mu**). Barra= 2µm.

l= lipídeo.

cg= corpo gorduroso.

rer= retículo endoplasmático.

n= núcleo.

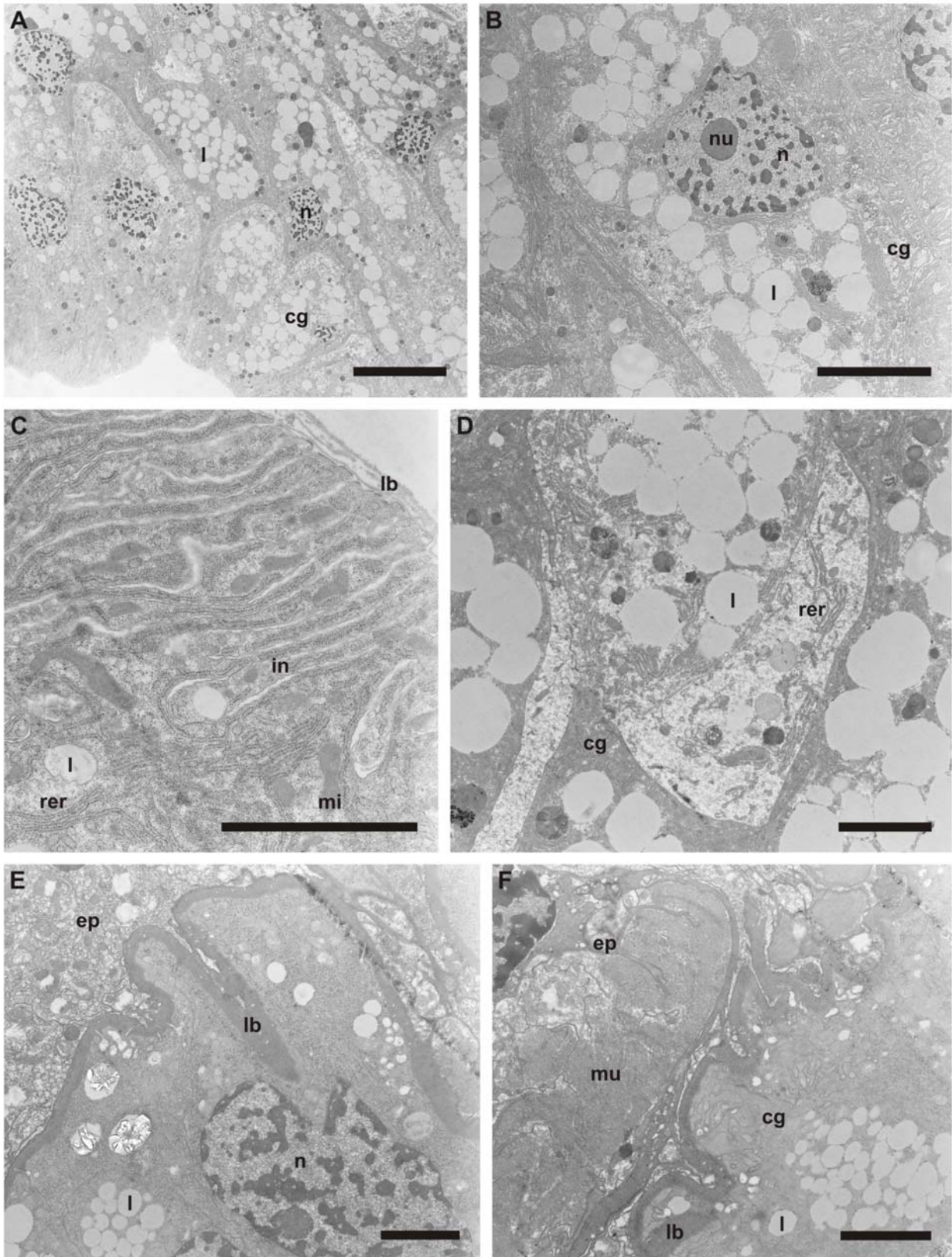


Figura 39- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Detalhe da musculatura (**mu**) em corte oblíquo abaixo do epitélio (**ep**). Barra= 1µm. **B)** Porção do corpo gorduroso (**cg**) onde é evidente acúmulo de lipídeo (**l**) e invaginações (**in**) da membrana. Barra= 2µm. **C)** Epitélio (**ep**) com células contendo esferocristais (**ef**). Barra= 10µm. **D)** Células excretoras (**ce**) com acúmulo de esferocristais (**ef**) e células generativas (**cg**). Barra= 10µm. **E)** Detalhe de células excretoras (**ce**) com vacúolos (**va**) e esferocristais (**ef**) ao lado de células secretoras (**cs**) com vesículas (**ve**) eletrodensas. Barra= 10µm. **F)** Células do epitélio com citoplasmas distintos, sendo que algumas células apresentam acúmulo de lipídeo (**l**) e retículo endoplasmático rugoso (**rer**) bem desenvolvido. Barra= 2µm.

lb= lâmina basal.

l= lipídeo.

ve= vesículas secretoras.

lu= lúmen.

n= núcleo.

mp= membrana plasmática.

ep= epitélio.

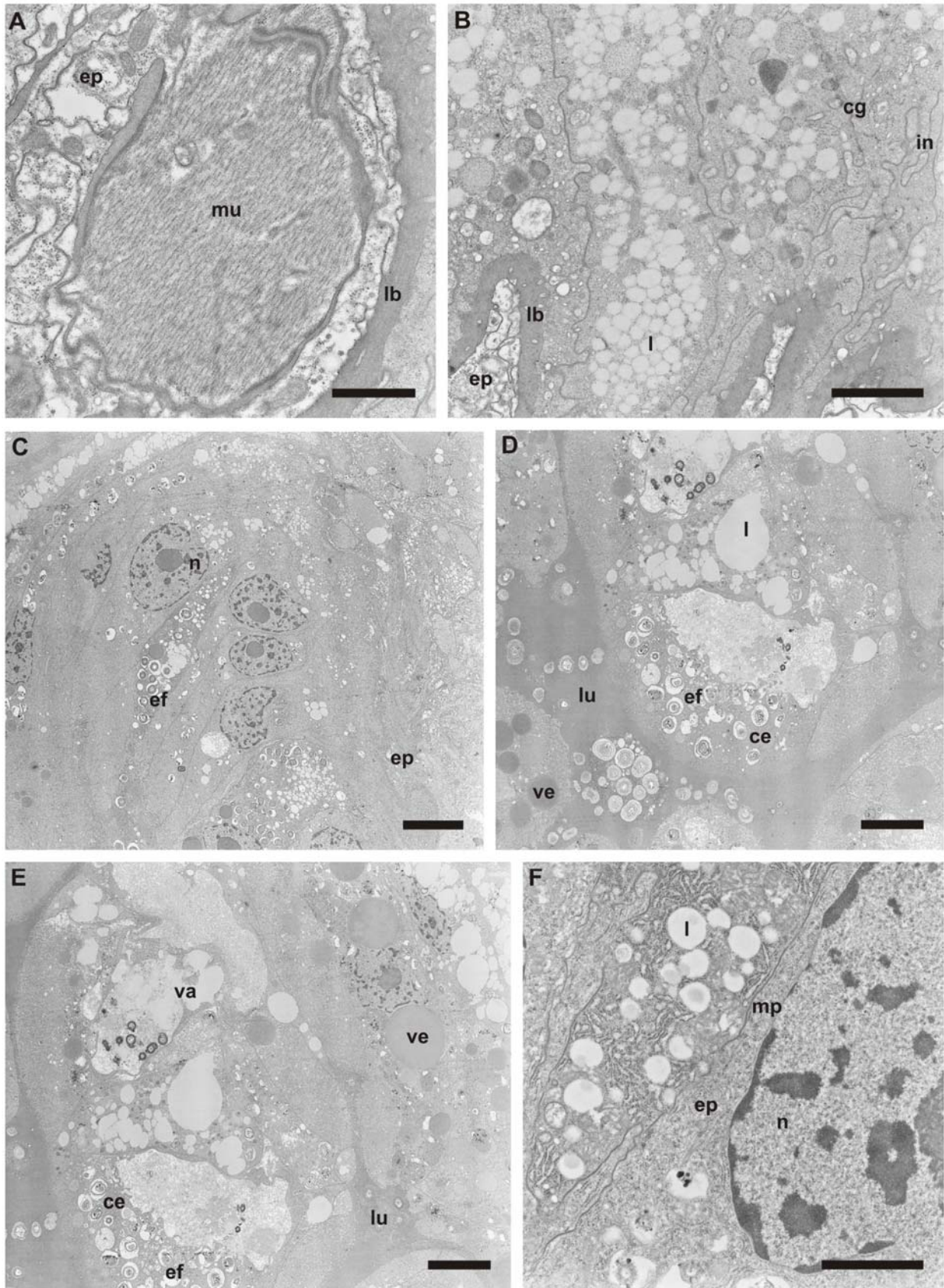


Figura 40- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Células epiteliais com muito retículo endoplasmático rugoso (**rer**), ao redor das vesículas (**ve**) e gotas de lipídeo (**l**). Barra= 2µm. **B)** Detalhe de vacúolos (**va**) contendo material eletrôn-denso típicos de células digestivas (**cd**) e grânulos centralmente eletrôn-denso. **C)** Célula digestiva (**cd**) com esferocristais (**ef**) de eletrôn-densidades variadas. **D)** Ápice de células epiteliais com microvilosidades (**mv**). **E)** Detalhe lúmen (**lu**) do ventrículo contendo esferocristais (**ef**). Barra= 2µm. **B-D)** Barras= 1µm.

ep= epitélio.

rer= retículo endoplasmático.

mi= mitocôndria.

mv= microvilosidades.

lu= lúmen.

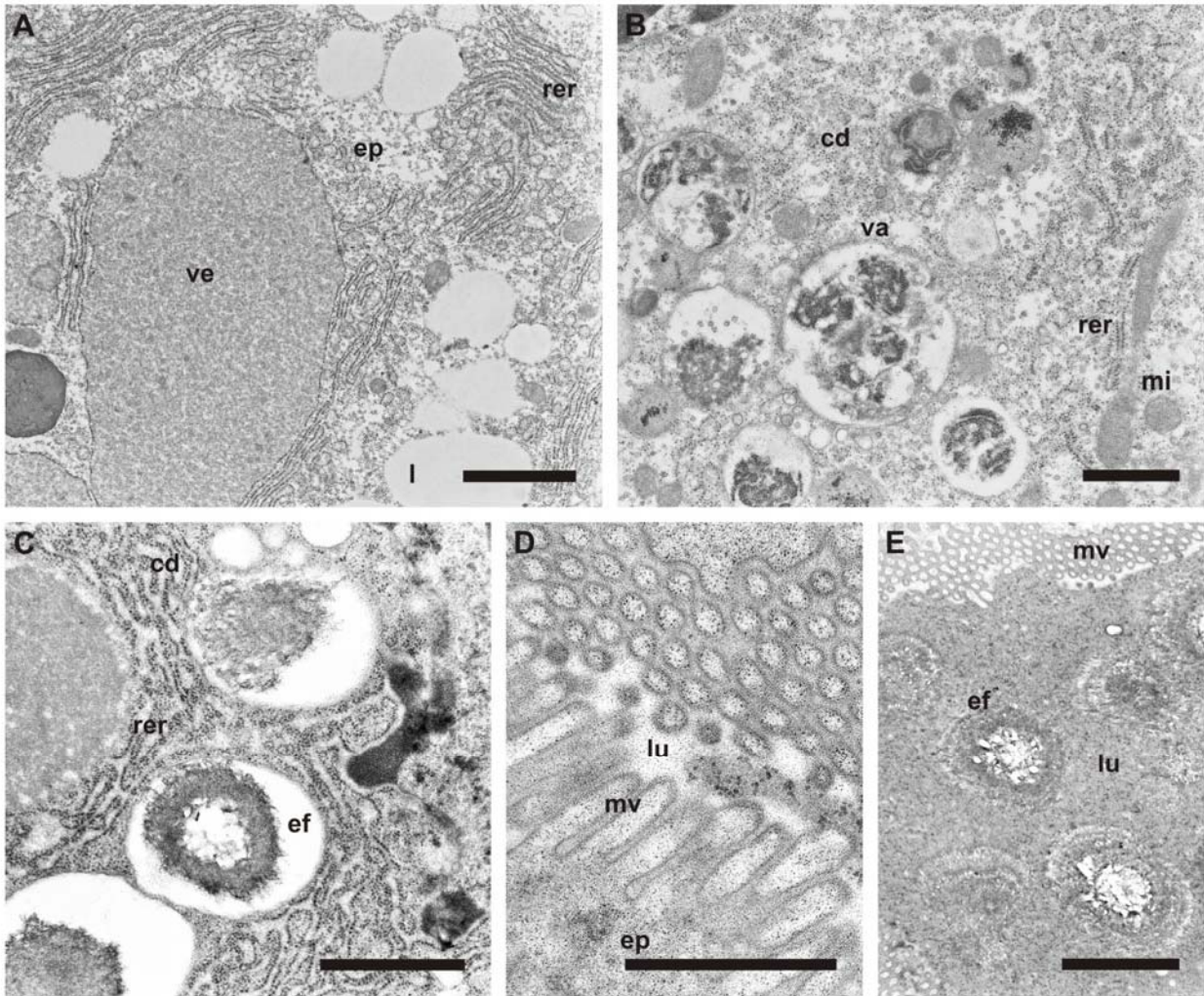


Figura 41- Micrografias eletrônicas de transmissão do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** na porção externa do ovário observam-se ovócitos (**ovo**) conectados ao pedicelo (**pe**), que se caracteriza pela grande quantidade de células próximas. Barra= 2µm. **B)** Ovócitos (**ovo**) contendo alguns grânulos (**gr**) no citoplasma e delimitado pelo cório (**co**) e lâmina basal (**lb**). Barra= 10µm. **C)** Células do pedicelo (**pe**) com núcleos (**n**) grandes e interdigitações (**it**) da membrana. Barra= 4µm. **D)** Porção basal do epitélio (**ep**) circundado pela lâmina basal (**lb**) e musculatura (**mu**). As células contêm grânulos (**gr**) eletrondensos. No ovócito (**ovo**) observam-se grânulos eletrondensos. Barra= 3µm. **E)** Detalhe de grânulos (**gr**) de diferentes tamanhos presentes no citoplasma de células do epitélio (**ep**). Barra= 2µm. **F)** Detalhe da musculatura (**mu**) abaixo do epitélio. Barra= 1µm.

vg= vesícula germinativa.

pe= pedicelo.

co= cório.

mi= mitocôndria.

lb= lâmina basal.

ep= epitélio.

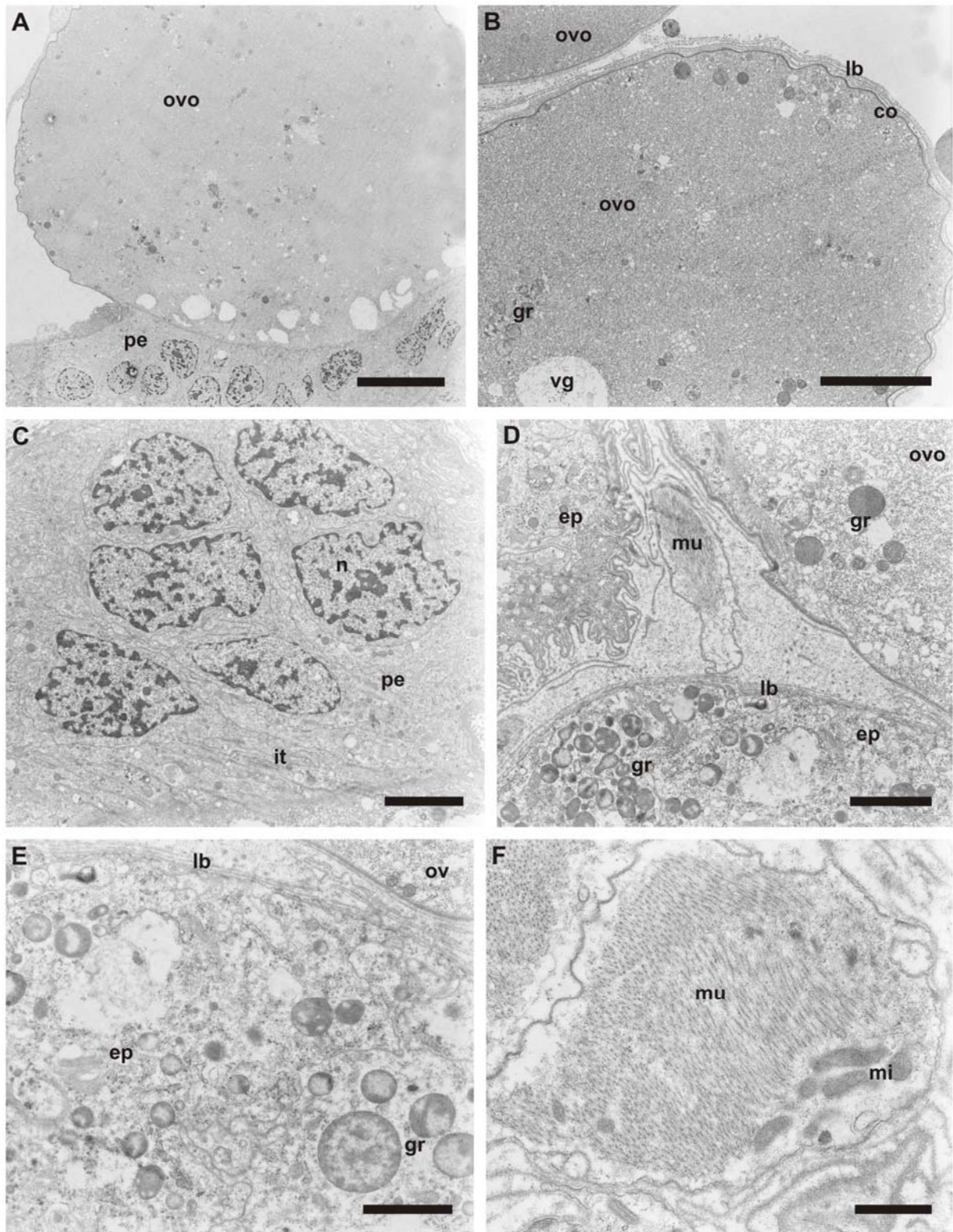


Figura 42- Micrografias eletrônicas de transmissão do ovário de *Acutisoma longipes*, com ovos maduros. **A)** Epitélio (**ep**) eletrôn-denso com grandes núcleos (**n**) com cromatina condensada e nucléolo (**nu**) desenvolvido. Barra= 3µm. **B)** Células do epitélio (**ep**) com muitas interdigitações (**it**) da membrana plasmática. Barra= 2µm. **C)** Detalhe interdigitações (**it**) da membrana plasmática (**mp**). Barra= 1µm. **D)** Células epiteliais com retículo endoplasmático rugoso (**rer**) e Golgi (**G**) com vesículas (**ve**) eletrôn-densas na face trans. Barra= 1µm. **E)** No epitélio são vistos retículos endoplasmáticos rugosos (**rer**) organizados de forma circular. Barra= 1µm. **F)** Porção apical das células epiteliais do ovário com microvilosidades dilatadas contendo secreção (**s**) eletrôn-densa. Barra= 1µm. **G)** Detalhe da secreção (**s**) “envolvida” por microvilosidades (**mv**) no lúmen (**lu**) do ovário. Barra= 1µm. **H)** Lúmen (**lu**) do ovário com ovócito (**ovo**) alongados. Barra= 10µm.

lu= lúmen.

n= núcleo.

l= lipídeo.

vg= vesícula germinativa.

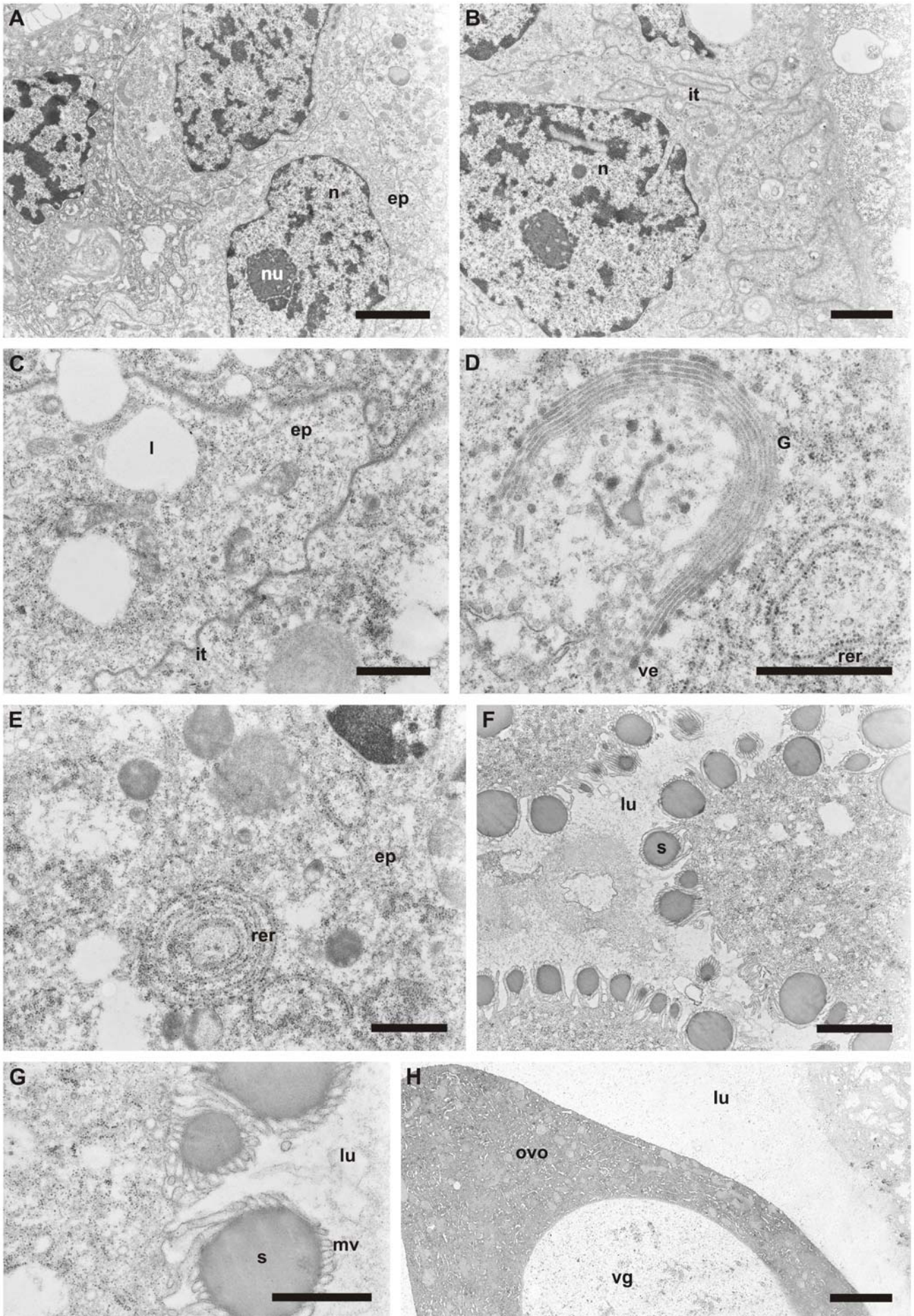


Figura 43- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole. **A)** Células do corpo gorduroso (**cg**) com acúmulo de lipídeos (**l**). Núcleos (**n**) esféricos e nucléolo (**nu**) desenvolvido. Barra= 10µm. **B)** Detalhe de células do corpo gorduroso com regiões vacuolizadas (**ava**) e vesículas eletrôn-densas. Barra= 4µm. **C)** Epitélio basal com células generativas (**cg**) e células contendo vesículas (**ve**) eletrôn-densas. Observa-se a lâmina basal (**lb**) formando dobras. Barra= 10µm. **D)** Porção basal do epitélio com células generativas (**cg**) e logo abaixo observa-se a musculatura (**mu**) e entre elas a lâmina basal (**lb**). Barra= 10µm. **E)** Detalhe da musculatura (**mu**) abaixo do epitélio (**ep**). Barra= 4µm. **F)** Detalhe da porção basal do epitélio (**ep**) com dobras da lâmina basal (**lb**) muito eletrôn-densa e invaginações (**in**) da membrana basal das células epiteliais. Barra= 2µm.

l= lipídeo.

cg= corpo gorduroso.

rer= retículo endoplasmático.

n= núcleo.

cg= células generativas.

lb= lâmina basal.

cge= célula generativa.

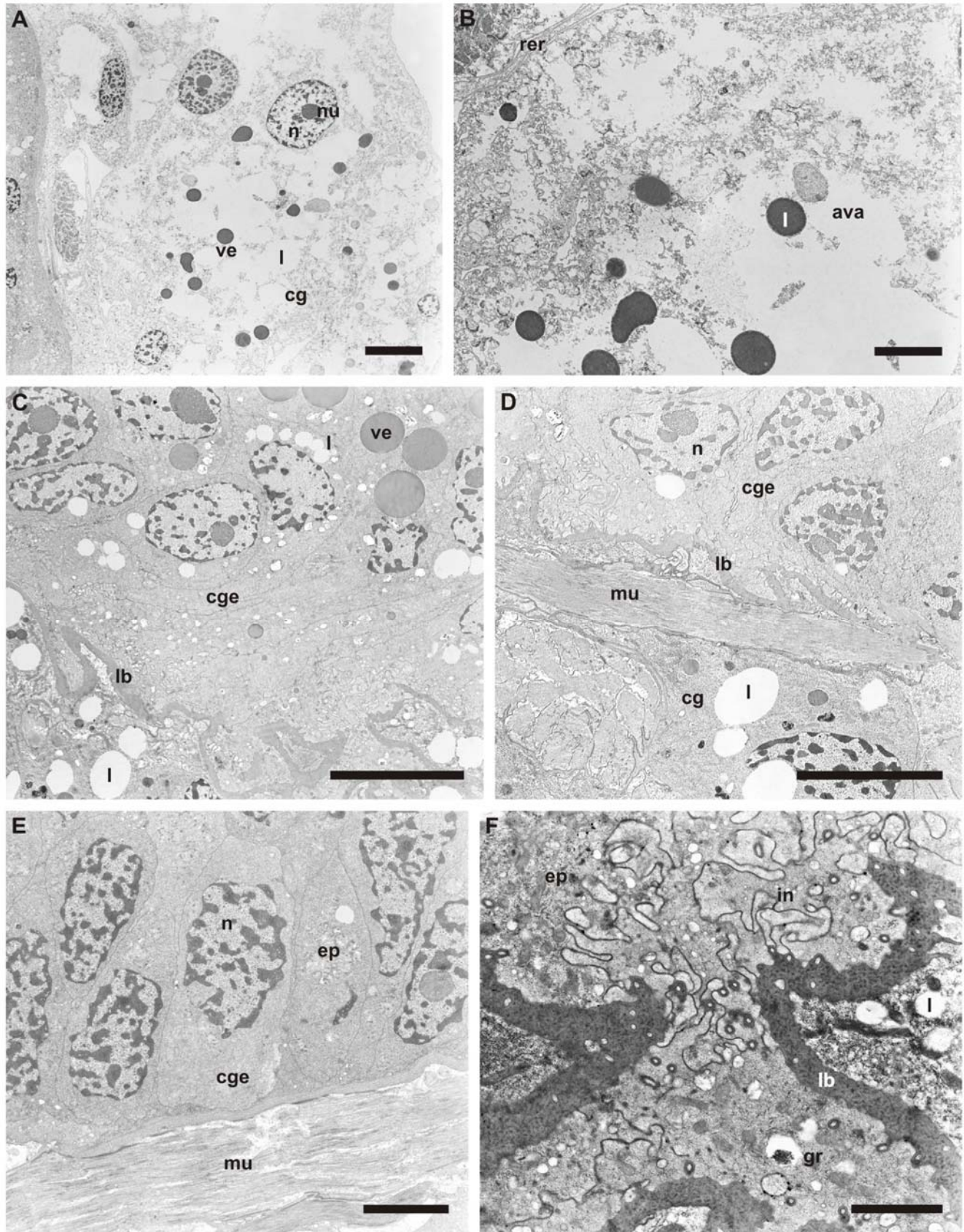


Figura 44- Micrografias eletrônicas de transmissão do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, cuidando da prole. **A)** Detalhe do epitélio (**ep**) com células apresentando pequenas interdigitações (**it**) pouco pronunciadas da membrana plasmática (**mp**). Barra= 2µm. **B)** Células excretoras (**ce**) do epitélio com acúmulo de esferocristais (**ef**). Barra= 2µm. **C)** Detalhe de retículo endoplasmático rugoso lamelar (**rerl**) das células de epitélio (**ep**). Barra= 1µm. **D)** detalhe de célula do epitélio (**ep**) com grandes vesículas (**ve**) envoltas por retículo endoplasmático rugoso (**rer**) ao lado de grandes vacúolos (**va**) contendo material de baixa eletrondensidade. Barra= 2µm. **E)** Detalhe de células do epitélio (**ep**) contendo vacúolos (**va**), figuras mielínicas (**fm**) e interdigitações (**it**) da membrana plasmática. Barra= 2µm. **F)** Citoplasma apical de células do epitélio (**ep**) apresentando além de Golgi (**G**) e mitocôndrias (**mi**), um sistema tubulovesicular (**st**). Barra= 1µm. **G)** Porção apical das células do epitélio (**ep**) com microvilosidades (**mv**) e o sistema túbulovesicular (**st**) no ápice dessas células. Barra= 1µm. **H)** Detalhe do sistema tubulovesicular (**st**). Barra= 1µm.

n= núcleo.

ef= esferocristais.

nu= nucléolo.

va= vacúolos.

mp= membrana plasmática.

lu= lúmen.

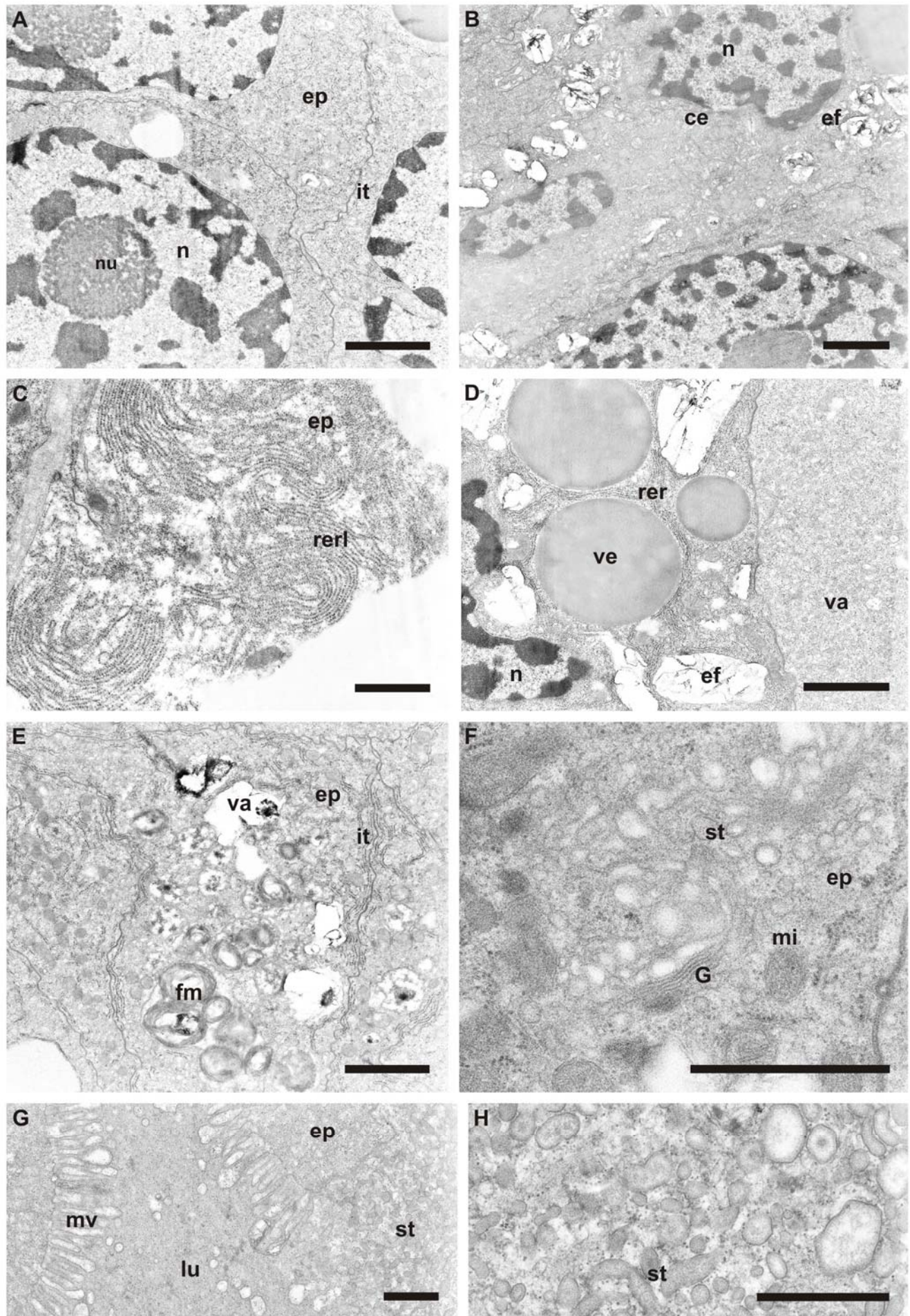


Figura 45- Micrografias eletrônicas de transmissão do ovário de *Acutisoma longipes* cuidando da prole. **A)** Detalhe de células do pedicelo (**pe**) evidenciando citoplasma pouco eletrondenso. Barra= 0.5µm. **B)** Células epiteliais (**ep**) do ovário com núcleos (**n**) contendo bastante material eletron-denso. No citoplasma são observadas áreas vacuolizadas (**ava**), assim como vacúolos (**va**) e grânulos (**gr**). Barra= 2µm. **C)** Epitélio (**ep**) com células apresentando grandes áreas vacuolizadas (**ava**) e microvilosidades (**mv**). Barra= 2µm. **D)** Ápice das células epiteliais (**ep**) com microvilosidades (**mv**) voltadas para o lúmen (**lu**). Barra= 0.5µm.

n= núcleo.

mp= membrana plasmática.

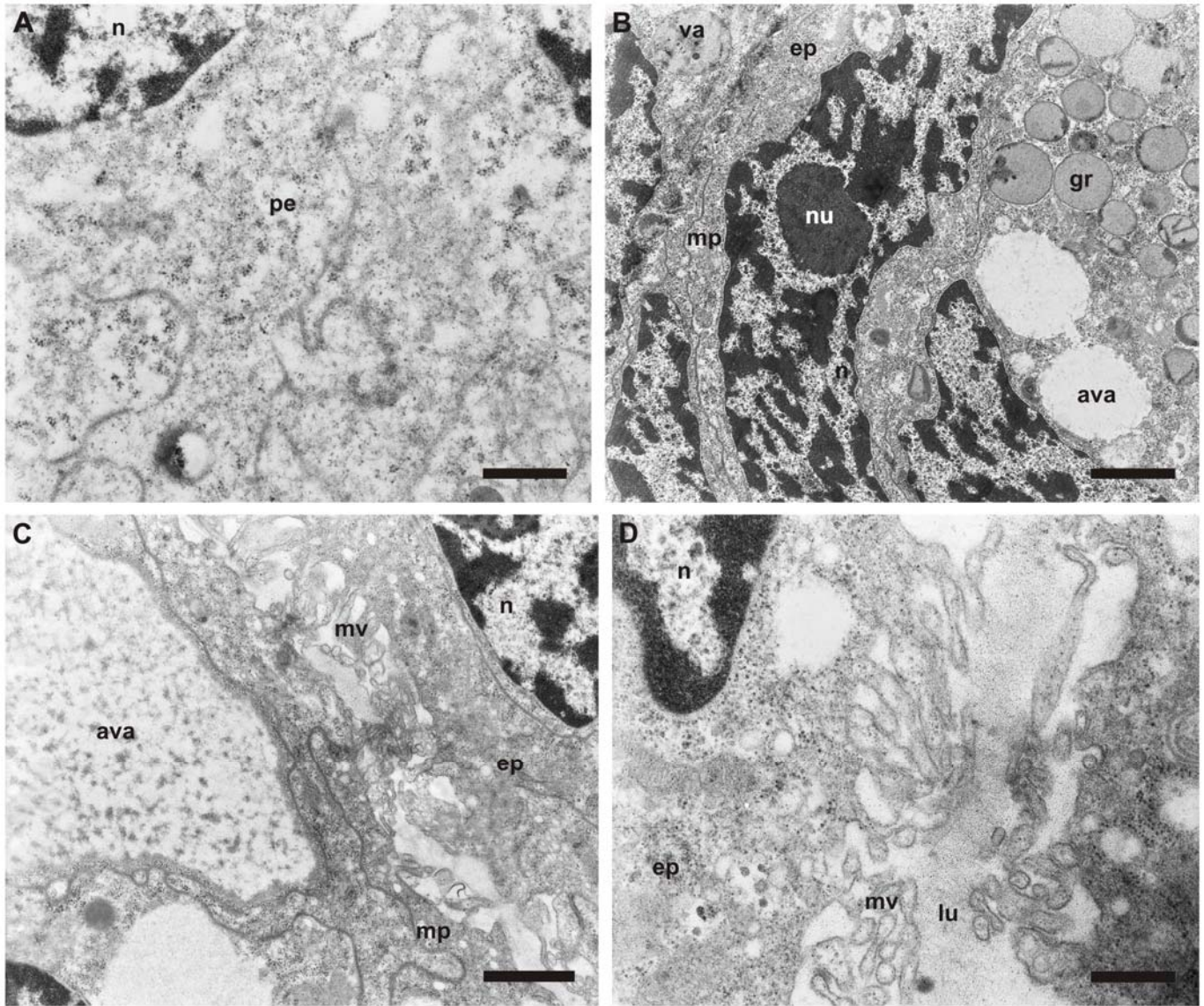


Figura 46- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes*, sem ovos maduros. **A-C)** Corpo gorduroso (**cg**) apresentando células com acúmulo de lipídeo (**l**). Barras= **A)** 3 μ m, **B)** 1 μ m e **C)** 0.5 μ m. **D)** Porção basal do epitélio (**ep**) onde se observa a lâmina basal (**lb**). Barra= 1 μ m. **E** e **F)** Epitélio (**ep**) ventricular com células distintas (**c1** e **c2**). Barras= 2 μ m. **A-F)** Tanto células do epitélio quanto do corpo gorduroso apresentaram reação negativa para glicogênio.

mv= microvilosidade.

nu= nucléolo.

n= núcleo.

l= lipídeo.

ef= esferocristais.

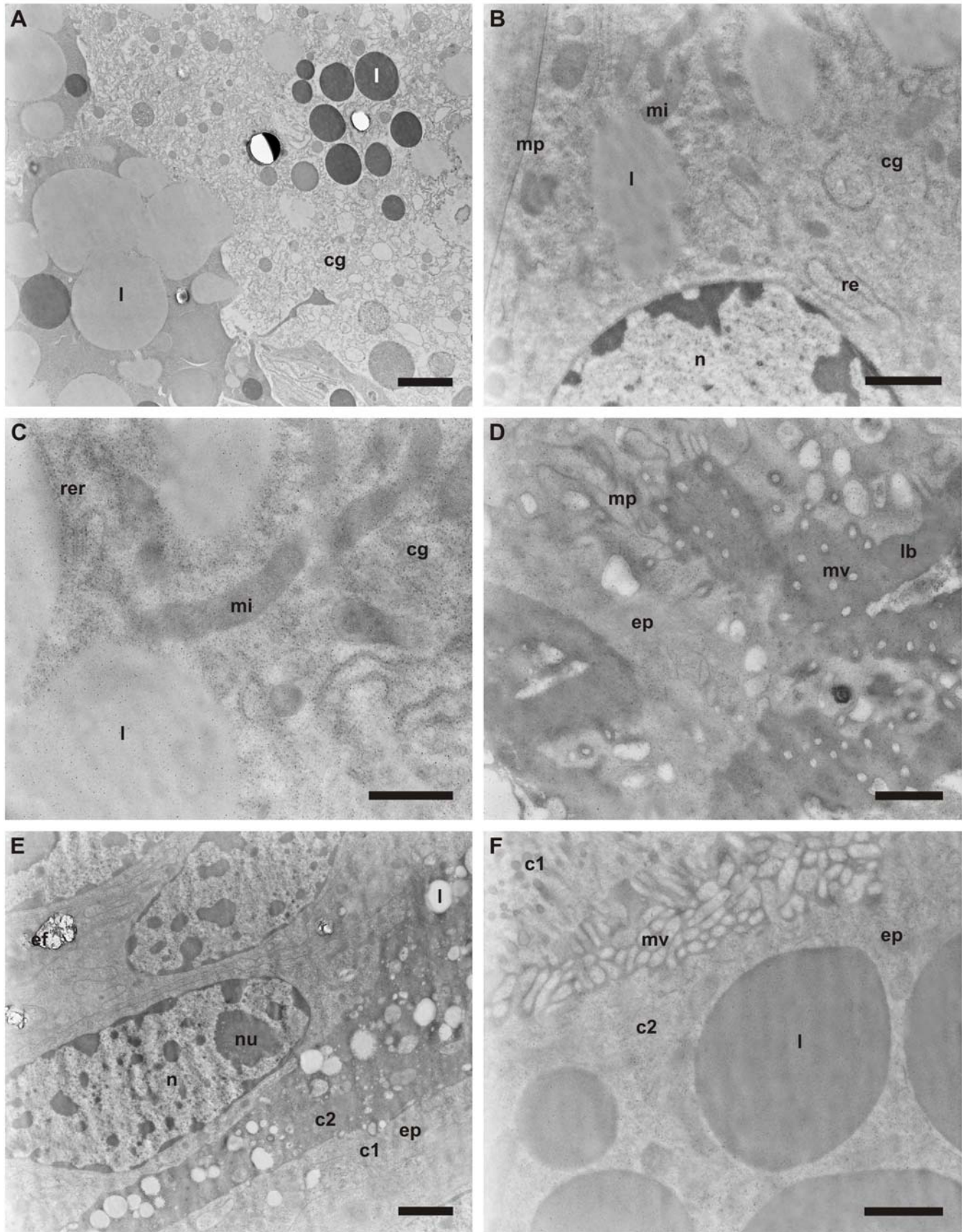


Figura 47- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ovário de *Acutisoma longipes* sem ovos maduros. **A)** Células do pedicelo (**pe**) com núcleos (**n**) grandes e interdigitações (**it**) da membrana plasmática. Barra= 2µm. **B)** Ovócito (**ovo**) com mitocôndrias (**mi**). Barra= 0.5µm. **C)** Porção basal da célula do epitélio do ovário, com a presença de musculatur (**mu**) abaixo do epitélio. Barra= 1µm. **D)** Detalhe do epitélio (**ep**) do ovário. Barra= 1µm. **A-D)** Tanto células do epitélio do ovário quanto os ovócitos apresentaram reação negativa para glicogênio.

pe= pedicelo.

mv= microvilosidade.

mi= mitocôndria.

n= núcleo.

It= interdigitações.

mu= musculatura.

mp= membrana plasmática.

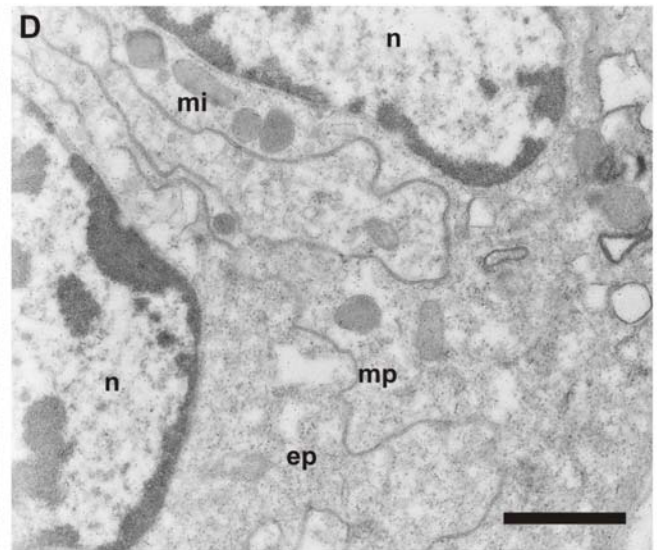
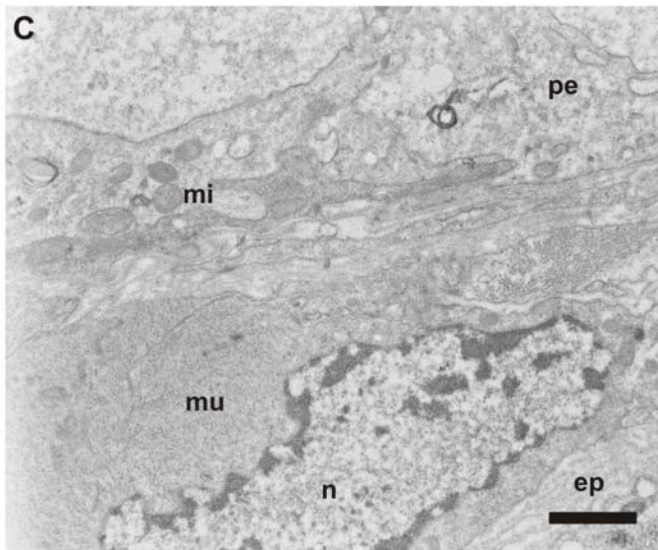
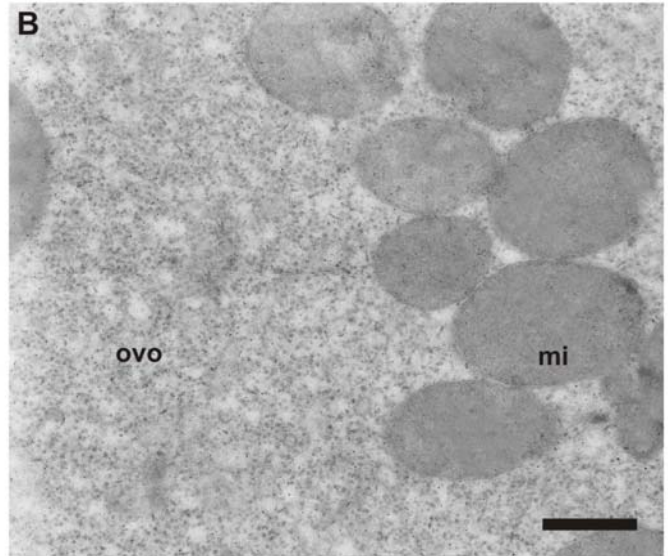
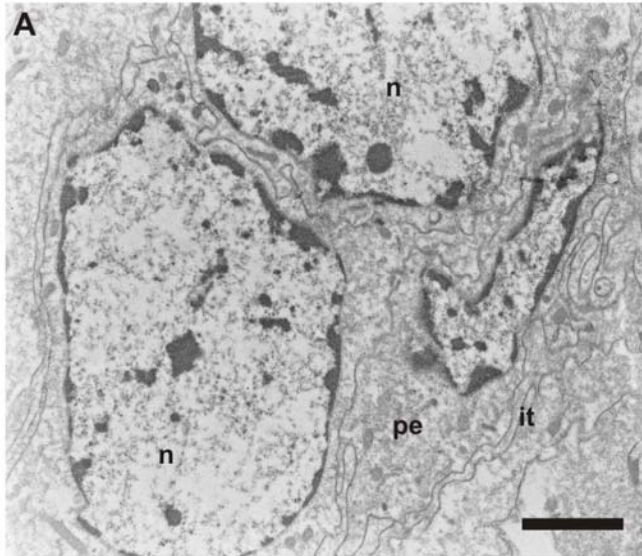


Figura 48- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ventrículo de fêmeas de *Acutisoma longipes* com ovos maduros. **A)** Corpo gorduroso (**cg**) com fraca marcação para glicogênio ao redor dos lipídeos (**l**). Barra= 0.5µm. **B-E)** Células do corpo gorduroso (**cg**) com reações fortemente positivas para glicogênio (**gl**) principalmente ao redor de vesículas lipídicas (**l**) e próximas à regiões ricas em retículo endoplasmático rugoso (**rer**). Barras= **B)** 0.5µm, **C)** 1µm, **D)** 0.5µm e **E)** 1µm. **F)** Detalhe de partículas de glicogênio (**gl**) próximas ao retículo endoplasmático rugoso (**rer**) em células do corpo gorduroso. Barra= 0.5µm. **G)** Epitélio (**ep**) ventricular contendo células (**c1** e **c2**) com citoplasmas com diferentes eletrondensidades. Tanto as células (**c2**) com acúmulo de esferocristais (**ef**) quanto as células (**c1**) com citoplasma menos eletrondenso não apresentam reação positiva para glicogênio. Barra= 2µm. **H)** Células apresentando diferentes eletrondensidades, (**c1-c4**), estando a célula 3 (**c3**) com citoplasma mais eletrondenso e com esferocristais. As células do epitélio do ventrículo apresentaram reação negativa para glicogênio. Barra= 1µm.

rer= retículo endoplasmático rugoso.

va= vacúolo.

mi= mitocôndria.

cg= corpo gorduroso.

vê= vesícula.

n= núcleo.

ef= esferocristais.

c2= célula 2.

c4= célula 4.

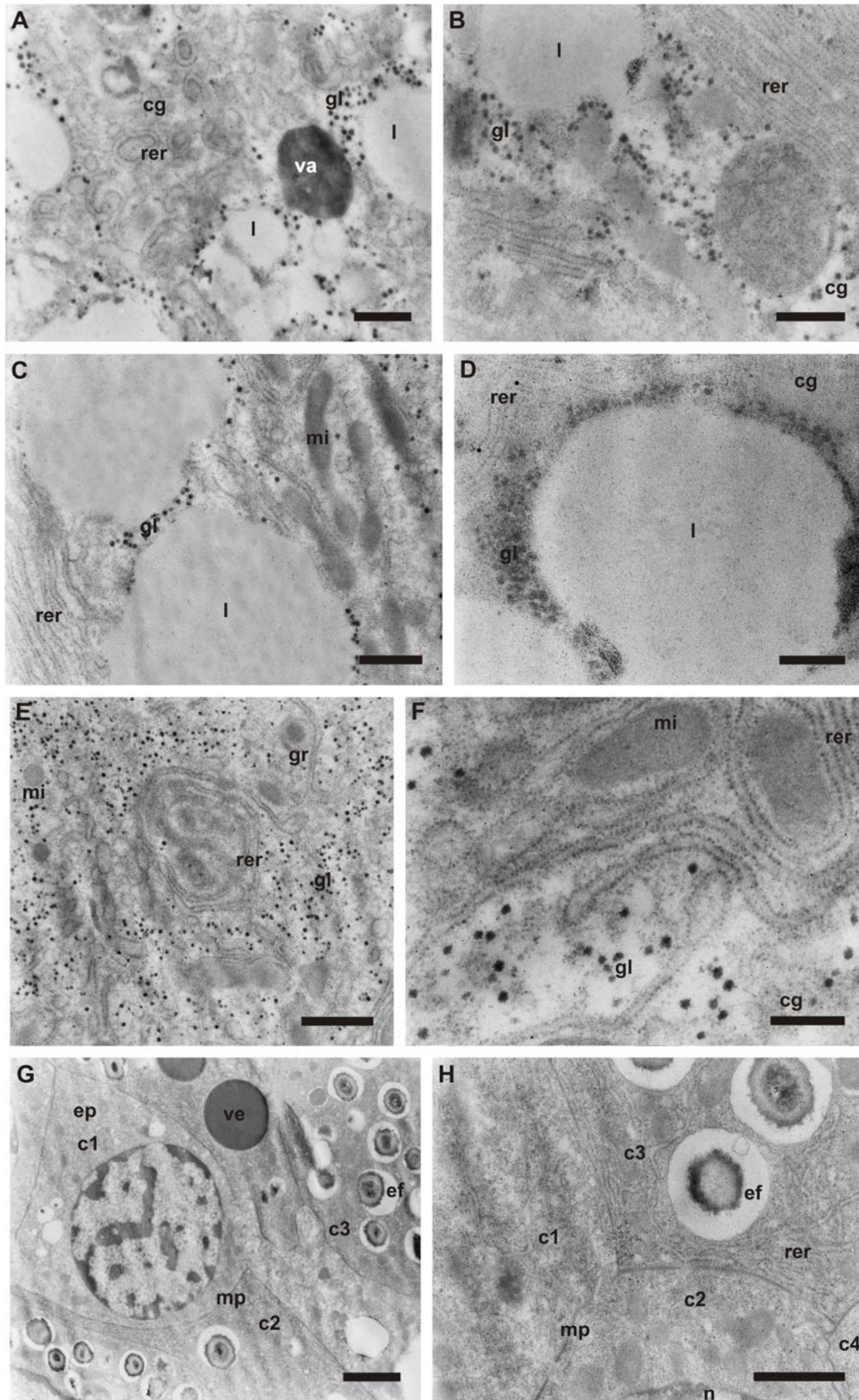


Figura 49- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ovário de *Acutisoma longipes* com ovos maduros. **A e B)** Região do pedicelo (**pe**) onde estão evidentes feixes musculares (**mu**). Barras= **A)** 4 μ m e **B)** 2 μ m. **C e D)** No epitélio (**ep**) ovariano observa-se células com acúmulo de grânulos (**gr**). Barras= **C)** 5 μ m e **D)** 0.5 μ m. **A e B)** As células do epitélio do ovário apresentaram reação negativa para glicogênio.

n= núcleo.

mp= membrana plasmática.

tp= túnica própria.

va= vacúolo.

G= Golgi.

it= interdigitações.

co= cório.

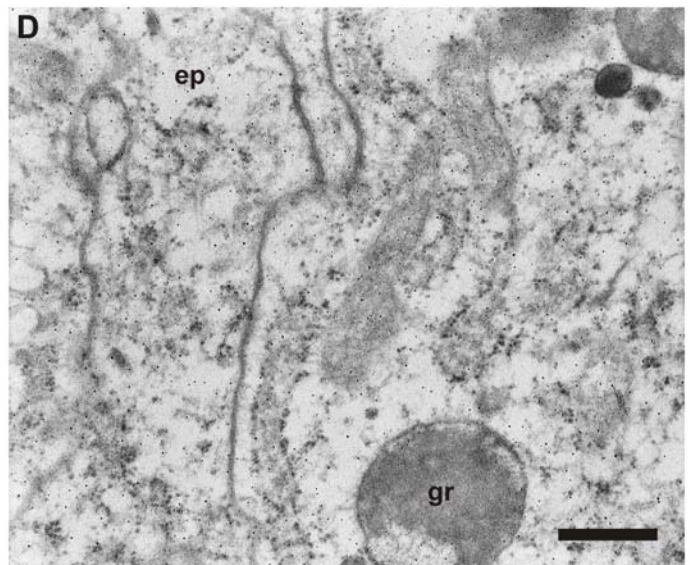
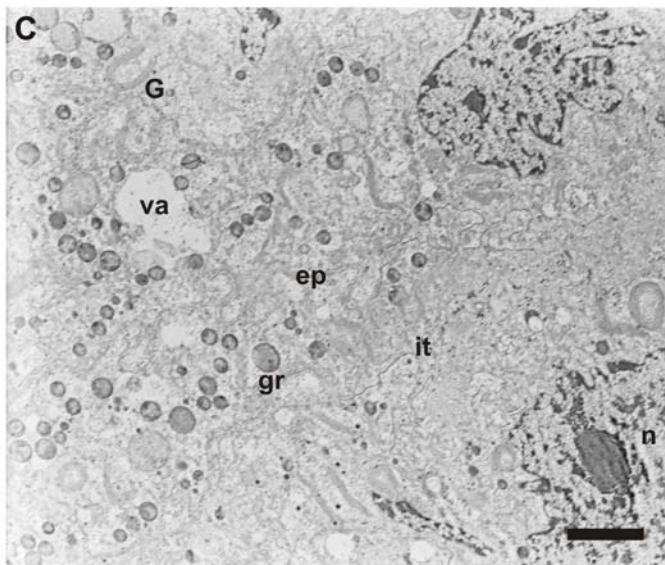
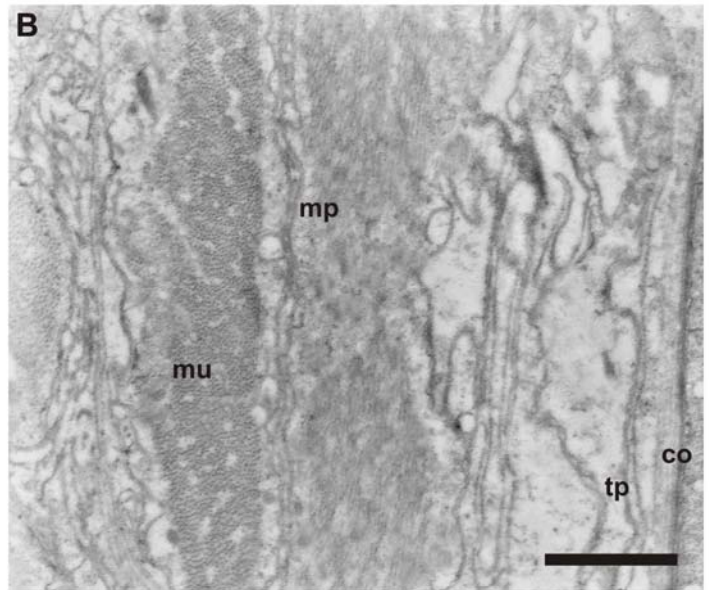
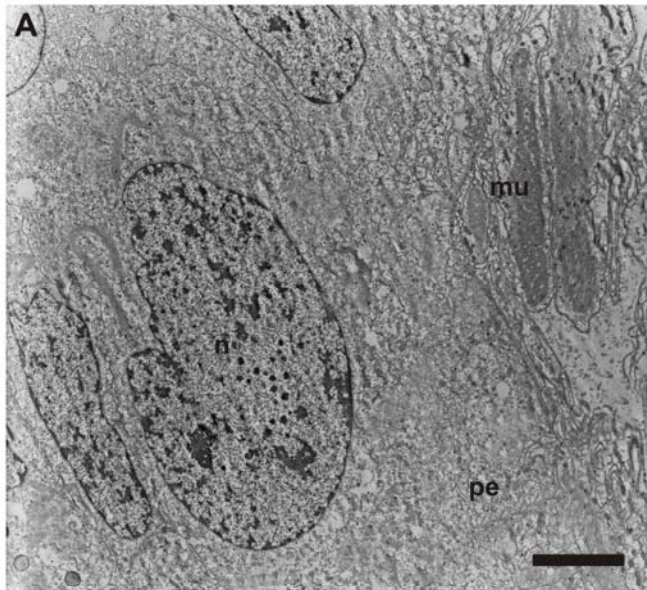


Figura 50- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ventrículo de *Acutisoma longipes* cuidando da prole. **A-B)** No corpo gorduroso (**cg**), onde é evidente o acúmulo de lipídeo (**l**), retículo endoplasmático rugoso (**rer**), mitocôndrias vesiculares (**miv**) ou não (**mi**). Barras= **A)** 2µm e **B)** 1µm. **C-E)** Epitélio (**ep**) ventricular no qual observa-se grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (**rer**), regiões de células com acúmulo de membranas (**mp**). Barras= **C)** 0.5µm, **D)** 2µm e **E)** 1µm. **F)** Células do epitélio (**ep**) onde observa-se vacúolos (**va**) e microvilosidades (**mv**). Barra= 0.5µm. **A-E)** Tanto as células do epitélio do ventrículo quanto as do corpo gorduroso não apresentaram reação positiva para glicogênio.

cg= corpo gorduroso.

n= núcleo.

nu= nucléolo.

mp= membrana plasmática.

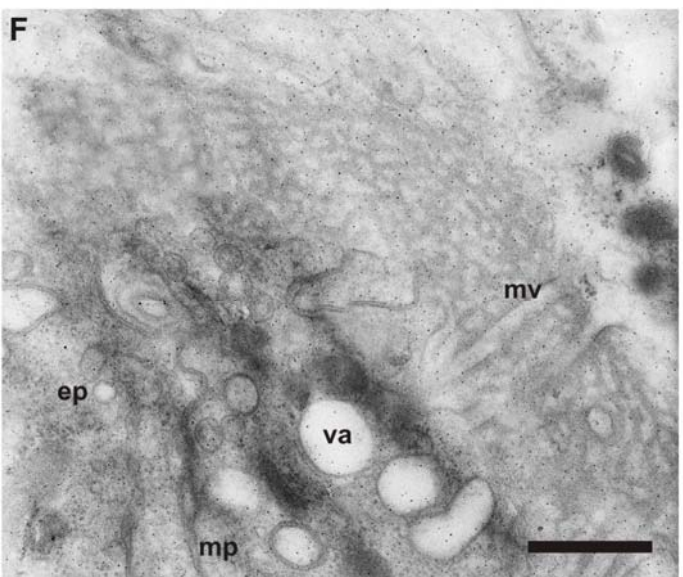
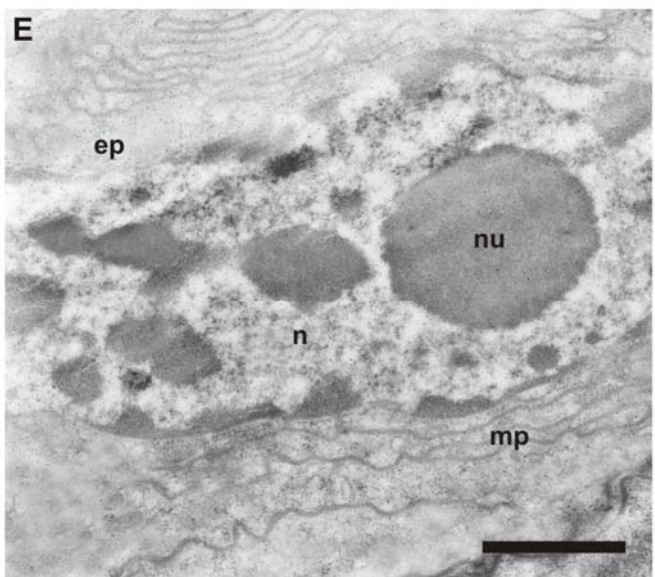
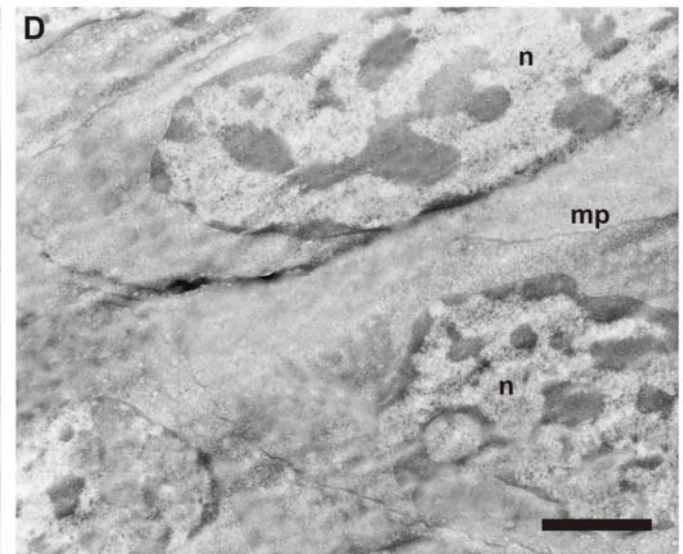
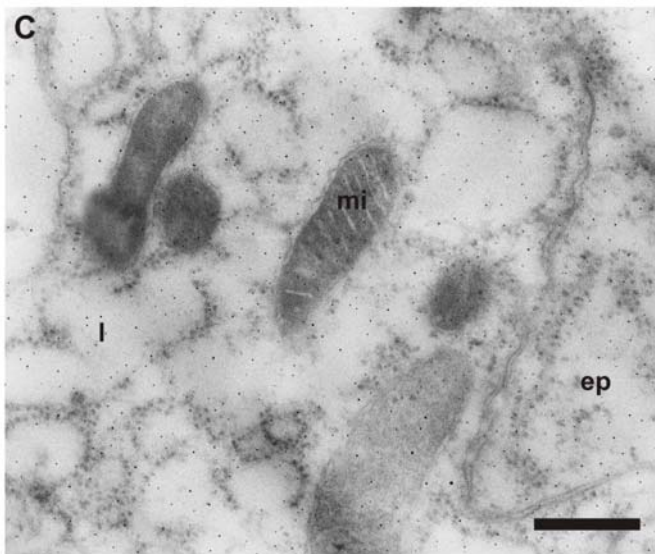
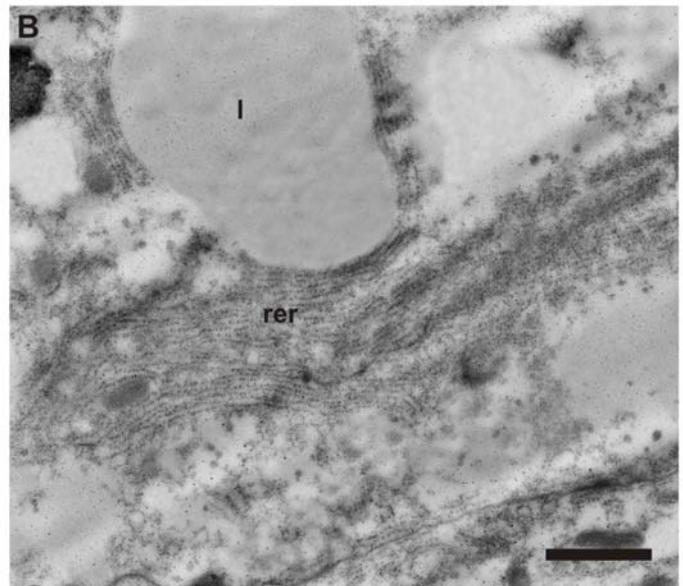
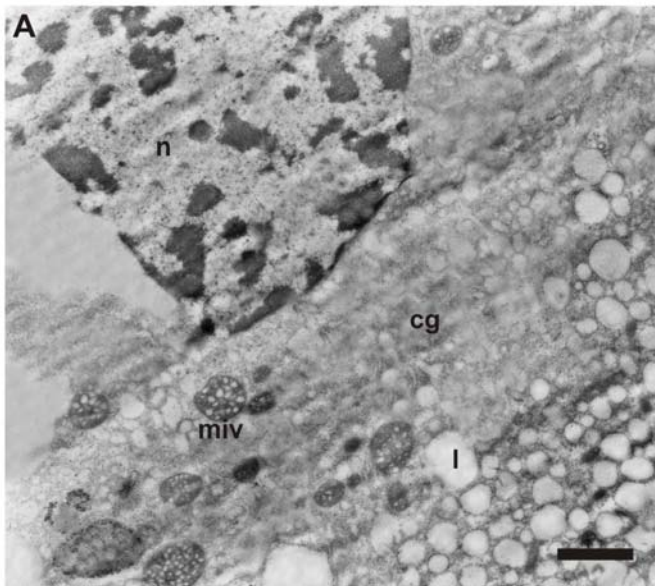


Figura 51- Micrografias eletrônicas de transmissão para localização de glicogênio do ovário de *Acutisoma longipes* cuidando da prole. **A)** Porção mais externa do ovário (**ov**) evidenciando feixes de musculatura (**mu**) e a túnica própria (**tp**). Barra= 2µm. **B e C)** Células do epitélio (**ep**) do ovário com acúmulo de grânulos (**gr**), áreas vacuolizadas (**ava**) do citoplasma. Barras= **B)** 0.5µm e **C)** 2µm. **D)** Porção apical das células do epitélio (**ep**). Barra= 1µm. **A-D)** As células do epitélio do ovário apresentaram reação negativa para glicogênio.

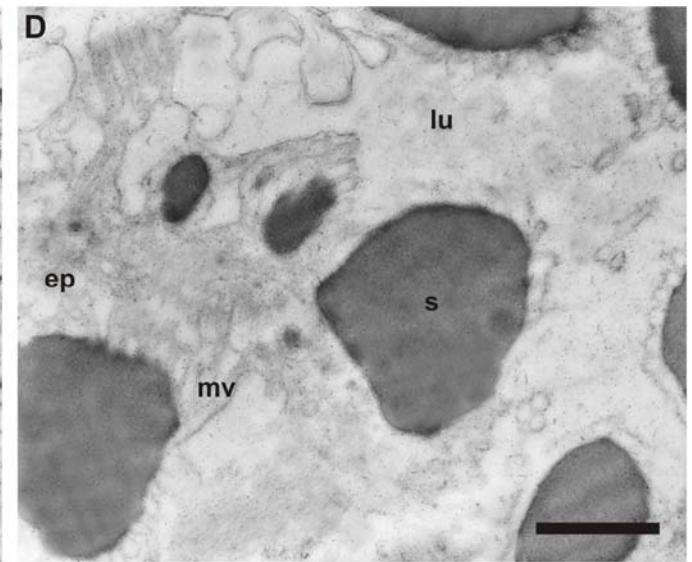
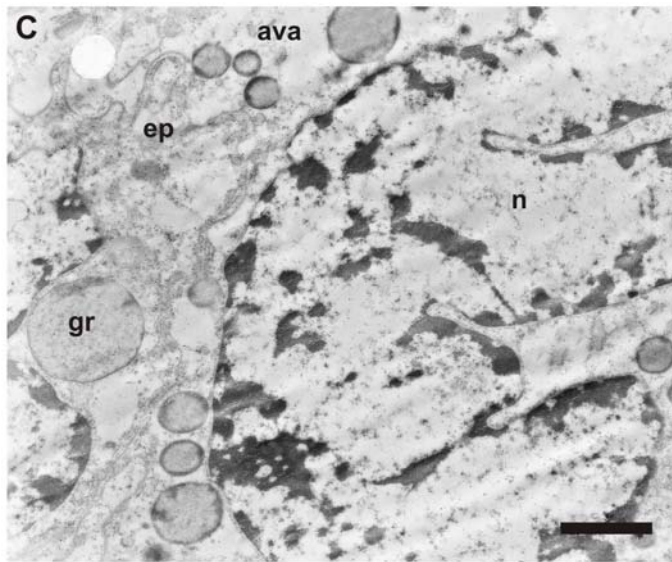
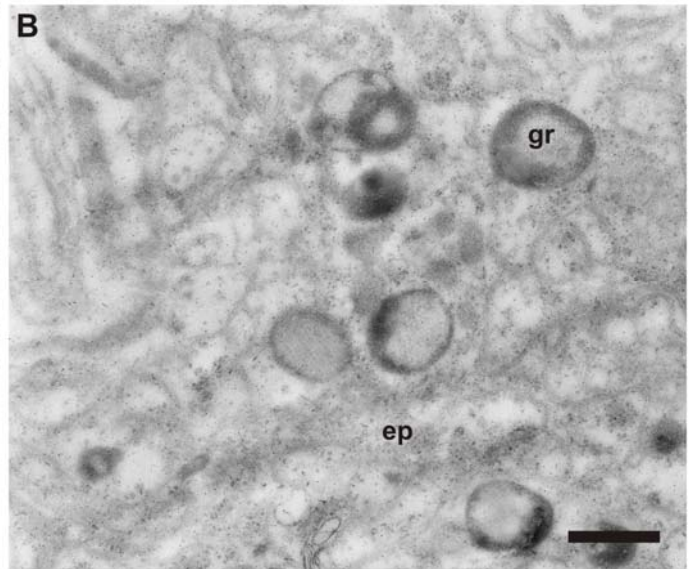
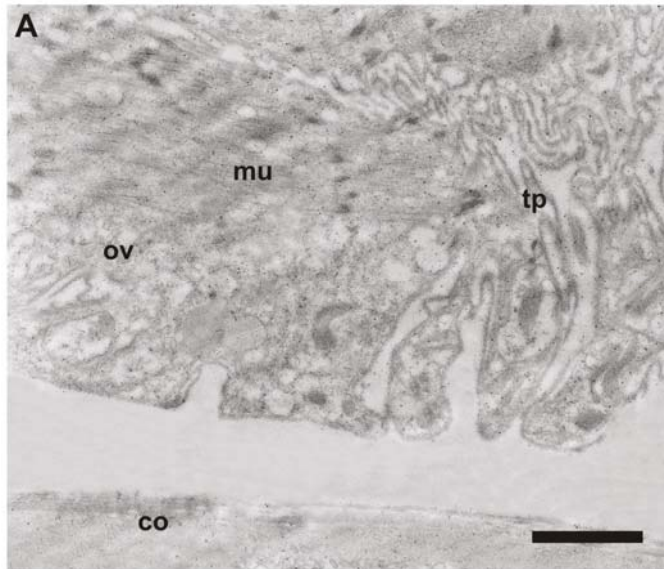
co= cório.

n= núcleo.

s= secreção.

lu= lúmen.

mv= microvilosidade.



7 DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Como na maioria dos aracnídeos, o ventrículo é composto de divertículos rodeados por músculos e um tecido intermediário, ocupando quase todo o corpo (BECKER; PETERS, 1985a). No estudo do ventrículo de opiliões da espécie *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* Roewer, 1913, Gonyleptidae (Laniatores) verificou-se que o que tal órgão apresenta características morfológicas, principalmente quanto a presença de diversos divertículos, muito semelhantes aquela encontradas em representantes de Phalangidae (Eupinoi), assim como observado no opilião *Phalangium opilio* (BECKER; PETERS, 1985a). O ventrículo tem intensa participação em todo o processo digestivo: na digestão, propriamente dita, na reabsorção e na excreção,

A análise sob microscopia de luz de fêmeas de *Acutisoma longipes* com e sem ovos maduros e fêmeas cuidando da prole permitiu elucidar a organização tecidual do ventrículo. Os divertículos estão organizados de forma que grupos de células do epitélio se projetam para o lúmen, formando estruturas semelhantes às vilosidades do intestino de mamíferos. Em fêmeas no final do período reprodutivo, ou seja, cuidando da prole pode-se observar em todo o epitélio ventricular uma redução na altura e volume das células epiteliais o que implica em uma retração do mesmo. A análise histológica também permitiu evidenciar que o epitélio ventricular é formado por dois tipos de células, as digestivas e as generativas. Em fêmeas com e sem ovos maduros as células digestivas possuem grande acúmulo de grânulos citoplasmáticos com densidade variada. Em fêmeas cuidando da prole, este acúmulo é menor quando comparados com as situações anteriormente descritas. Esses grânulos esféricos apresentam forte reação às técnicas de xylidine ponceau e azul de bromofenol, ambos para proteínas totais, e ao azul de toluidina ácida, indicando assim, que tais grânulos tem característica glicoprotéica ácida, podendo então se tratar de enzimas digestivas. Essas granulações apresentam reação positiva inespecífica à técnica do picrossirus red, isso talvez

pelo fato do direct red 80 ser um corante aniônico e então marcar complexos protéicos onde a porção glicídica reagiria com o picrosirius red.

Em aranhas, esses grânulos acumulados em células digestivas foram identificados como esterases, as quais são importantes no processo digestivo extra e intracelular. Porém, essas enzimas permanecem estocadas em vesículas no interior das células e devem permanecer inativas como grânulos de zimôgeno até serem liberadas, pois de modo contrário causariam danos à célula (LUDWIG; ALBERTI, 1988a). Em opiliões, tais grânulos também demonstraram conter proteases e amilases, sendo então secretados pelo ápice dilatado das células digestivas na presença de nutrientes pré-digeridos provenientes da digestão externa (BECKER; PETERS, 1985a). Essas vesículas de secreção assemelham-se às descritas em formigas, as quais se destacam do ápice das células e passam para o lúmen do ventrículo na forma de bolhas, sendo este tipo de secreção descrita como apócrina (CAETANO et al., 1994; CAETANO; ZARA, 2001).

Em *A. longipes* as células epiteliais, colunares com núcleos basais e ápice dilatado e arredondado, contêm muitas vesículas irregulares que brotam dessa região, e possuem o conteúdo granular que é marcado com azul de toluidina ácida, na fase em que a fêmea não tem ovos maduros e ainda não está em jejum e, portanto, em intensa atividade digestiva. Características semelhantes foram encontradas no ventrículo do opilião *P. opilio* que têm células digestivas apresentando citoplasma mais eletrôn-denso do que qualquer tipo de célula do epitélio. No ápice dessas células também estão presentes muitos vacúolos irregulares, sendo considerada como a principal característica da digestão celular na espécie. Nesses vacúolos, o precipitado denso no interior é positivo à reação para fosfatase ácida, indicando atividade lisossômica (BECKER; PETERS, 1985a).

De acordo com Becker, Peters (1985a), a análise sob Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), permite a distinção de três tipos diferentes de células no epitélio ventricular, as células digestivas, que provavelmente tornam-se células de excreção e as de secreção. Para esses autores as células digestivas são caracterizadas por seu citoplasma mais eletrôn-denso que outras células do

epitélio; pela presença de vesículas de forma irregulares e diferentes eletrondensidades no citoplasma e vacúolos, principalmente no citoplasma apical, que são positivos à reação da fosfatase ácida. As células excretoras são ricas em material como os esferocristais, e tem como principal função a excreção desses produtos. Para os autores as células secretoras acumulam grandes e numerosas vesículas moderadamente eletro-densas, que se coram intensamente pelo azul de toluidina sob a Microscopia de Luz. Segundo Lipovšek et al, (2004), o epitélio do ventrículo dos opiliões *Gyas titanus* e *G. annulatus* é dimórfico, com células secretoras e células digestivas, sendo a última mais abundante. Segundo a literatura podem ser verificadas no estômago de formigas *Camponotus arboreus*, por meio da ultra-estrutura, a ocorrência de três tipos de células no epitélio, que seriam as digestivas, as secretoras de muco e as excretoras (CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983).

No ventrículo de *A. longipes* as células epiteliais do ventrículo contêm grande rede de retículo endoplasmático rugoso, principalmente em torno de núcleos, mitocôndrias espalhadas por todo o citoplasma e acúmulos de gotas de lipídeo. Complexos de Golgi não foram claramente evidenciados, talvez pelo fato de serem poucos ou terem tamanho reduzido nesse tecido. Em relação a tipos celulares, as análises permitiram identificar células com certo grau de diferenciação, indicando que o epitélio não é uniforme como deixa crer com análise sob microscopia de luz. Algumas particularidades são encontradas em determinadas células e não em outras. Algumas células apresentam citoplasma mais eletron-denso que outras, com acúmulo de vacúolos contendo grânulos de diferentes eletrondensidades ocupando de preferência a porção mais apical da célula. Frequentemente em torno desses vacúolos há uma rede de retículo endoplasmático rugoso. Becker e Peters (1985a) realizaram testes para fosfatase ácida no intestino médio de opilião *P. opilio* e obtiveram reação positiva para a enzima nos grânulos contidos em vacúolos apicais. Estas células também apresentam muitas microvilosidades e um sistema de túbulos no citoplasma apical, que se pode supor serem retículo endoplasmático liso apresentando

cisternas dilatadas, provavelmente relacionadas ao metabolismo de lipídeo do tecido. De acordo com Becker e Peters (1985a) e Lipovšek et al. (2004) essas estruturas tubulovesiculares são comuns em diferentes artrópodes e estão relacionados à atividade endocítica, caracterizando as células digestivas.

Também no epitélio ventricular de *Acutisoma longipes*) foram observadas células contendo grandes vesículas eletrondensas, as quais normalmente estão rodeadas por retículo endoplasmático rugoso e reagiram intensamente ao azul de toluidina. Quanto as reações ao azul de bromofenol e ao xylidine ponceau, as vesículas do citoplasma apresentaram marcação fortemente positiva, indicando sua natureza protéica. Essas células são classificadas como secretoras e, provavelmente, contenham enzimas para digestão extracelular. De acordo com Lipovšek et al. (2004), testes citoquímicos para enzimas podem detectar o conteúdo dessas vesículas ou essas enzimas que são armazenadas em grânulos de zimógeno e apenas detectadas após a sua liberação.

Algumas células digestivas são capazes de tolerar mais do que um ciclo digestivo antes de assumirem a função excretora. Este fato foi observado em aranhas *Coleotes terrestris* (Agelenidae), sendo estas células caracterizadas por pequenos vacúolos excretores, vacúolos nutricionais eletrondensos (com função de estocagem) e grande quantidade de esferitos ou esfereocristais. Em *C. terrestris* os esferitos são compostos de fosfato e carbonato de cálcio e são considerados importantes estocagem de cálcio e outros íons, agindo então na desintoxicação por metais pesados (LUDWIG; ALBERTI, 1988a). Já nos opiliões *G. titanus* e *G. annulatus* (Sclerosomatidae), os esferitos no citoplasma de células excretoras são observados em fases bem avançadas de degeneração (LIPOVŠEK et al. 2004).

Em células digestivas do ventrículo de fêmeas com e sem ovos maduros de *A. longipes* são encontrados acúmulos de um tipo de grânulos, os quais aparecem como estruturas com refração sob microscopia de luz, assim como ocorre com os esferitos minerais de *P. opilio* (BECKER; PETERS, 1985a), e também não apresentam reação positiva a nenhum teste histoquímico. As análises ultra-

estruturais permitiram constatar que tais grânulos são esferocristais. Essas estruturas são produtos remanescentes da digestão intracelular e sua presença em células do epitélio ventricular de *A. longipes*, juntamente com vacúolos no citoplasma caracterizam as células excretoras. Tal fato também já descrito por Caetano e Cruz-Landim (1983) para células do estômago de formigas *Camponotus arborius*. Em algumas células do epitélio ventricular, principalmente em fêmeas sem ovos maduros, esses esferocristais encontram-se numa região próxima ao núcleo e retículo endoplasmático rugoso e também não têm características de estruturas em degeneração, como se observa em fêmeas com ovos e com prole. Então, essas podem estar relacionadas com depósitos de sais de urato para a síntese protéica, e não com produtos de excreção. Para Becker e Peters (1985a), quando os vacúolos excretores são pequenos esses são liberados para o lúmen sem danos para a célula, ou então unem-se em um único e grande vacúolo contendo materiais em diferentes estágios de degeneração, dito esferocristais e estruturas mielínicas que então são expelidos para o lúmen. Para Lipovšek et al., (2004) esses materiais de excreção apresentam reação positiva para fosfatase ácida, e são visualizados em células excretoras em fases avançadas de degeneração.

Aparentemente, a regeneração do epitélio ventricular é uma situação pouco entendida para *P. opilio*, *G. titanus* e *G. annulatus*, uma vez que nenhum tipo de célula ou região regenerativa foi identificada, apesar do processo digestivo e excretor intenso (BECKER; PETERS 1985a; LUDWIG; ALBERTI, 1988a).

Em *A. longipes*, as células generativas, ou de reposição, têm grandes núcleos e citoplasma não especializado, características de tecido não diferenciado são encontradas em grupos na região basal do epitélio, e se assemelham àquelas encontradas em insetos (CAETANO; CRUZ-LANDIM, 1983, CAETANO, 1988). Tais células generativas estão evidentes, com forte marcação no citoplasma pela contra coloração com verde de metila, usada na técnica do PAS. Tal corante evidencia RNA e DNA. Assim sendo, essas células, provavelmente estão em alta taxa de divisão celular e seu citoplasma é marcado revelando áreas de intensa

basofilia, devido à presença de estruturas responsáveis pela síntese protéica (RER).

Em abelhas tais células apresentam núcleo grande, pouco citoplasma (CRUZ-LANDIM, 1999, CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999) e repõem as células epiteliais colunares que sofrem degeneração natural devido ao desgaste e ao envelhecimento celular, de modo que a renovação do epitélio se faz pela divisão e diferenciação das células generativas (CRUZ-LANDIM; CAVALCANTE, 2003). Em todos os tipos de células secretoras, a própria fisiologia celular leva à deterioração das mesmas, sendo então a reposição destas células responsabilidade das células generativas (CAETANO et al., 1994). Essas células basais são consideradas células tronco embrionárias não diferenciadas que tornam-se células secretoras ou células absorptivas (COLLATZ, 1986).

As células do epitélio ventricular apresentam labirintos basais bem desenvolvidos, o que aumenta muito as chances de trocas com o tecido de reserva, como também um complexo sistema de interdigitações, sendo esta característica freqüente em tecidos que sofrem intensos movimentos devido ao processo digestivo, conferindo-lhes aumento de resistência.

Abaixo do epitélio e das células generativas encontra-se a lâmina basal espessa, com reação fortemente positiva às técnicas histoquímica do picrossirius que evidencia o colágeno aí presente e ao PAS que marca os polissacarídeos. A forte reação da lâmina basal permitiu a observação da região íntima de contato entre o epitélio e o tecido intermediário que circunda todo este último. De acordo com Ludwig, Alberti (1990) o contato entre os dois tecidos é como uma conexão “finger-like” (interdigitação). Esse tipo de contato pode elucidar a grande importância do transporte de metabólitos entre células digestivas e as células do tecido intermediário, visto que o contato entre os dois tecidos é aumentado. O tecido intermediário (tecido gorduroso) de aracnídeos de acordo com sua função de armazenamento e por apresentar características típicas do corpo gorduroso de insetos, pode também ser denominado de corpo gorduroso (GOYFFON; MARTOJA, 1983). As características deste tecido são: as células arredondadas ou

poliédricas, com núcleo central e, principalmente, contendo gotas lipídicas de tamanhos e formas variáveis.

De acordo com Becker e Peters (1985a) e Goyffon e Martoja (1983), as células do corpo gorduroso estocam glicogênio e lipídeo. Assim também é observado em *A. longipes*, cujo tecido intermediário é bastante espesso, envolto por uma fina lâmina basal e suas células apresentam grande quantidade de vesículas lipídicas, em todas as fases estudadas, podendo ser considerado um tecido de estocagem, dando suporte ao metabolismo do aparelho digestivo, bem como proteção. Corroborando o fato de ser este tecido intermediário um tecido de reserva energética, visto que, na fase anterior ao grande período de jejum por que passam as fêmeas, cuidando de sua prole, os dois compostos energéticos estão presentes em abundância. Desse modo, toda energia requerida para o período de jejum deverá ser suprida pelas reservas energéticas estocadas. Nesta espécie, a maioria do material de reserva é lipídeo, sendo o estoque de glicogênio apenas observado com técnica específica, no corpo gorduroso de fêmeas com ovos maduros (período que antecede o jejum). Em fêmeas, sem ovos e com ovos maduros, o corpo gorduroso é um tecido ativo, sendo esse fato confirmado por suas características celulares, tais como, conter reservas lipídicas, que aparecem como vesículas tanto eletrôn-densas quanto eletrôn-lúcidas. Além disso, este tecido apresenta núcleos grandes e muitas invaginações basais, que aumentam a superfície para trocas entre o tecido e a hemocèle. As gotas lipídicas são circundadas, na maioria das vezes, por retículo endoplasmático rugoso.

Para corroborar a idéia de que o corpo gorduroso em *A. longipes* é tecido de reserva para o suprimento de componentes para o epitélio ventricular, têm-se o fato desse tecido, aparentemente sofrer uma retração no seu volume e ter diminuído o estoque de lipídeo conforme se prolonga o período de jejum da fêmea (fêmeas cuidando da prole até a liberação desta da função). Quando as fêmeas estão na fase de cuidados com a prole, esse tecido está vacuolizado e a reserva de lipídeo é reduzida.

Para Lipovšek et al. (2004) essas reservas garantem a sobrevivência de indivíduos que são privados de alimentos, como opiliões das espécies *G. annalatus* e *G. titanus*, durante o alto inverno, sendo fundamentais no desenvolvimento dos indivíduos jovens, na reprodução e outros processos com gasto energético em adultos. De acordo com Becker, Peters (1985a), as condições do tecido de reserva independem de idade ou sexo do animal, mas sim do estado em que ele se encontra, como por exemplo, a inanição. Tal qual os opiliões de clima temperado, as fêmeas aqui estudadas passam por um período de privação alimentar (jejum) e se utiliza do mesmo mecanismo que os indivíduos das espécies *G. titanus* e *G. annulatus*, mas por outras razões. Este mecanismo, provavelmente, tenha sido o caminho encontrado para se evitar o canibalismo da prole, em troca dos cuidados da mesma, garantindo assim a teoria sobrevivência do maior número de descendentes, por evitar ataques de predadores.

Outro dado que corrobora o fato de ser o corpo gorduroso um tecido de suprimento da demanda energética para o metabolismo do ventrículo é a lâmina basal existente entre ele e o epitélio estar fortemente marcada e conter inúmeras dobras, aumentando a superfície de contato entre os dois tecidos, assim como já observado em *Coelotes terrestris* (LUDWIG; ALBERTI, 1988b).

Na região de transição entre corpo gorduroso e epitélio ventricular encontra-se a musculatura longitudinal e transversal, supostamente dando suporte mecânico ao epitélio que contém as células alongadas.

Com as análises realizadas nas três fases estudadas de fêmeas de *A. longipes* células digestivas, excretoras e secretoras foram observadas em todas as fases, porém nota-se que na fase de amadurecimento dos ovos e já com ovos maduros, as células com características excretoras são mais conspícuas.

Os artrópodes exibem uma grande variedade de mecanismos para estocagem de reservas energéticas para sua posterior utilização quando são requeridas (BECKER; PETERS, 1985a). Essas reservas garantem a sobrevivência de indivíduos que são privados de alimento, como nos opiliões *G. annalatus* e *G. titanus* durante o período de alto inverno, e também sendo fundamentais no

desenvolvimento dos indivíduos jovens nos eventos da reprodução como amadurecimento dos ovários, desenvolvimento dos ovócitos e oviposição, bem como em outros processos com gasto energético em adultos (LIPOVŠEK et al., 2004).

Os resultados das análises em ovários das fêmeas de *A. longipes* sugerem ser este órgão do tipo panoístico, caracterizado pela presença de ovócitos por toda sua extensão e a ausência de células nutridoras (CHAPMAN, 1998). Dados semelhantes já foram encontrados por Denardi et al., (2004) e Oliveira et al. (2005) em carrapatos e por Morishita et al., (2003) em aranhas.

O ovário de *A. longipes* apresenta forma tubular com uma camada de células epiteliais. O lúmen sofre algumas modificações notáveis que podem ser observadas no órgão como um todo. Assim como ocorre com o ventrículo das fêmeas analisadas nas diferentes fases reprodutivas, o ovário sofre retração. Neste estudo, a diminuição no lúmen do órgão é prontamente percebida, progredindo da fase em que a fêmea não tem ovos maduros para fase em que já está cuidando da prole. Quando as fêmeas ainda não possuem os ovos maduros, o ovário é desenvolvido, possui lúmen amplo e as células do epitélio são colunares, com núcleos apicais, sendo observada alta basofilia citoplasmática nessa região. Os ovócitos ligados ao ovário apresentam-se em estágios iniciais de desenvolvimento. Quando a fêmea está na fase de cuidado parental, o lúmen do ovário pode ser considerado apenas como um canal, dado seu estreitamento. As células do epitélio são mais baixas, assumindo a forma cúbica e seus núcleos são mais centrais. Enquanto isso, poucos ovócitos são observados quando comparados com fases anteriores, estando alguns em estágios avançados de desenvolvimento e outros já em processo de reabsorção.

Ainda em fêmeas de *A. longipes*, o epitélio simples colunar do ovário é rodeado por musculatura estriada, tem células com várias interdigitações, grandes núcleos e citoplasma bastante eletrôn-denso, devido à complexidade e quantidade de estruturas, como retículo endoplasmático rugoso, muitas mitocôndrias e grande complexo de Golgi com inúmeras vesículas. Tais características demonstram que

estas células do ovário apresentam alto metabolismo de síntese, como por exemplo a de secreção. Este fato é confirmado pela presença tanto de grânulos com eletron-densidades diferentes comuns no citoplasma das células epiteliais nas fases observadas, como da liberação de secreção bastante eletron-densa para o lúmen, na região apical das células onde encontram-se muitas microvilosidades. Portanto, a alta atividade de síntese é para a produção de secreção.

No citoplasma do epitélio também há mitocôndrias com características atípicas, apresentando cristas vesiculares. Tais cristas provavelmente estejam relacionadas à síntese ou metabolismo de lipídeos, componente esse, fundamental na produção de hormônios esteróides típicos do período reprodutivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). No citoplasma de células epiteliais do ovário encontram-se também figuras mielínicas, provavelmente reflexo de degeneração e reciclagem de material da própria célula.

O lúmen do ovário é ramificado, assim como observado em fêmeas da aranha *Nephila clavata* (Nephilidae) que, logo ao se tornarem adultas, iniciam o desenvolvimento dos ovócitos (KONDO et al., 1993). Nele é observado em todas as fases analisadas secreção basófila, que apresenta forte reação positiva para o azul de toluidina ácida e ao PAS. Porém, em *A. longipes*, essa secreção que está no ápice das células ora cora-se pela hematoxilina ora pela eosina. Como mencionado por Kondo et al. (1993), a secreção no lúmen provavelmente tenha finalidade de prender a massa de ovos após a oviposição. Em pseudoescorpiões ocorre diminuição no tamanho do epitélio tão logo esse material é secretado (VACHON, 1938).

Assim que tem início o desenvolvimento dos ovócitos em *A. longipes*, nota-se o pedicelo, o qual é originado das células epiteliais. Tais estruturas apresentam células alongadas com núcleos redondos e assim como todo o epitélio é circundado pela lâmina basal, que é marcada positivamente pela técnica do picrosirius red e pelo PAS, indicando a presença de glicoproteínas. O pedicelo pode ter algum tipo de participação na síntese de elementos para os ovócitos

(síntese exógena), pois vesículas transportadas para o ovócito são observadas na região de contato entre este e o pedicelo como também a presença de inúmeras microvilosidades do ovócito em direção as células do pedicelo vistos com a utilização de MET. Ultra-estruturalmente o pedicelo, o qual dá sustentação ao ovócito na parte externa do ovário, é formada de células ditas funiculares, pois se assemelham à funis, com citoplasma menos eletrondenso se comparados às células do epitélio, devido a menor densidade de organelas. São observadas apenas mitocôndrias e inúmeras interdigitações entre as células, demonstrando o seu papel de sustentar o ovócito no exterior do ovário. Os núcleos dessas células contêm pouco material cromatínico, refletindo a baixa atividade destas. Características muito semelhantes foram observadas em ovários de aranha *Antrodiaetus unicolor* (MICHALIK et al., 2005).

Abaixo da lâmina basal está presente a musculatura, relacionada principalmente aos movimentos de contração que ocorrem na oviposição. Também circundando o ovário está presente o tecido amorfo e acelular, assim como a *tunica propria*, que é permeável à vitelogenina e outras proteínas da hemolinfa, as quais são incorporadas ao ovócito durante o processo de vitelogênese (SONENSHINE, 1991).

Os ovócitos, assim que iniciam a ovogênese, começam a acumular grânulos acidófilos em seu citoplasma (KONDO et al., 1993). Curiosamente, ovócitos nos diferentes estágios do desenvolvimento podem estar presentes em qualquer uma das fases reprodutivas das fêmeas de *A. longipes*. Assim podemos afirmar que o ovário desses animais não tem um padrão regular de desenvolvimento dos ovócitos, ou seja, a ovogênese é um processo dinâmico e contínuo durante diferentes estágios do desenvolvimento. A presença de ovócitos em estágios iniciais de desenvolvimento, inclusive ovogônias, são vistos em maior quantidade na fase em que as fêmeas não apresentam ovos maduros. Já os ovócitos em reabsorção são abundantes no final do ciclo reprodutivo, na fase em que a fêmea está cuidando da prole.

Embora as análises ultra-estruturais forneçam dados bastante refinados a respeito das características celulares, como aqui observado nas células do ventrículo, o mesmo não se aplica para o estudo da dinâmica do desenvolvimento de ovócitos. Isto porque devido à amplitude de tais estruturas não é possível observar toda a extensão do ovário.

Os estágios do desenvolvimento dos ovócitos foram analisados com referência nos trabalhos de Balashov (1963) e Denardi et al. (2004), uma vez que se observam muitas semelhanças entre esses processos em opiliões e em carrapatos.

Os ovócitos encontrados em *A. longipes*, que podem ser classificados no estágio I conforme Balashov (1963) e Denardi et al. (2004) para carrapatos são pequenos e arredondados, o citoplasma é homogêneo com o núcleo ou vesícula germinativa com contorno irregular e grânulos e um grande nucléolo. Nessa fase os ovócitos são fortemente marcados pela reação de azul de toluidina ácida sendo tal marcação devido a grande quantidade de RNA em seu citoplasma.

No estágio II de desenvolvimento os ovócitos são vistos maiores que os anteriores, são redondos, o núcleo ainda é observado e o citoplasma apresenta finas granulações, marcando o início da incorporação do vitelo (BALASHOV, 1963; DENARDI et al., 2004). Os ovócitos II de *A. longipes* apresentam as características descritas acima e têm suas granulações marcadas com o PAS e mais fracamente marcadas com as técnicas para proteínas totais.

Como já descrito por Balashov (1963) e Denardi et al. (2004) para carrapatos, os ovócitos de *A. longipes* no estágio III têm o citoplasma com granulações maiores que o estágio II, o núcleo e nucléolo nem sempre são visíveis e já apresentam as características do cório e os mesmos tipos de marcações histoquímicas, assim como também acontece no estágio seguinte. No estágio IV as granulações são maiores, o cório já está formado e o núcleo raramente é observado.

Em *A. longipes* os ovócitos no estágio V são ainda maiores, as granulações ocupam todo citoplasma, podem ser evidenciadas diferentes camadas no cório,

atingindo assim o grau máximo de desenvolvimento, conforme observado em carrapatos (BALASHOV, 1963; DENARDI et al., 2004). Esta fase é dificilmente observada, pois logo que se tornam maduros ocorre a ovulação e então passam para o oviduto (BALASHOV, 1963).

Com a MEV também foi possível identificar em ovócitos um tipo de cicatriz que percorre a parede externa deste. Tal cicatriz provavelmente, seja impressão do sistema traqueal sob as células foliculares.

No início da ovogênese foi observado ovócito em estágio inicial de desenvolvimento com dois núcleos. Um com característica da vesícula germinativa, presente em quase todos os estágios, e outro núcleo se assemelha a núcleos acessórios em insetos. Nesta fase da ovogênese, a síntese protéica é intensa, podendo então estes núcleos auxiliarem no suprimento dos metabólitos necessários para o desenvolvimento do ovócito. Os núcleos acessórios são envoltos por membranas idênticas às da vesícula germinativa, ou seja, ao envoltório nuclear e com freqüência contêm grânulos eletrondensos, RNA positivos (CRUZ-LANDIM, 2002). Estes núcleos originam-se do brotamento da vesícula germinativa de ovócitos jovens e são rapidamente transportados para a periferia do ovócito onde segundo Hopkins (1964) e Bilinski (1991a) crescem e se multiplicam. Alguns autores os consideram, o núcleo acessório, como precursores do vitelo (HOPKINS, 1964) justamente por aparecerem e serem mais visíveis precedendo sua deposição no ovócito.

A retração que ocorre no ovário, da fase de fêmeas sem ovos maduros para a fase onde esta cuida da prole, foi constatada com a microscopia de luz e pode ser observada com o estreitamento parcial do lúmen. Isto então se assemelha a um canal nas fêmeas na fase de ovos maduros, porém na região onde se observa ovócito, o lúmen permanece amplo. Em fêmeas que não mais se encontram no período reprodutivo e tem cuidados com a prole, observam-se ao longo do ovário, ovócitos em praticamente todos os estágios de desenvolvimento. Esta diferença de desenvolvimento de ovócitos mostra que a ovogênese é um processo dinâmico e contínuo, onde a deposição do vitelo ocorre o todo o tempo

da vida reprodutiva da fêmea. Especificamente na fase de cuidados com a prole, quando o período reprodutivo se finalizou, os ovócitos presentes no ovário indicam que a deposição de vitelo está ocorrendo. Os resultados da MEV detectaram muitos ovócitos em degeneração, sendo encontrados no estágio de reabsorção formando então, os corpos atrésicos. Esta reabsorção vem ao encontro as necessidades nutricionais e energéticas, dada a deficiência de alimento na fase de cuidados com a prole, pois o jejum já se estende por longo período. Para *Acutisoma longipes* este período pode durar cerca de um mês após a postura (MACHADO; OLIVEIRA, 1998).

O processo de reabsorção de ovócitos bem formados em insetos pode ser induzido por uma série de fatores de ordem fisiológica, ecológica e comportamental. Como por exemplo, temos a escassez de alimento para a fêmea ou para a futura cria, deficiência no alimento de alguns nutrientes necessários para o amadurecimento dos ovócitos, virgindade da fêmea ou ausência de machos para acasalamento, falta de local apropriado para postura, ou pressão social (LUSIS, 1963; BELL; BOHN, 1975).

Nas fêmeas empenhadas no cuidado da prole, a análise ultra-estrutural permitiu constatar a presença de áreas vacuolizadas no citoplasma das células do ovário, característica esta que indica a presença de degeneração como relatado por Silva de Moraes, Bowen (2000) para abelhas.

Após a análise tanto do ventrículo como, e principalmente, do ovário, observa-se a grande necessidade de pesquisas no assunto, para que possam ser feitas afirmações mais concretas, que não divaguem para táxons às vezes tão longe do estudado.

8 CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

O presente trabalho contribuiu para maior conhecimento a respeito da biologia digestiva e reprodutiva em opiliões usando as técnicas histoquímicas e ultra-estruturais.

Dos resultados apresentados sobre o ventrículo e o ovário das fêmeas da espécie *Acutisoma* (= *Goniosoma*) *longipes* em diferentes fases do ciclo reprodutivo (fêmeas sem ovos maduros, fêmeas com ovos maduros e fêmeas cuidando da prole) pode-se concluir que:

- 1- As células do epitélio ventricular podem ser classificadas como digestivas, secretoras, excretoras e generativas, sendo as excretoras menos abundantes na fase de fêmea cuidando da prole, na qual é intensa a reabsorção de material digerido, dada a escassez de nutrientes na fase;
- 2- No ventrículo, grande parte do material remanescente da digestão sofre reabsorção, uma vez que o alimento é escasso na fase de jejum do ciclo reprodutivo da fêmea;
- 3- Em fêmeas cuidando da prole o ventrículo sofre retração, devido à redução na altura do epitélio, quando comparado ao ventrículo de fêmeas no início do período reprodutivo;
- 4- Nas células do epitélio ventricular os esferocristais encontrados caracterizam as células excretoras;
- 5- O corpo gorduroso dos indivíduos aqui estudados tem função semelhante a do corpo gorduroso dos insetos. Tal tecido estoca compostos que irão suprimir a demanda energética requerida, principalmente no período do jejum das fêmeas;

- 6- No tecido intermediário o principal composto de reserva observado é o lipídeo, sendo o glicogênio também acumulado apenas no período que antecede o jejum das fêmeas;
- 7- Assim como ocorre com o ventrículo, o ovário das fêmeas também sofre retração na fase em que estas estão cuidando da prole;
- 8- A ovogênese é um processo dinâmico e contínuo em todos os estágios estudados da espécie;
- 9- A presença de ovócitos em processo de reabsorção ocorre para suprir as necessidades de nutrientes exigida durante a ovogênese;

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L.E. & Machado, G. (2007). Diet and foraging. In: *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. R. Pinto-da-Rocha, G. Machado & G. Giribet (Eds). Harvard University Press, Cambridge. pp. 309-338.
- Adis, J. (1997). Estratégias de sobrevivência de invertebrados terrestres em florestas inundáveis da Amazônia Central: uma resposta à inunda  o de longo período. *Acta Amaz.* 27: 43-54.
- Afzelius, B.A. (1992). Section staining for electron microscopy using tannic acid as a mordant: a simple method for visualization of glycogen and collagen. *Microsc. Res. Tech.* 21: 65-72.
- Balashov, Yu.S. (1963). Ovogenesis periodicity in argasid and ixodid ticks. *Parasitol. Sb. Zool. Inst. Akad. Nauk. SSSR* 21: 39-43.
- Barnes, R.D., Ruppert, E.E. & Fox, R.S. (2005). *Zoologia dos Invertebrados*. 7^a ed. Editora Roca: São Paulo.
- Becker, A. & Peters, W. (1985a). Fine structure of the midgut gland of *Phalangium opilio* (Chelicerata, Phalangida). *Zoomorphology* 105: 317-325.
- Becker, A. & Peters, W. (1985b). The ultrastructure of the midgut and the formation of peritrophic membranes in a harvestman, *Phalangium opilio* (Chelicerata Phalangida). *Zoomorphology* 105: 326-32.
- Bell, W.J. & Bohn, M.K. (1975). Oosorption in insects. *Biol. Rev.* 50: 373-396.

- Berland, L. (1949). Ordre des Opilions. In: Grasse, P. P. (Ed.). *Traité de Zoologie*, Masson et Cie. (Paris) 6, 761-793.
- Bilinski, S. (1991a). Are accessory nuclei involved in the establishment of developmental gradients in hymenopteran oocytes? *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 199: 423-426.
- Caetano, F.H. (1988). Anatomia, histologia e histoquímica do sistema digestivo e excretor de operarias de formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Naturalia* 13: 129-74.
- Caetano, F.H. & Cruz-Landim, C. (1983). Ultra-estrutura das células colunares do ventrículo de *Camponotus arboreus* (Hymenoptera, Formicidae) e suas implicações funcionais. *Naturalia* 8: 91-100.
- Caetano, F.H., Torres Jr, A.H., Camargo-Mathias, M.I. & Tomotake, M.E.M. (1994). Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios* 80: 235-42.
- Caetano, F.H. & Zara, J.F. (2001). Ultramorphology and histology of the foregut and midgut of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Fabricius) larvae (Formicidae: Ponerinae). *J. Hym.Res.* 10 (2): 251-60.
- Cavalcante, V.M. & Cruz-Landim, C. (1999). Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24: 19-40.
- Chapman, F.R. (1998). *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. Cambridge University Press. Melbourne.
- Cloudsley-Thompson, J.L. (1958). *Spiders, Scorpions, Centipedes and Mites*. Pergamon Press. London.

- Coello, S. (1989). A new staining schedule for formalin-fixed, glycol methacrylate-embedded fish ovaries. *J. Fish. Biol.* 34: 329-30.
- Cokendolpher, J.C., Mackay, W.P. & Muma, M.H. (1993). Seasonal populations phenology and habitat preferences of montane harvestmen (Arachnida: Opiliones) from south-western New Mexico. *Swest. Nat.* 38: 236-240.
- Collatz, K.G. (1986). Structure and function of the digestive tract. In: *Ecophysiology of Spiders*. Nentwig, W. (Ed.). Springer Verlag, New York. pp. 229-238.
- Comstock, J.H. (1975). *The Spider Book*. Cornell University Press. London.
- Cruz-Landim, C. (1999). Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera: Apidae) midguts. *Sociobiology* 34: 597-603.
- Cruz-Landim, C. (2002). Biologia do desenvolvimento em abelhas: Aparelho reprodutor feminino e ovogênese. Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina/Cap1.pdf>. Acesso em 2 Junho de 2008.
- Cruz-Landim, C. & Cavalcante, V.M. (2003). Ultrastructural and cytochemical aspects of metamorphosis in the midgut of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *Zoological Society of Japan*. 20: 1099-107.
- Denardi, S. E., Bechara, G. H., Oliveira, P. R., Nunes, E. T., Saito, K. C. & Camargo-Mathias, M. I. (2004). Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 125: 379-395.

- Gilbert, O. (1952). Studies on the histology of the midgut of the Chelonethi or Pseudoscorpiones. *Quart. J. Microscop. Sci.* 93: 31-45.
- Giribet, G., Rambla, M., Carranza, S.; Baguna, J., Riutort, M. & Ribera, C. (1999). Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Mol. Phyl. Evol.* 11: 296-307.
- Gnaspini, P. (1996). Population ecology of *Goniosoma spelaeum*, a cavernicolous harvestmen from south-eastern Brazil (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae). *J. Zool. Lond.* 239: 417-435.
- Gnaspini, P. & Trajano, E. (1994). Brazilian cave invertebrates, with a checklist of troglomorphic taxa. *Rev. Bras. Entomol.* 38: 549-84.
- Goyffon, M. & Martoja, R. (1983). Cytophysiological aspects of digestion and storage in the liver of a scorpion, *Androctonus australis* (Arachnida). *Cell Tissue Res.* 228: 661-675.
- Hopkins, C. R. (1964). The histochemistry and fine structure of the accessory nuclei in the oocyte of *Bombus terrestris*. *Quart. J. Microscop. Sci.* 105: 475-480.
- Juberthie, C. (1965). Données sur l'écologie, le developpement et la reproduction des Opilions. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 2: 377-396.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). *Biologia Celular e Molecular*, 8ª ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Junqueira, L.C.U. & Junqueira, L.M.M.S. (1983). *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. Livraria Editora Santos. São Paulo.

- Kastner, A. (1933). Verdauungs und Atmungsorgane der Weberknechte *Opilio parietinus* de Geer und *Phalangium opilio* L. *Z. Morph. Okol. Tiere.* 27: 587-623.
- Koepse, J. K., Fuchs, M., Chen, T.T., Hunt, L. M., Kovalick, G.E. & Briers, T. (1985). The role of Juvenile Hormone in reproduction. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Phamacology*. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds) Vol. 8. Endocrinology II. Pergamon Press, Oxford. pp. 165-204.
- Kondo, A., Chaki, E., Fukuda, M. (1993). Basic architecture of the ovary in the goldem silk spider, *Nephila clavata*. *Mem. Queensl. Mus.* 33 (2):565-570.
- Lipovšek, S., Novak, T., Janžekovič, F., Senčič, L. & Pabst, M.A. (2004). A contribution to the functional morphology in phalangiid harvestmen *Gyas annulatus* and *Gyas titanus* during their life cycle. *Tissue Cell* 36: 275-82.
- Ludwig, M. & Alberti, G. (1988a). Mineral congregations, "spherites" in the midgut of *Coelotes terrestris* (Araneae): Structure, composition and function. *Protoplasma* 143: 43-50.
- Ludwig, M. & Alberti, G. (1988b). Digestion in spider: histology and fine structure of the midgut gland of *Coelotes terrestris*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20 (4): 709-718.
- Ludwig, M. & Alberti, G. (1990). Peculiar of arachnid midgut glands. *Acta. Zool. Fenn.* 190: 255-9.
- Lusis, O. (1963). Histology and histochemistry of development and resorption in the terminal oocytes of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Quart. J. Microsc.. Sci.* 104: 57-68.

- Machado, G. (2002). Maternal care, defensive behavior, and sociality in neotropical *Goniosoma harvestmen* (Arachnida: Opiliones). *Ins. Soc.* 49: 388-393.
- Machado, G. & Oliveira, P.S. (1998). Reproductive biology of the Neotropical harvestman *Goniossoma longipes* (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): mating and oviposition behaviour, brood mortality and parental care. *J. Zool.* 246: 359-367.
- Machado, G., Raimundo, R.L.G. & Oliveira, P.S. (2000). Daily activity schedule, gregariousness and defensive behaviour in the Neotropical harvestman *Goniossoma longipes* (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae). *J. Nat. Hist.* 34: 587-596.
- McManus, J.F.A. (1946). Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158: 202.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. (1980). *Práticas de Biologia Celular*. São Paulo: Editora Edgard Blucher-FUNCAMP. Campinas.
- Michalik, P., Reiher, W., Tintelnott-Suhm, M., Coyle, F.A. & Alberti, G. (2005). Female genital system of the folding-trapdoor spider *Antrodiaetus unicolor* (Hentz, 1842) (Antrodiaetidae, Araneae): Ultrastructural study of form and function with notes on reproductive biology of spiders. *J. Morphol.* 263: 284-309.
- Morishita, R., Ferreira, S.A., Santiago, A.F. & Faraco, C.D. (2003). Studies on oogenesis and oviposition in the brown spider *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae). *Anat. Rec. Part A* 273A: 575-82.

- Oliveira, P.R., Bechara, G. H., Denardi, S. E., Nunes, E. T., Camargo Mathias, M. I., 2005. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.* 110: 146-156.
- Pearse, A.G.E. (1960). *Histochemistry Theoretical and Applied*. Jet. Churchill Ltda., London.
- Pinto-da-Rocha, R. (1999). Opiliones. In: C.R.F. Brandão & E.M. Cancellato (ed.). *Invertebrados terrestres*. Vol. V. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo. FAPESP. P. 35-44.
- Said, El. A. (1992). A contribution to the anatomy and histology of the female reproductive system of *Amblyomma cajennense* (Acarina: Ixodidae). *J. Egyptian Soc. Parasitol.* 22: 391-400.
- Santos, A.J., Machado, G. & Gonzaga, M.O. (2002). *Introdução à Aracnologia*. Museu de História Natural, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Savory, T.H. (1938). Notes on the biology of harvestman. *J. Queckett Microsc. Club.* 1: 89-94.
- Savory, T. (1977). *Arachnida*. 2^a ed. Academic Press, London.
- Shultz, J.W. (1998). Phylogeny of Opiliones (Arachnida): An assessment of the Cyphopalpatores concept. *J. Arachnol.* 26: 257-272.
- Silva de Moraes, R. L. M. & Bowen, I. D. (2000). Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera*). *Cell Biol. Int.* 24 (10): 737-743.

Sonenshine, D.E. (1991). *Biology of the ticks*, Oxford University Press, New York.

Vachon, M. (1938). Recherches anatomique et biologiques sur la reproduction et le développement des psedoscorpions. *Thés. Fac. Sci. Univ. Paris, ser Ano. 1779.* (2645): 1-207.

Weygoldt, P. (1969). *The biology of pseudoscorpions*. Harvard University Press, Cambridge.

APÊNDICE

TÉCNICA DO AZUL DE TOLUIDINA (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

I- Soluções

- Azul de toluidina aquosa 0.5%, pH 3.5.
- HCl 0.1 N (para correção do pH).

II- Técnica

- 1- Hidratar os cortes por 1 minuto.
- 2- Corar com a solução corante previamente aquecida a 60°C por 1 hora em estufa a 60°C.
- 3- Lavar em água destilada.
- 4- Imergir os cortes por 30 segundos em solução aquosa a 1% de molibdato da sódio.
- 5- Passar os cortes rapidamente em álcool 70%.
- 6- Deixar secar e montar em resina.

III- Resultado

As estruturas ácidas (RNA, DNA e polissacarídeos ácidos) coram-se em azul.

TÉCNICA DO PAS (PERIODIC ACID SCHIFF) (McMANUS, 1946)

I- Soluções

- Ácido periódico solução aquosa a 1%.
- Reagente de Schiff - 1g de fucsina básica em 200 mL de água destilada. Levar à fervura e deixar esfriar até 50°C. Filtrar. Adicionar 1g de metabissulfito de potássio ou sódio, dissolve e depois acrescentar 20 mL de ácido clorídrico 1N.

II- Técnica

- 1- Hidratar os cortes.
- 2- Transferir os cortes para a solução de ácido periódico durante 5 minutos.
- 3- Lavar em água destilada.
- 4- Colocar no reagente de Schiff por 15 minutos.
- 5- Lavar em água corrente.
- 6- Lavar.
- 7- Contra-coloração com verde de metila por 20 segundos.
- 8- Lavar em água corrente.
- 9- Deixar secar e montar em resina.

III- Resultado

Glicoconjugados contendo grupamentos 1-2 glicol coram-se intensamente em vermelho magenta.

AZUL DE BROMOFENOL (PEARSE, 1960)

I- Soluções

Solução corante:

- 0,05% de azul de Bromofenol,
- 1% de bicloreto de Mercúrio,
- 2% de ácido acético aquoso.

II- Técnica

- 1- Corar com azul de bromofenol por 1 hora.
- 2- Lavar por 5 minutos em solução de ácido acético 0.5%.
- 3- Lavar em água corrente até os cortes tornarem-se azuis.
- 4- Deixar secar.
- 5- Montar em bálsamo do Canadá, entelan ou permount.

III- Resultado

Proteínas coradas em azul.

COLORAÇÃO SIMULTÂNEA PAS-AZUL DE BROMOFENOL (COELHO, 1989)

I- Soluções

- Ácido periódico a 1%.
- Reagente de Schiff.
- Azul de bromofenol.
- Hematoxilina de Erlich's (Opcional).
- Solução tampão Holmes pH 7.8 a 8.0.

II- Técnica

- 1- Passar os cortes em ácido periódico 1% por 10 a 15 minutos.
- 2- Deixar em água corrente durante 5 minutos.
- 3- Tratar em reagente de Schiff por 10 minutos.
- 4- Lavar em água corrente por 5 a 10 minutos.
- 5- Corar com azul de bromofenol por 15 minutos.
- 6- Deixar durante 20 minutos em ácido acético 0.5%.
- 7- Deixar em água corrente durante 3 minutos.
- 8- Tratar vinte minutos em hematoxilina de Erlich's (Opcional).
- 9- Passar duas vezes em solução tampão Holmes pH 7.8 a 8.0.
- 10- Deixar secar e montar.

III- Resultado

Glicoconjugados neutros com agrupamento 1-2 glicol coram-se em magenta e proteínas em azul.

XYLIDINE PONCEAU pH 2.5 (MELLO; VIDAL, 1980)**I- Soluções**

Solução corante:

0.1 g de xylidine ponceau.

100 mL de ácido acético (2%), pH 2.5.

II- Técnica

- 1- Hidratar os cortes com água destilada por 1 minuto.
- 2- Corar com xylidine ponceau por 15 minutos.
- 3- Lavar em ácido acético a 2% por 30 minutos.
- 4- Lavar em água destilada.
- 5- Montar em bálsamo do Canadá, entelan ou permount.

III- Resultado

Proteínas totais coradas em vermelho.

PICROSIRIUS RED (JUNQUEIRA et al., 1979)

I- Soluções

Solução corante:

0.1 g de direct red 80.

100 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico.

II- Técnica

- 1- Hidratar os cortes com água destilada por 1 minuto.
- 2- Corar com a solução corante por 60 minutos na estufa à 60°C.
- 3- Lavar rapidamente em água destilada.
- 4- Corar com hematoxilina de Harris por 8 minutos.
- 4- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- 5- Montar em bálsamo do Canadá, entelan ou permount.

III- Resultado

Fibras colágenas em vermelho magenta, DNA e RNA em azul e citoplasma de células epiteliais e musculares em róseo ou amarelado.