

MARÍLIA MEDEIROS

**Estudo Ultra-Estrutural da Espermiogênese
Dicotômica de *Alabama argillacea* Hübner,
1818**



0.285.301-5

UFSC-BU



**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências na área de Biologia/Genética**

Orientadora: Profa. Dra. Marina Silveira

São Paulo

- 1997 -

- *Aos meus filhos e à minha mãe*
- *Ao meu pai, in memoriam, um exemplo de estudo e de amor ao próximo*

AGRADECIMENTOS:

- à Dra. Marina Silveira, orientadora da tese, pela confiança, compreensão, consideração profissional, pelo respeito à minha individualidade e pela oportunidade especial de realização deste trabalho;
- à Universidade Federal de Santa Catarina e à CAPES, por autorizarem meu afastamento das atividades didáticas para cursar doutorado no Instituto de Biociências da USP e pelo suporte financeiro;
- à Dra. Helena de Souza Santos e ao Dr. Pedro Kiyohara, pelo uso dos materiais e equipamentos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo;
- ao pessoal técnico do LME/IFUSP, Maria Tereza Faustino Silveira, Simone Perche de Toledo e Sílvio Luiz Ferrari, pela amizade e cooperação indispensável;
- ao Prof. Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, Coordenador do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da USP, pelo uso do MET ZEISS EM 900;
- ao Prof. Dr. Sérgio F. de Oliveira do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo uso do MET JEOL 100 CX II;
- à Marta, colega de doutorado, pela amizade, cooperação e interação em diferentes oportunidades de trabalho e convívio social;
- à amiga Angela, pelo apoio, pela hospitalidade, compreensão e por sua generosidade;
- à Irani, uma amiga sempre muito especial, pelo intercâmbio proveitoso e pela participação em momentos alegres e tristes desta jornada;
- à minha mãe, Rosa, por sua fé, paciência e compreensão, apesar de todos os percalços;
- e, de modo muito especial, aos meus filhos, **Carolina, Carla e Carlos José**, pelo estímulo constante e apoio incondicional, pela compreensão e pelo grande afeto que nos une.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais da espermatogênese em Insecta.....	1
2. Aspectos gerais da espermatogênese dicotômica em Lepidoptera.	3
3. Justificativas e Objetivos.....	7

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta e Criação.....	9
2. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	10
3. Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	14

RESULTADOS

1. Espermiogênese Apirene	
1.1. Estágios de desenvolvimento.....	17
1.2. Resultados especiais obtidos com os Métodos IV e V.....	24
2. Junções Intercelulares.....	25
• Figuras - Espermiogênese Apirene e Junções.....	26
3. Espermiogênese Eupirene	
3.1. Formação do acrosoma, transformações nucleares e alongamento da cabeça das espermátides.....	40
3.2. Formação e desenvolvimento do complexo mitocondrial e sua transformação em derivados mitocondriais.....	44
3.3. Desenvolvimento do flagelo: as transformações do axonema e dos derivados mitocondriais durante o alongamento.....	46
3.4. Descrição sucinta dos estágios.....	51
3.5. Detecção de proteínas básicas com E-PTA.....	57
3.6. Microscopia de Varredura	
3.6.1. Montagem total de espermatozóides.....	58
3.6.2. Criofratura de testículo de imago.....	58
• Figuras.....	59

4. Espermatozóides eupirenes e apirenes na vesícula seminal e no ducto ejaculador duplo.....	80
• Figuras.....	83

DISCUSSÃO

1. Espermiogênese Apirene	
1.1. Micronúcleos e enucleação.....	93
1.2. O capuz denso apical.....	95
1.3. A extremidade anterior do flagelo.....	96
1.4. O desenvolvimento do flagelo: o axonema e os derivados mitocondriais.....	97
2. Espermiogênese Eupirene	
2.1. A cabeça das espermátides: o acrosoma, as transformações nucleares e as estruturas associadas.....	100
2.2. A peça intermediária: o centríolo e o adjunto do centríolo.....	106
2.3. A evolução do complexo mitocondrial e os derivados mitocondriais.....	109
2.4. O axonema e as estruturas associadas.....	110
2.5. Os apêndices da superfície celular.....	112
3. Junções Intercelulares e Barreira hemato-testicular.....	113
4. Espermatozóides eupirenes e apirenes na vesícula seminal e no ducto ejaculador duplo.....	115
RESUMO.....	117
ABSTRACT.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

INTRODUÇÃO

Alabama argillacea Hübner (1818), cuja lagarta é conhecida vulgarmente como "curuquerê-dos-algodoeiros", é um inseto holometábolo (metamorfose completa), de hábitos noturnos, que se multiplica principalmente durante os meses chuvosos (janeiro e fevereiro). O controle deste inseto, que já foi considerado uma das maiores pragas de plantações de algodão (*Gossypium* sp.) em nosso país, há muito tempo vem sendo realizado por meio de uso intensivo e indiscriminado de inseticidas químicos com prejuízo colateral ao meio-ambiente.

Apesar de a *A. argillacea* ser conhecida como praga de algodoeiros há mais de 400 anos no Brasil, somente há cerca de 20 anos foram publicados estudos biológicos e anatômicos mais detalhados sobre esta espécie (Habib, 1976, 1977). Com o intuito de ampliar os conhecimentos biológicos a respeito da reprodução desta devastadora praga agrícola, nós descrevemos, há pouco mais de 10 anos, a morfologia dos aparelhos reprodutores masculino e feminino deste lepidóptero e a ultra-estrutura dos seus dois tipos normais de espermatozóides (eupirenes - nucleados e apirenes - anucleados), bem como algumas modificações ultra-estruturais destes, nos ductos genitais da imago macho e na espermateca da imago fêmea (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988).

1. Aspectos Gerais da Espermatogênese em Insecta

A espermatogênese nos insetos, como nos animais em geral, compreende todo o processo de multiplicação, desenvolvimento e maturação das células espermatogênicas até a formação dos espermatozóides ou gametas masculinos haplóides. Nos Lepidoptera (borboletas e mariposas), assim como nas outras

ordens de insetos, os espermatozóides se desenvolvem no interior de cistos ou espermatocistos, contidos nos folículos testiculares. Em cada folículo, a maturação dos cistos ocorre no sentido apical-basal (Hannah-Alava, 1965; Szöllösi, 1982). Nos insetos, os envelopes finos dos cistos são formados por um número geralmente pequeno de células epiteliais planas adjacentes (células císticas), entre as quais surge um sinuoso sistema de espaços intercelulares, onde ocorrem com frequência extensas junções septadas e do tipo *zonula adherens*, além de junções oclusivas e do tipo "gap" ou em hiato (Noirot-Timothee & Noirot, 1973; Toshimori, Iwashita & Oura, 1979; Szöllösi, Riemann & Marcaillou, 1980; Szöllösi, 1982; Lane, 1982; Baldwin, Loeb & Riemann, 1987; Lane *et al.*, 1994). A presença destas junções entre as células do envelope cístico cria uma espécie de barreira celular, a chamada "barreira hemato-germinativa" (Marcaillou & Szöllösi, 1975; Szöllösi & Marcaillou, 1977, 1980; Jones, 1978; Szöllösi, Riemann & Marcaillou, 1980; Szöllösi, 1982; Miranda & Cavicchia, 1986), fisiologicamente equivalente à "barreira hemato-testicular" que ocorre na parede dos túbulos seminíferos de mamíferos, já conhecida desde o início do século.

No interior dos espermatocistos, as células espermáticas se desenvolvem geralmente de modo sincrônico (para revisão geral, ver Philips, 1970; Baccetti, 1972; Jamieson, 1987a). Na maioria dos lepidópteros, em cada espermatocisto, as células goniais definidas, oriundas das espermatogônias indefinidas (nomenclatura de acordo com Hannah-Alava, 1965), passam por 6 mitoses sucessivas, produzindo 64 espermatócitos primários, os quais entram em meiose (2 divisões sucessivas), resultando em 256 espermátides, que é um número correspondente a 2^n , sendo "n" igual ao número de divisões celulares ocorridas durante a espermatogênese de insetos (Virkki, 1969, 1973; Phillips, 1970). As espermátides se desenvolverão em 256 espermatozóides após passarem pelo período de maturação pós-meiótica, conhecido genericamente

como espermiogênese e que corresponde ao período da espermatogênese, abrangendo um conjunto seqüencial de profundas alterações morfo-funcionais.

Nos Lepidoptera, como em outros insetos, as citocineses, que ocorrem no final das divisões mitóticas sincrônicas durante o período multiplicativo das células espermáticas, são incompletas e, conseqüentemente, espermatogônias e espermátocitos permanecem interligados por meio de pontes citoplasmáticas (King & Akai, 1971; King, Cassidy & Rousset, 1982; Mandelbaum, 1980). Estas pontes intercelulares também foram observadas entre espermátides jovens da mariposa *Hyalophora cecropia* (Mandelbaum, 1980) e entre espermátides de diferentes estágios de outras espécies de insetos das ordens Blattodea (Krishan & Buck, 1965), Orthoptera (Carlson & Handel, 1988), e Diptera (Quagio-Grassiotto, 1993; Quagio-Grassiotto & Lello, 1996).

2. Aspectos Gerais da Espermatogênese Dicotômica em Lepidoptera

O polimorfismo de espermatozóides, observado com freqüência em diversos filos de invertebrados, particularmente em certos grupos de moluscos gastrópodos, turbelários, rotíferos, anelídeos e insetos, refere-se à produção de mais de um tipo de espermatozóide no mesmo indivíduo (revisão - Fain-Maurel, 1966; Jamieson, 1987a). Os animais, que têm recebido especial atenção quanto ao polimorfismo de seus gametas masculinos são os Lepidoptera, nos quais um dos tipos de espermatozóides, considerado típico (ou normal) por conter quantidade normal de cromatina (eupirene), é responsável pela fertilização do óvulo; enquanto que o outro tipo, considerado atípico (ou "anormal"), é infértil por ser anucleado (apirene).

Nos folículos testiculares da maioria dos lepidópteros, formam-se distintamente e em tempos diferentes, dois tipos bem diferenciados de espermatozocistos, a saber: os *eupirenes*, nos quais se desenvolvem os longos feixes de espermatozóides nucleados e os *apirenes*, no interior dos quais são

produzidos os feixes menores de espermatozóides anucleados (Fain-Maurel, 1966; Jamieson, 1987a - revisões). Os espermatozóides eupirenes e apirenes foram denominados de "eu-espermatozóides" e de "para-espermatozóides", respectivamente, por Jamieson (1987a), porém nós continuamos utilizando a terminologia proposta originalmente por Meves (1903 - apud Fain-Maurel, 1966), a qual é a mais difundida nos estudos da espermatogênese dicotômica em Lepidoptera.

A literatura científica revela um número expressivo de trabalhos de microscopia de luz que tratam de vários aspectos (organização testicular, motilidade e comprimento dos espermatozóides, comportamento intra e pós-testicular dos espermatozóides, tempo de diferenciação, entre outros) relacionados à espermatogênese de diversas espécies de lepidópteros (Virkki, 1963; Chaudhury & Raun, 1966; Shen & Berryman, 1967; Retnakaran, 1970; Holt & North, 1970; Chen & Graves, 1970; Chase & Gilliland, 1972; Garbini & Imberski, 1977; Katsuno, 1977a,b,c, 1978a,b, 1987; Leviatan & Friedländer, 1979; Gelbic & Metwally, 1981; Corsatto-Alvarenga, Cestari & Ribeiro, 1987; Sridevi, Dutta-Gupta & Ramamurty, 1989; entre outros). A maioria, porém, apresenta limitações seja quanto ao reconhecimento dos dois tipos de espermatozóides ou quanto à diferenciação entre os processos de formação dos espermatozóides eupirenes e apirenes e, principalmente, quanto à morfologia desses dois tipos de células espermáticas. Isto se deve ao estreito poder de ampliação e de resolução dos equipamentos ópticos utilizados, à limitação das técnicas histológicas usadas e à dificuldade de reconhecimento desses dois processos distintos em microscopia de luz. O estudo mais recente de microscopia de luz, associado à microscopia eletrônica de transmissão, sobre a espermatogênese eupirene e apirene das borboletas *Methona themisto* (praga-do-manacá) e *Dione juno* (praga-do-maracujá), ambas da Família Nymphalidae, foi realizado por Corsatto-Alvarenga (1989). A autora realizou uma análise ampla e detalhada, em microscopia de luz, da organização testicular e dos dois

tipos de processos espermatogênicos, porém as poucas micrografias eletrônicas apresentadas serviram, principalmente, para a caracterização morfológica de espermatogônias definidas e de espermátocitos I e II eupirenes e apirenes; a informação ultra-estrutural apresentada sobre o período de maturação pós-meiótica das espermátides eupirenes e apirenes é insuficiente para caracterizar a sua transformação em espermatozóides.

A maioria dos trabalhos de microscopia eletrônica, realizados nos últimos 35 anos, e que se referem à espermatogênese dicotômica de diferentes espécies de Lepidoptera pertencentes às Famílias mais evoluídas da Sub-Ordem Ditrysia, tratam apenas de alguns aspectos relacionados à produção e/ou à morfologia dos dois tipos de espermatozóides intra e extra-testiculares (André, 1962; Yasuzumi & Oura, 1964a,b, 1965a,b; Friedländer & Wahrman, 1970, 1971; Riemann, 1970; Riemann & Thorson, 1971; Phillips, 1971; Friedländer & Gitay, 1972; Riemann & Gassner, 1973; Friedländer & Miesel, 1977; Medeiros, 1986; Jamieson, 1987a; Medeiros & Dolder, 1988; Corsatto-Alvarenga, 1989; Medeiros, Silveira & Dolder, 1992; Marec, 1993; Medeiros & Silveira, 1993, 1996, 1997). Nos últimos 10 anos, destacam-se sobretudo os trabalhos de Wolf e colaboradores, centrados principalmente na caracterização morfológica ultra-estrutural e imunocitoquímica dos espermátocitos primários e secundários de espécies de lepidópteros das Famílias Arctiidae, Lymantriidae, Nymphalidae e Pyralidae (Wolf & Traut, 1987, 1991; Wolf, Baumgart & Traut, 1987, 1988; Wolf & Kyburg, 1989; Wolf & Bastmeyer, 1990, 1991a,b; Wolf, 1990a,b, 1992, 1997).

Apesar de a espermatogênese dicotômica dos Lepidoptera estar sendo investigada desde o início deste século, apenas os estudos ultra-estruturais de Zylberberg (1969) e, principalmente, os de Lai-Fook (1982a,b) sobre as espécies *Pieris brassicae* (Pieridae) e *Calpodis ethlius* (Hesperiidae), respectivamente, bem como o trabalho de LaChance & Olstad (1988a,b) sobre a espermiogênese eupirene de *Heliothis virescens* (Noctuidae) contêm, em termos

gerais, descrições dos eventos característicos da maturação pós-meiótica das espermátides. No entanto, em nenhuma destas publicações foi apresentada alguma seqüência dos estágios, que abranja os eventos característicos da espermiogênese dicotômica, tal como o fizeram Stanley *et al.* (1972); Quagio-Grassiotto (1983, 1993) para espécies de Diptera; Szöllösi (1975) para Orthoptera e Lino Neto (1993) para Coleoptera.

Em espécies de lepidópteros micropterigídeos pertencentes à Sub-Ordem Zeugloptera, filogeneticamente menos evoluída que a Sub-Ordem Ditrysia, somente foram observados espermatozóides eupirenes, desprovidos de sua manta radial característica (Sonnenschein & Häuser, 1990); estes se assemelham aos espermatozóides de Trichoptera, que é considerada uma Ordem-irmã dos Lepidoptera, porém mais primitiva (Jamieson, 1987a - revisão).

Existe certa controvérsia quanto ao período do ciclo vital dos Lepidoptera, no qual já se pode distinguir as células espermáticas eupirenes das apirenes; esta fase parece depender da espécie considerada. Em termos gerais, admite-se que a espermatogênese eupirene, que precede a apirene, inicia-se durante o estágio larval, finalizando na pupação, podendo estender-se ao período imaginal, enquanto a apirene começa um pouco antes ou no início do estágio de pupa e finaliza mais tardiamente, na imago (Leviatan & Friedländer, 1979).

Quanto ao papel fisiológico desempenhado pelos espermatozóides apirenes (anucleados), há várias idéias a respeito e algumas são totalmente especulativas, como as de Silberglied, Shepherd & Dickinson (1984). Entretanto, já se sabe que os espermatozóides apirenes de *Bombyx mori* somente se tornam ativos durante o acasalamento enquanto descem pelo ducto ejaculador simples, permanecendo altamente móveis no espermatóforo transferido para a bolsa copuladora das imagos fêmeas (Tschudi-Rein & Benz, 1990), onde atuam na separação dos longos feixes eupirenes responsáveis pela fertilização (Katsuno, 1977c; Osanai, Kasuga & Aigaki, 1987).

3. Justificativas e Objetivos

Considerando:

(1) a importância da *A. argillacea* na agricultura, face aos prejuízos econômicos decorrentes da rápida destruição das folhagens dos algodoeiros promovida pela ação voraz das lagartas deste lepidóptero-praga em infestações anuais;

(2) a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento a respeito de aspectos biológicos da reprodução da *A. argillacea*, para que controles alternativos de populações deste inseto possam vir a ser desenvolvidos futuramente, visando a preservação do meio-ambiente;

(3) a importância filogenética e taxonômica atribuída, nestes últimos 25 anos, aos estudos de espermatologia comparada, principalmente nos Arthropoda e, particularmente, nos Insecta, sobretudo quanto à ultra-estrutura dos espermatozoides e dos seus processos de formação (André & Thiéry, 1970; Baccetti 1972, 1977, 1985, 1989; Baccetti & Afzelius, 1976; Friedländer, 1983; Jamieson, 1987a,b; Baccetti & Daccordi, 1988; Sonnenschein & Häuser, 1990; Dallai & Afzelius, 1993a,b, 1995; Dallai *et al.*, 1993; Jamieson, Ausio & Justine, 1995);

(4) o número restrito de trabalhos realizados nas últimas três décadas sobre aspectos ultra-estruturais da espermatogênese dicotômica de Lepidoptera, principalmente quanto ao processo de maturação pós-meiótica dos espermatozoides eupirenes e apirenes (Zylberberg, 1969; Friedländer & Wahrman, 1970, 1971; Friedländer & Miesel, 1977; Lai-Fook, 1982a,b; LaChance & Olstad, 1988a,b; Corsatto-Alvarenga, 1989);

propusemo-nos, no presente trabalho, em relação ao lepidóptero noctuídeo *A. argillacea*, a:

(1) descrever, caracterizando morfologicamente em nível ultra-estrutural, os estágios sucessivos da espermiogênese eupirene e apirene;

(2) ampliar as informações, obtidas anteriormente (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988), sobre as modificações ultra-estruturais, sofridas pelos dois tipos de espermatozóides durante o seu deslocamento através da vesícula seminal e do ducto ejaculador duplo das imagos;

(3) e, usando E-PTA (Ácido Fosfotúngstico Etanólico), detectar a presença de proteínas básicas nos dois tipos de espermatozóides.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Coleta e Criação

Lagartas de últimos estádios e pupas da mariposa *Alabama argillacea* (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae) foram coletadas em fevereiro de 1992 e janeiro de 1994, respectivamente, em plantações de algodão (*Gossypium* sp.) do sítio "Estiva" e da fazenda "Cocais do Rio Verde", situados em Casa Branca no Estado de São Paulo.

As lagartas e pupas foram trazidas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IFUSP em São Paulo, e as primeiras foram alimentadas com folhas dos algodoeiros de origem, ou de outros que plantamos no Viveiro de Plantas da USP para esta finalidade.

A maior parte das larvas coletadas desenvolveu-se em pré-pupas, as quais puparam em períodos de aproximadamente 24 horas. O estágio pupal durou, em média, 7 a 9 dias. As pupas foram selecionadas de acordo com suas características sexuais externas (Bourgogne, 1951) e distribuídas em caixas plásticas, cobertas com tule e forradas com papel-toalha seco. As caixas foram mantidas à temperatura ambiente e sob luz difusa. Em cada caixa foram colocadas cerca de 50 a 100 pupas, em número igual de machos e fêmeas. As imagos foram alimentadas com solução açucarada a 10% (Parra, 1992). Os indivíduos adultos, de hábitos noturnos, permaneciam pouco ativos durante o dia. Com a seqüência de acasalamentos múltiplos, que ocorriam sempre no período noturno, houve intensas e freqüentes oviposições. A partir destas, seguindo as condições sugeridas por Parra (1992), pudemos desenvolver criações em laboratório e acompanhar os estágios do ciclo biológico da *Alabama argillacea* durante 5 meses.

As dissecações destinadas às fixações para microscopia eletrônica foram diretamente realizadas em glutaraldeído a 0,25% - 0,5% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,15M, pH 7,2.

2. Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

O seguinte material foi estudado em M.E.: testículos de lagartas do 3º e do 6º estádios; de pré-pupas iniciais e avançadas; de pupas verdes recém formadas; de pupas de ca. 12 horas de idade, com 1 dia a 7 dias de idade; de imagos de 1 dia a 18 dias de idade, ductos espermáticos (vesículas seminais e ductos ejaculadores duplos) de imagos jovens e de imagos de idade mais avançada (15-18 dias). Os diferentes procedimentos de preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão são descritos a seguir.

Método I - Uso do fixador de Karnovsky (1965) modificado

a) Fixação em solução de glutaraldeído a 1,5% + paraformaldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M, pH 7,2 (molaridade final da solução fixadora igual a 622 mOsm/kg) - durante 2 a 3h, á temperatura ambiente;

b) lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,15 M, adicionado de sacarose, durante uma noite, com várias trocas;

c) pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,15 M, pH 7,2, durante 1 a 2h;

d) lavagem no mesmo tampão por 2h ou durante uma noite;

e) desidratação em série de concentração crescente de etanol (de 70 a 100%) por cerca de 3 h, seguida de uma mistura de etanol a 100% + óxido de propileno (1:1) por 5 min, e, por fim, somente óxido de propileno por mais 5 min;

f) infiltração, sob vácuo ou não, da amostra em mistura de óxido de propileno e resina epóxi Polybed 812 durante uma noite;

- g) inclusão das amostras na mesma resina;
- h) polimerização do material em estufa à temperatura de 58°C durante 5 dias.

As etapas de desidratação, infiltração e inclusão (c até h) foram padronizadas em todos os experimentos e, portanto, não serão mais descritas.

Método II - Fixação seqüencial (glutaraldeído + ósmio)

- a) Fixação em solução de glutaraldeído de 2 a 3,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,15 M, pH 7,2, por 2 a 3h 30 min (molaridade final da solução igual a 490 mOsm/kg);
 - b) lavagem em solução-tampão de cacodilato de sódio a 0,15 M, pH 7,2, adicionada de sacarose, durante 3 h ou uma noite, com várias trocas;
 - c) pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em solução-tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4, durante 1h 30min;
 - d) lavagem em solução-tampão de cacodilato de sódio a 0,15 M, pH 7,2, durante 4 h ou uma noite, com várias trocas.
-

Método III - Fixação de acordo com Simionescu & Simionescu (1976)

- a) Fixação em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15M, pH 7,1 (molaridade final da solução fixadora igual a 490 mOsm/kg) - de 2 a 3 h;
- b) lavagem no mesmo tampão, com adição de sacarose, durante uma noite inteira, com várias trocas;
- c) pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,15M, pH 7,1, de 1 h a 2h 30min;
- d) lavagem no mesmo tampão durante o período de 1 h a 2h 30min;

e) ação mordente: solução de ácido tânico a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, pH 7,0, durante 30 min;

f) lavagem em solução de sulfito de sódio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,0, durante 5 min.

Método IV - Fixação de acordo com Dallai & Afzelius (1990)

a) Fixação em uma solução de glutaraldeído a 2%, com adição de tanino a 1% e sacarose a 1,8%, em tampão fosfato Sörensen a 0,1M, pH 7,2, durante 3 dias ou de 7 a 8 dias;

b) lavagem em água destilada, com várias trocas, durante 1 hora;

c) contrastação em bloco com solução de acetato de uranila a 1% em água destilada durante 1 hora;

d) lavagem em água destilada, com várias trocas, durante, no mínimo, 1h

Método V - Uso do E-PTA (Ácido Fosfotúngstico Etanólico) modificado de Bloom & Aghajanian (1968)

a) Fixação em solução de glutaraldeído a 2 - 2,5% em tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 7,2, durante 50 min a 90 min;

b) lavagem no mesmo tampão, com adição de sacarose, durante uma noite sob refrigeração (ca. 4°C);

c) desidratação parcial em série de concentração crescente de etanol (75 a 95%);

d) impregnação e desidratação em E-PTA a 3% (Etanol a 100% + Ácido Fosfotúngstico) durante um período de 4 a 24 h, a frio (ca. 4°C);

e) desidratação final em óxido de propileno por 30 min, a frio, em função da reação exotérmica entre este solvente e o E-PTA.

Cortes semi-finos (0,5 µm de espessura) para análise preliminar em microscopia de luz foram obtidos com o ultramicrotomo Porter Blum MT-2B e corados com solução alcalina de azul-de-toluidina de 0,5 a 1% em 1% bórax. Os cortes ultra-finos foram feitos com auxílio de navalha de diamante, coletados em telinhas de cobre sem película suporte e pós-contrastados com soluções aquosas de acetato de uranil a 2% durante 15 a 30 min e de citrato de chumbo durante 2 a 5 min. Os cortes finos procedentes das amostras fixadas de acordo com o método V (E-PTA) foram observados também sem pós-contrastação. Alguns cortes do material, preparado pelo método I, foram processados para detecção de glicogênio (Afzelius, 1992): solução aquosa de tanino a 1% por 30 min, seguida de solução aquosa de acetato de uranil a 4% por 60 min.

A maioria dos cortes finos foi observada no microscópio eletrônico de transmissão SIEMENS ELMISKOP 101 (operado a 100kV) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IFUSP. Alguns cortes finos do material fixado pelo método IV, devido ao grande contraste do material, foram observados no MET PHILIPS CM 200, (200kV), do mesmo laboratório. Utilizamos, também, os microscópios eletrônicos de transmissão: (a) JEOL 100 CX-II (operado a 80 kV) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; (b) ZEISS EM 900 (operado a 80kV) do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da USP. Para o registro da maior parte das nossas observações, utilizamos filmes fotográficos KODAK 4489 ("ESTAR thick base").

O processamento fotográfico subsequente foi realizado nas câmaras escuras do LME do IFUSP. Na ampliação fotográfica, utilizamos os ampliadores DURST Laborator 54 e 1200 e papel resinado da marca Kodak, tipo Kodabrome Print RC-F3 e F2. No presente trabalho, as pranchas de micrografias eletrônicas foram reproduzidas em copiadora da marca Xerox DUCU-COLOR em papel "couché" brilhante.

3. Processamento para Microscopia Eletrônica de Varredura

Método I - Montagem Total de Espermatozóides (modificado de Marchant & Thomas, 1983)

Testículos e ductos espermáticos (vesícula seminal e 'duplex') de imagos jovens foram dissecados em solução de Ringer para insetos e, a partir de um homogeneizado celular, obtiveram-se suspensões de espermatozóides intra e extra-testiculares. O procedimento seguiu o roteiro abaixo:

a) com auxílio de pipeta Pasteur, gotas das suspensões celulares foram depositadas, em separado, sobre fragmentos de lamínulas cobertos previamente por uma fina película do adesivo policatiônico, poli-L-lisina a 0,1% em água destilada;

b) aguardou-se alguns minutos para permitir a decantação e a adesão dos espermatozóides ao substrato;

c) em seguida, os espermatozóides foram expostos, sob uma campânula de vidro, a vapores de tetróxido de ósmio a 4% por 30s a 60s e, após, lavados gentilmente em água destilada;

d) as amostras foram, então, desidratadas em série de concentração crescente de etanol (75 a 100%);

Todas as amostras desta preparação e das que se seguem, foram secas pelo método do ponto crítico, usando CO₂, montadas, cobertas com ouro e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 840 A do LME do IFUSP, operado em tensão aceleradora de 5 kV a 25 kV.

Testículos e ductos espermáticos de imagos jovens (vesícula seminal e duplex) foram, também, submetidos à criofatura em etanol 100% e em DMSO (dimetilsulfóxido) 50%, cujos roteiros são descritos a seguir.

Método II - Criofratura em Etanol a 100%, modificado de Humphreys, Spurlock & Johnson, (1974)

a) Fixação em glutaraldeído a 1,5% + paraformaldeído a 1% em solução-tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (osmolaridade total da solução fixadora igual a 499mOs/kg) - ca. 24 h, à temperatura ambiente;

b) lavagem, a frio, no mesmo tampão adicionado de sacarose - ca. 10 dias;

c) pós- fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 2 h;

d) maceração, à temperatura ambiente, em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 0,1% - ca. 48 h;

e) lavagem no mesmo tampão, com várias trocas - de 40 min a 2 h;

f) impregnação em solução aquosa de tanino a 2% por 2 h, seguida de breve rinçagem em água destilada;

g) desidratação em série de concentração crescente de etanol (75-100%) durante 1 h;

h) a seguir, as amostras, em etanol absoluto, foram transferidas para tubinhos "Parafilm", congeladas em nitrogênio líquido e criofraturadas. Usou-se um cilindro maciço de latão, imerso em um recipiente com o mesmo líquido congelante;

i) com auxílio de uma navalha metálica, previamente resfriada em nitrogênio líquido e fixada na extremidade de um cabo isolante, procedeu-se à criofratura dos espécimes sobre a superfície resfriada do cilindro metálico;

i) a secagem das amostras criofraturadas foi realizada em aparelho de ponto crítico, usando CO₂;

j) montagem das peças sobre os porta-objetos do M.E.V. com auxílio de fita adesiva dupla face e cola de prata, e cobertura das mesmas com ouro de acordo com o procedimento já descrito.

Algumas amostras, fixadas em solução de glutaraldeído a 2 - 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15M, pH 7,2, por 3 a 12 horas, foram maceradas

no tetróxido de ósmio a 0,1%, após a impregnação com solução de tanino. Outras amostras foram criofraturadas sem prévia maceração.

Estas amostras foram observadas no M.E.V., operado a 25 kV.

Método III - Criofratura em DMSO (Dimetilsulfóxido), modificado de Tanaka (1989)

O processamento do material foi idêntico ao do método anterior até a pós-fixação em tetróxido de ósmio. Após a lavagem em tampão, seguiu-se o seguinte roteiro:

- d) imersão em solução de DMSO a 25% em água destilada por 30 min;
 - e) imersão em solução de DMSO a 50% em água destilada por 30 min;
 - f) congelamento e criofratura das amostras, contidas em gotas de DMSO a 50%, sobre a superfície gelada do cilindro de latão;
 - g) retorno imediato das peças recém criofraturadas à solução de DMSO a 50% até descongelar à temperatura ambiente;
 - h) lavagens sucessivas em solução tampão para remover o DMSO;
 - i) pós-fixação em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1% por 1h;
 - j) maceração em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 0,1% - ca. 60 h;
 - k) lavagem em água destilada por 15 min;
 - l) impregnação em solução aquosa de tanino a 2% por 2 h;
 - m) lavagem em água destilada, com 4 trocas, durante uma noite no refrigerador;
 - n) impregnação adicional com solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 1 h;
 - o) lavagem rápida em água destilada;
 - p) desidratação, secagem em ponto crítico, montagem das peças, cobertura com ouro e observação ao M.E.V., conforme o descrito anteriormente.
-

RESULTADOS

1. ESPERMIOGÊNESE APIRENE

Em Lepidoptera, os espermatócitos I apirenes sofrem distribuição irregular dos cromosomas durante as divisões de maturação, resultando em vários grupos cromossômicos independentes, os quais originarão micronúcleos. Estes, no final da telófase II da meiose, durante a citocinese, encontram-se dispersos no citoplasma dos pólos das células espermáticas apirenes.

Para melhor compreensão dos eventos citológicos subsequentes, que caracterizam o processo da espermiogênese apirene, nós o separamos em seis estágios distintos, considerando os três seguintes aspectos: (1) a disposição inicial dos micronúcleos, seu deslocamento ao longo do flagelo e sua eliminação durante o alongamento das espermátides; (2) a formação e o desenvolvimento de um capuz denso na extremidade proximal do "corpúsculo basal" atípico, e as modificações destes durante a invaginação das espermátides no citoplasma da célula cística apical; (3) o alongamento e a modificação do flagelo em relação ao axonema e aos derivados mitocondriais.

A formação e o desenvolvimento do complexo mitocondrial ou "Nebenkern" até a formação dos derivados mitocondriais das espermátides apirenes e eupirenes serão descritos em conjunto (item 3.2), porque não observamos diferenças significativas entre os processos eupirene e apirene nesse aspecto particular.

1.1. Estágios de Desenvolvimento

Neste estudo, pudemos caracterizar a ultra-estrutura de 6 estágios do desenvolvimento das espermátides apirenes da *A. argillacea* até a formação dos espermatozóides contidos nos cistos testiculares. São eles:

Estágio 1. As espermatídes apirenes jovens são reconhecidas pela sua forma arredondada, pela presença de diversos micronúcleos distribuídos no citoplasma e pelo flagelo curto. Elas mantêm íntimo contato entre si, sendo freqüente a presença de junções do tipo septado entre elas (Fig.1). A maior quantidade de citoplasma concentra-se na região anterior da célula que é a mais volumosa (Figs. 1 e 2). O citoplasma rico em ribosomas livres mostra, também, algumas cisternas próximas do "corpúsculo basal" atípico (Figs. 1 e 2). Em cortes transversal (Fig. 1) e longitudinal (Fig. 2) desta área, em cada espermatíde, o corpúsculo basal está situado centralmente e rodeado por vários micronúcleos. A matriz do corpúsculo basal é elétron-denso em quase toda sua extensão e com uma pequena massa densa acolada à sua extremidade proximal (Fig 2). Na extremidade distal do corpúsculo basal, já se percebe a presença de um axonema, que se estende e em um flagelo curto (Fig. 2). Nos micronúcleos com envoltórios contínuos totalmente desprovidos de poros, há grumos esparsos de cromatina condensada (Fig. 1) ou a cromatina densa ocupa quase todo o espaço nuclear (Figs. 1 e 2). Às vezes, corpos multivesiculares são observados entre os micronúcleos.

Estágio 2. Nesta fase, as espermatídes, ainda bem unidas entre si, iniciam seu alongamento. Em cortes transversais das regiões mais anteriores, vêem-se complexos mitocondriais em início de formação, localizados ao lado de micronúcleos de tamanhos variados (Fig. 3). Os micronúcleos mais volumosos mostram grumos de cromatina condensada e os menores apresentam-se quase totalmente condensados. O "corpúsculo basal" situa-se anteriormente ao "Nebenkern" (ou complexo mitocondrial) no citoplasma dos flagelos. Nestes últimos, há muito citoplasma circundando os axonemas do tipo "9 + 2", e micronúcleos podem, ou não, ser observados nestas regiões. Nota-se, ainda, a presença de dictiosomas do complexo de Golgi próximos dos micronúcleos.

Estágio 3. As espermátides já estão em alongamento (Fig. 4). No citoplasma das extremidades mais proximais, localizam-se os "corpúsculos basais", onde ainda podem ser encontrados micronúcleos posicionados anteriormente aos "centríolos" (Fig. 4). Contudo, a maioria dos micronúcleos já está se deslocando ao longo dos flagelos. Estes últimos, em diferentes alturas de corte, mostram-se interligados por meio de pontes citoplasmáticas rodeadas por anéis densos (Figs. 4 e 12). Alguns micronúcleos, particularmente os menores com cromatina mais densa, localizados ou não próximos a corpos multivesiculares, podem aparentar situação de citólise (Fig. 4). Alguns deles até apresentam a cromatina vacuolizada. Outros, principalmente os maiores com cromatina mais dispersa, com frequência estão isolados no interior de grandes vacúolos (Fig. 5). Às vezes, percebe-se a liberação do material nuclear para o citoplasma dos flagelos, provavelmente devido à fusão da membrana vesicular com o envelope nuclear dos micronúcleos (Fig. 6). Nos flagelos em alongamento, os derivados mitocondriais estão em fase final de separação (Figs. 6). Os axonemas ainda se encontram no padrão microtubular do tipo "9 + 2". Ao longo do citoplasma flagelar, são encontrados com frequência dictiosomas do complexo de Golgi próximos aos micronúcleos e alguns corpos densos granulares de natureza desconhecida. O citoplasma denso mostra muitos polisomas livres e algumas cisternas do retículo endoplasmático (Figs. 4 e 5). No final desta fase, os "corpúsculos basais" bem densos, rodeados por escasso citoplasma, ocupam as regiões mais anteriores das espermátides mais alongadas e nota-se uma pequena depressão nas suas extremidades mais anteriores (Fig. 7). Algumas células encontram-se justapostas à membrana da célula cística apical ou já iniciando o processo de invaginação no citoplasma da mesma (Fig. 7).

Estágio 4. Nesta fase, em cortes longitudinais, as regiões anteriores ("cabeças") das espermátides apirenes apresentam-se mais alongadas e mais aprofundadas no citoplasma da célula cística apical (Fig. 8). Essas extremidades são praticamente ocupadas pelos corpúsculos basais de conteúdo pouco denso ou quase elétron-transparente, cujas regiões proximais aparecem parcialmente envoltas por capuzes densos (Fig. 8). Estes ocupam parte do espaço compreendido entre a membrana plasmática da espermátide e a da célula suporte. Mais tarde, os capuzes densos se expandirão, aumentando de volume e se diferenciando nesses espaços intercelulares em direção à região posterior dos "corpúsculos basais" (Figs. 9 e 10). Cortes transversais de regiões medianas (Fig. 11) e mediana-posteriores (Fig. 12) dos flagelos em alongamento mostram que os axonemas ainda são do tipo "9 + 2", porém os subtúbulos B dos pares periféricos já apresentam projeções lineares, que originarão os microtúbulos acessórios. Tanto os nove pares periféricos quanto os dois túbulos centrais mostram conteúdo elétron-transparente (Fig. 11). Os derivados mitocondriais, que ladeiam cada axonema numa disposição angular bem aberta, apresentam tamanhos e formas semelhantes, com pequenas variações. Seu conteúdo, geralmente, mostra-se um pouco mais elétron-denso que o citoplasma circundante (Figs. 11 e 12). No citoplasma flagelar, observam-se cisternas lisas ao redor do axonema, alguns microtúbulos citoplasmáticos próximos aos derivados mitocondriais e muitos polisomas livres (Fig. 11). Nas regiões mais posteriores dos flagelos, percebe-se que ainda as células estão interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (Fig. 12), que serão eliminadas nas regiões flagelares mais posteriores. Micronúcleos isolados em vacúolos citoplasmáticos são também observados em alguns flagelos nessas regiões. Em cortes transversais de regiões subterminais dos flagelos (Figs. 15 e 16), as células do mesmo cisto podem ainda conter muito citoplasma ou este pode estar bastante reduzido. No citoplasma das espermátides com maior volume citoplasmático, observam-se com frequência massas densas irregulares

dispersas, as quais correspondem, muito provavelmente, às massas cromatínicas liberadas dos micronúcleos e que serão eliminadas *a posteriori*. São, também, observados várias unidades do complexo de Golgi (Fig. 15) próximos ou não dos axonemas, esparsas cisternas do retículo endoplasmático granular e diversos vacúolos de conteúdo claro e de tamanho variado nestas regiões dos flagelos (Fig. 16). Os axonemas mostram, em geral, a mesma estrutura das regiões flagelares medianas e, também, ao redor daqueles, nota-se a presença de cisternas geralmente lisas (Fig. 12). Em cistos de regiões terminais de flagelos apirenes (Fig. 13), os pares periféricos dos axonemas não mostram as projeções lineares nos subtúbulos B e, em alguns mais desorganizados, percebe-se a total ausência dos túbulos centrais. Vacúolos são observados junto aos axonemas em desorganização e, nas regiões flagelares mais terminais, observa-se o citoplasma ocupado principalmente por massas muito densas, esparsas ou concentradas, e nenhuma outra estrutura é mais observada. Entre os flagelos das espermatídes, tanto nas regiões medianas quanto nas posteriores, notam-se, com freqüência, pequenos septos entre as membranas plasmáticas das células justapostas (Fig. 11) que se assemelham às junções septadas das células císticas. No final desta fase (Fig. 14), os microtúbulos acessórios já estão completos, porém seu conteúdo ainda é elétron-transparente. Há, também, uma camada de cisternas lisas ladeando parcialmente os derivados mitocondriais.

Estágio 5. Em cortes longitudinais (Fig. 9), nota-se que as "cabeças" das espermatídes apirenes estão bem mais aprofundadas no citoplasma da célula cística apical, com regiões diferenciadas na estrutura do capuz proximal, que encobre também os "corpúsculos basais" e as porções iniciais dos flagelos (Fig. 10). À medida que progride o alongamento dos flagelos, o citoplasma vai gradualmente reduzindo seu volume; em cortes transversais de cistos inteiros e mais compactos (Figs. 17 e 18), observa-se ainda a presença de muitos polisomas livres. Micronúcleos, corpos multivesiculados, vacúolos e

dictiosomas golgianos não são mais observados tanto nas regiões medianas (Fig. 17) quanto nas regiões distais dos flagelos (Fig. 18). Às vezes, observam-se algumas espermatídes ainda conectadas por pontes citoplasmáticas (Fig. 17). Nas regiões medianas e distais dos flagelos (Figs. 17 e 18), notam-se várias expansões citoplasmáticas das células císticas para o interior dos cistos, bem como restos citoplasmáticos descartados das espermatídes. Durante este estágio, o filamento axial adquire sua configuração tubular definitiva do tipo "9 + 9 + 2" (Fig. 17 e encarte; e Fig. 18). O lúmen dos microtúbulos acessórios do axonema apresenta-se denso e notam-se finas pontes, interligando os referidos túbulos. Nos pares periféricos, os subtúbulos A mostram conteúdo denso e braços de dineína, mas os subtúbulos B permanecem com lúmen claro. Os derivados mitocondriais vão perdendo sua forma circular, adquirindo gradualmente o formato de "solas de sapatos" e dispendo-se paralelamente entre si (encarte da Fig. 17). Uma fileira simples de microtúbulos citoplasmáticos se dispõe entre os derivados e, junto às suas faces laterais, também são encontrados microtúbulos (um a vários). Na matriz de baixa elétron-densidade, em cada derivado, nota-se uma área mais densa que evoluirá em uma subestrutura paracristalina no espermatozóide atípico (encarte da Fig. 17).

Estágio 6. A espermiogênese apirene finaliza e os espermatozóides estão completos. As "cabeças" anucleadas dos espermatozóides estão completamente mergulhadas no citoplasma da célula cística, ocupando profundidades diferentes (Fig. 22, níveis A-J; Figs. 23 a 26). Em cortes transversais de material fixado de acordo com o método IV, pode-se observar bem a subestrutura e a diferenciação do capuz denso que recobre a extremidade anterior, bem como a organização gradual dos "centríolos" atípicos (Figs. 22 a 28). A região mais proximal da "cabeça" é formada apenas pelo capuz denso, no qual se diferenciam duas capas concêntricas (Fig. 22, nível A). A capa

externa mantém sua espessura, porém a interna diminui gradualmente à medida que os microtúbulos dos "centríolos" começam a ocupar o lúmen central de cada espermatozóide (Fig. 22, níveis B a J; Figs. 23 a 26). Na região posterior da "cabeça", que praticamente corresponde à porção inicial dos "centríolos", observa-se que os capuzes densos foram substituídos por capas estriadas transversalmente (Fig. 22, níveis K, L, M e N; Figs. 27 e 28). Em diferentes alturas de corte das "cabeças", percebe-se a organização gradual do "centríolo" atípico. Este começa com a formação da coroa mais periférica dos nove microtúbulos acessórios (Fig. 22, níveis B a G; Figs. 23 e 24), depois são formados os nove pares periféricos (Fig. 22, níveis H a K; Figs. 25, 26 e 27) e, finalmente, notam-se os dois túbulos centrais (Fig. 22, níveis L, M e N; Fig. 28), até à organização completa do axonema do tipo "9 + 9 + 2", o qual já se encontra livre no lúmen do cisto e recoberto por uma fina capa sem estrutura definida (Fig. 22, nível O), provavelmente oriunda do capuz denso. As porções iniciais dos flagelos ainda se encontram em contato parcial com projeções citoplasmáticas da célula cística apical.

Em secções transversais (Figs. 19 e 29) e em imagens de criofatura para microscopia eletrônica de varredura (Figs. 20 e 21) de cistos contendo flagelos de espermatozóides apirenes, observa-se que estes se agrupam de modo aleatório no lúmen dos cistos, ao contrário dos espermatozóides eupirenes que se ordenam de forma muito regular. Como já é conhecido para *A. argillacea* (Medeiros, 1986; Medeiros & Silveira, 1996), a região mediana da peça principal de cada flagelo apirene é formada por um axonema completo do tipo "9 + 9 + 2", por dois derivados mitocondriais de formato e tamanho iguais, dispostos numa configuração em "V" e pela membrana flagelar (Figs. 19, 29 e 30). Utilizando-se o método especial de fixação IV, pode-se observar com detalhes a subestrutura do axonema e dos derivados mitocondriais em cortes transversais de flagelos apirenes (Figs. 29 e 30). A parede de cada microtúbulo acessório é formada por 16 protofilamentos, e o seu lúmen é preenchido com 7

a 8 esférulas elétron-transparentes de posição periférica, mais 1 ou 2 centrais (Fig. 30). No material denso, que se interpõe entre os túbulos acessórios, distinguem-se duas regiões diferenciadas: uma mais espessa e próxima dos subtúbulos B dos pares periféricos, que contém 3 a 4 esférulas elétron-transparentes bem próximas do profilamento nº 3 (numeração de acordo com Witman *et al.*, 1972), e outra mais fina, que se liga aos túbulos acessórios vizinhos (Fig. 30). As paredes dos subtúbulos A e B dos pares periféricos apresentam 13 e 10 protofilamentos, respectivamente. Às vezes, nota-se um protofilamento adicional no subtúbulo B. Cada subtúbulo A possui lúmen elétron-denso, porém sem uma sub-estrutura definida como nos túbulos acessórios, e os subtúbulos-B mostram o lúmen parcialmente elétron-transparente ou com baixa densidade eletrônica (Figs. 29 e 30). A parede dos dois microtúbulos centrais é formada por 13 protofilamentos e o seu lúmen mostra-se transparente (Figs. 29 e 30). Em cortes transversais de regiões subterminais e terminais dos flagelos apirenes (Fig. 31), nota-se que, durante a gradual desorganização dos axonemas (níveis "a - d"), os pares periféricos são os primeiros a desaparecer, seguidos dos túbulos centrais, e, por fim, os últimos a se desorganizar são os túbulos acessórios, que mantêm sua subestrutura mesmo nas regiões mais distais dos flagelos.

1.2. Resultados especiais com os Métodos IV e V

Com a fixação IV, pode-se observar com mais detalhes, em cortes transversais, a subestrutura paracristalina de uma região da matriz densa dos derivados mitocondriais (Figs. 29 e 30). Esta fixação especial mostra, em cada derivado mitocondrial, que os nucleóides densos são formados por um empacotamento hexagonal de partículas espaçadas entre si por ca. 100Å (Fig. 30). As membranas dos envelopes mitocondriais e as membranas flagelares são ressaltadas em contraste "negativo" com este fixador especial (Figs. 29, 30 e 31).

Em corte transversal (Figs. 36 e 38) e longitudinal (Fig. 37) de cistos de espermatozoides apirenes fixados de acordo com a preparação V, pode-se verificar que: (a) nas regiões mais anteriores dos cistos apirenes (Figs. 36 e 37), o capuz que recobre a "cabeça" do espermatozoide e os microtubulos acessórios dos "centríolos" mostram reação positiva ao E-PTA; (b) e nos flagelos, os nucleóides densos e de natureza paracristalina dos derivados mitocondriais reagem positivamente ao E-PTA, bem como o conteúdo dos microtubulos acessórios axonemáticos (Fig. 38).

2. JUNÇÕES INTERCELULARES

Junções septadas, junções adesivas do tipo desmosoma e *zonulae adherentes* são freqüentemente observadas entre as membranas das células císticas que envolvem os flagelos apirenes e eupirenes (Figs. 32 a 35). Com a utilização da mistura fixadora especial à base de ácido tânico, foi possível observar-se, em cortes longitudinais, junções do tipo "gap" (Fig. 33), bem como detalhes subestruturais de junções septadas e de junções do tipo desmosoma (Fig. 34). Somente em estágios muito precoces da espermiogênese apirene, pode-se detectar a presença de septos finos semelhantes às junções septadas nas áreas de justaposição entre as espermátides (Figs. 1 e 11).

FIGURAS

Fig. 1 - Secção transversal de extremidades proximais de duas espermátides apirenes jovens, contendo micronúcleos (mn), dispostos ao redor de um corpúsculo basal (cb). Em dois micronúcleos vizinhos, é nítido o envoltório nuclear (setas). O espaço inter-celular mostra septos transversais esparsos (pontas de setas) semelhantes a junções do tipo septado. **36.000x.**

Fig. 2 - Secção longitudinal de uma área equivalente à da figura anterior. Na extremidade proximal do corpúsculo basal (cb), nota-se um acúmulo de material amorfo elétron-denso (ponta dupla de seta). Micronúcleos (mn) distribuem-se ao redor do corpúsculo basal. **50.000x.**

Fig. 3 - Grupo de espermátides jovens de um cisto apirene em alongamento. Observam-se micronúcleos (mn) de tamanhos bem diferentes apresentando regiões heterocromáticas irregulares. Destaque para o "Nebenkern" (nk) em fase inicial e localizado próximo aos micronúcleos. **12.500x.**

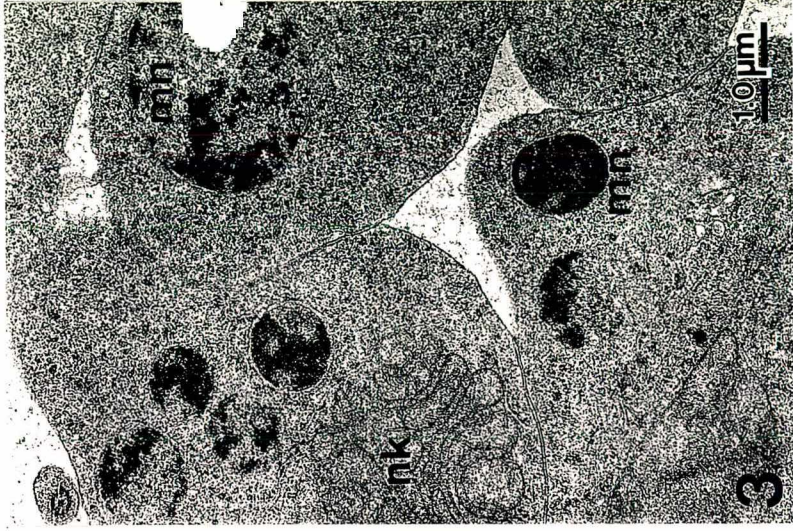
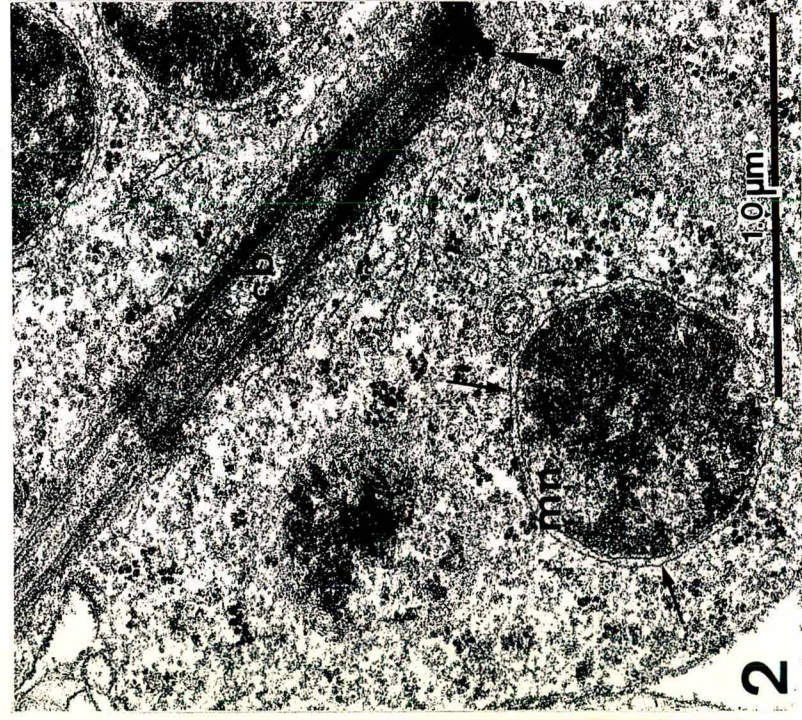
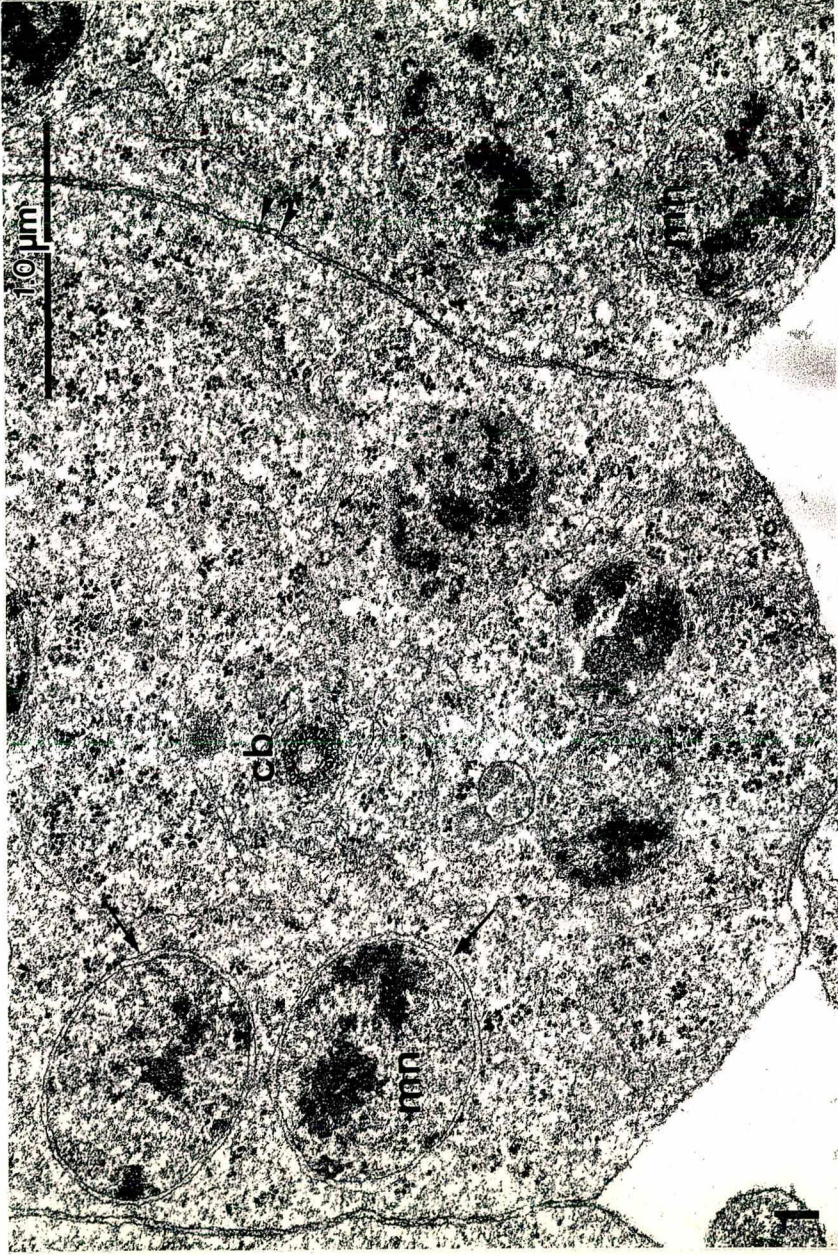


Fig.4 - Secção longitudinal da extremidade proximal de uma espermatíde apirene em alongamento. Observam-se dois micronúcleos (mn), um próximo ao corpúsculo basal (cb) e outro em posição mais caudal, próximo ao "Nebenkern" (nk) em desenvolvimento. Destacam-se, também, um corpo multivesiculado (cmv) e uma vesícula semelhante a um corpo residual (cr). Na espermatíde vizinha, a seta indica uma parte do anel denso (seta) de uma ponte citoplasmática. **25.000x.**

Fig. 5 - Micronúcleo (mn) isolado no interior de um vacúolo citoplasmático na região caudal de uma espermatíde apirene em alongamento. Observa-se um espaço dilatado e estreito (*) compreendido entre o envoltório nuclear (seta) e a membrana vacuolar, a qual por sua vez é contornada por cisternas lisas (pontas de setas). **50.000x.**

Fig. 6 - Em uma região mais distal do flagelo de uma espermatíde apirene, contendo axonema (ax) e derivados mitocondriais (dm), o espaço (*) ao redor de outro micronúcleo (mn) encontra-se bem reduzido. Há continuidade (ponta de seta) entre o envelope nuclear (seta) e as membranas do vacúolo que envolve parcialmente o micronúcleo. À direita, observa-se liberação do material cromatínico (cr) e do resto do material nuclear para o citoplasma. **34.500x.**

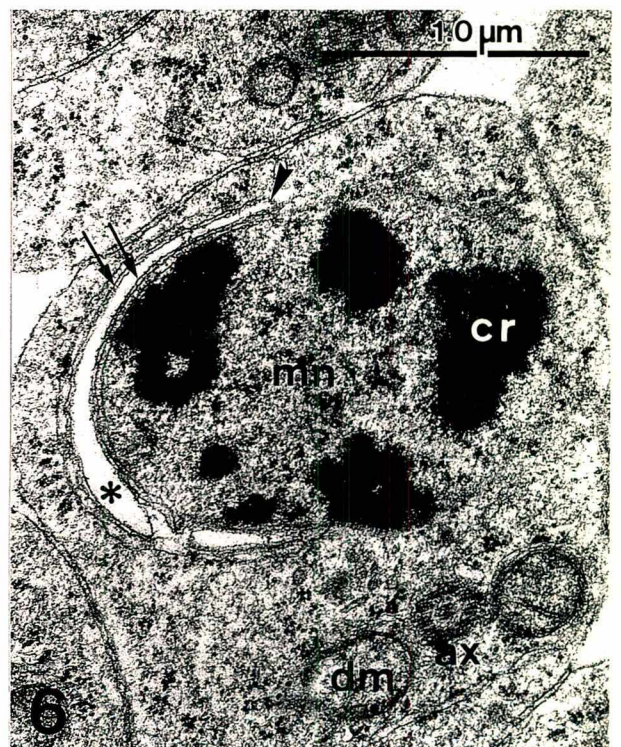
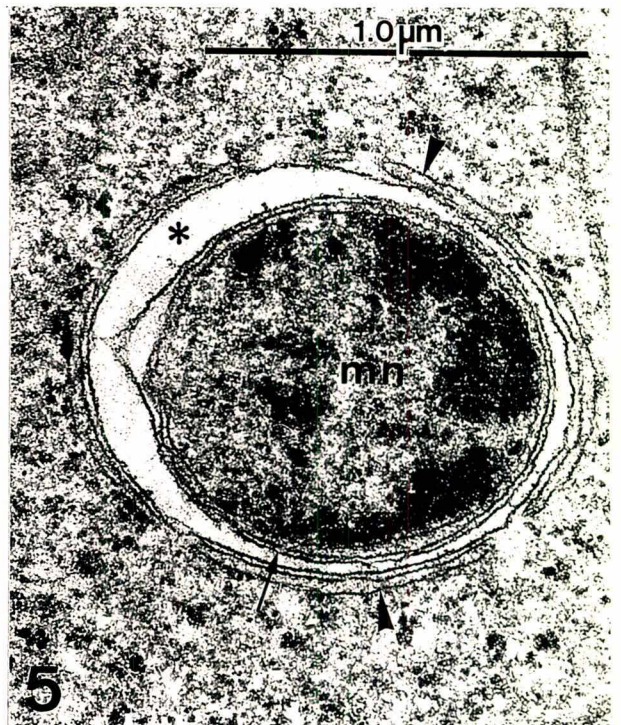


Fig. 7 - Cortes oblíquos de regiões proximais de um feixe de espermátides apirenes em alongamento, duas delas (1 e 2) justapostas à membrana plasmática da célula cística (cc). A região proximal da espermátide 2, onde se localiza o corpúsculo basal (cb), inicia a invaginar-se no citoplasma da célula cística. As pontas de setas indicam diferentes tipos de junções adesivas (*zonula adherens* e junção septada) entre as células císticas. **25.000x.**

Fig. 8 - Estágio mais avançado (3) da invaginação de espermátides no citoplasma da célula cística (cc). Na região mais proximal de cada espermátide, onde se localiza o corpúsculo basal (cb), observa-se que o capuz denso (ponta de seta) está mais desenvolvido. **20.000x.**

Fig. 9 - Estágio subsequente (4) da invaginação e transformação das extremidades proximais de espermátides em fase de alongamento. O capuz denso (CA) já está bem mais desenvolvido, apresentando regiões diferenciadas (setas). cb - corpúsculo basal. **30.000x.**

Fig. 10 - Cisto apirene em estágio bem avançado no processo de maturação, mostrando as regiões anteriores das espermátides, em diferentes alturas de corte, mergulhadas no citoplasma da célula cística (cc) e as regiões proximais dos flagelos (f). Entre os flagelos, observam-se prolongamentos (setas) da célula cística (cc), bem como porções de citoplasma eliminado das espermátides apirenes. As pontas de setas indicam junções adesivas entre as células císticas. À direita, observa-se parte de um septo testicular (ST). N - núcleo da célula cística. **10.000x.**

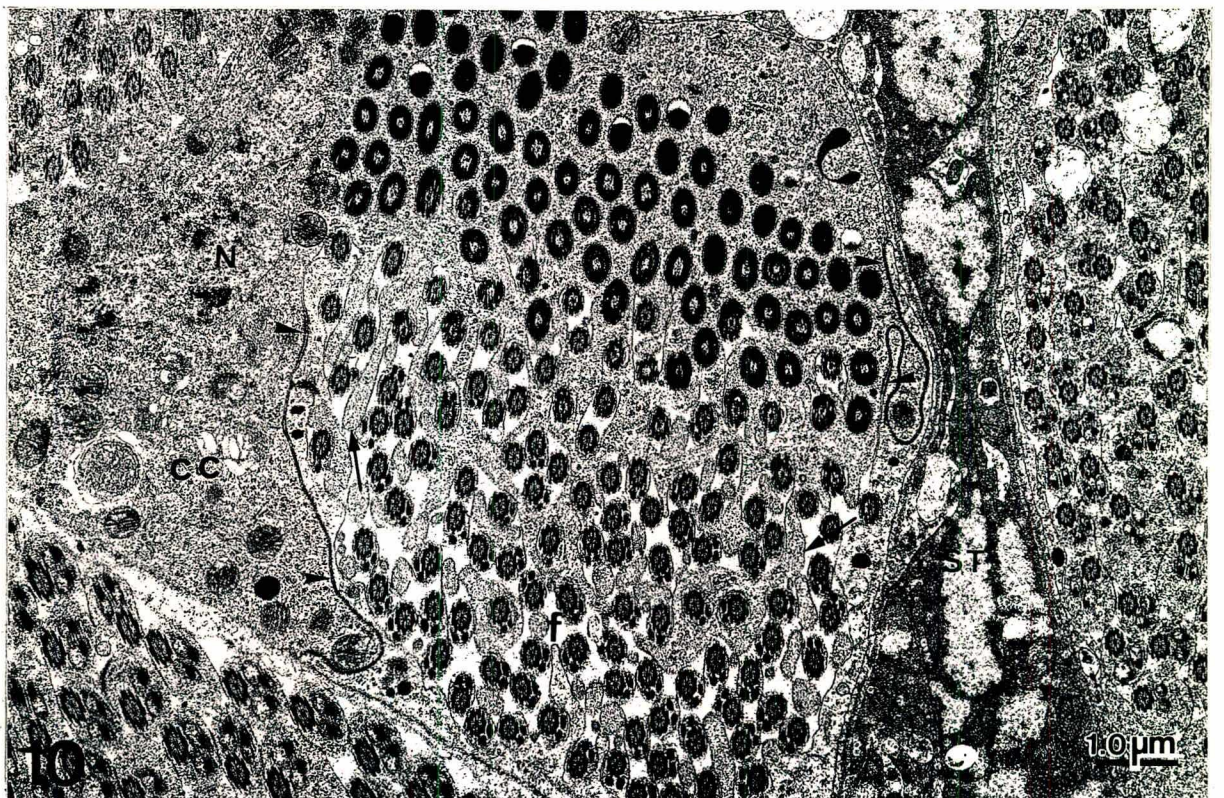
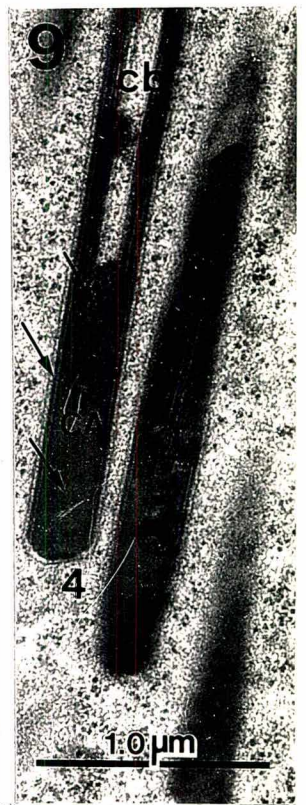
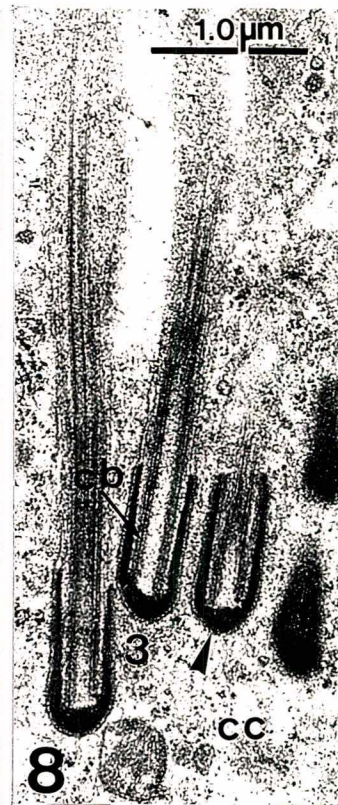
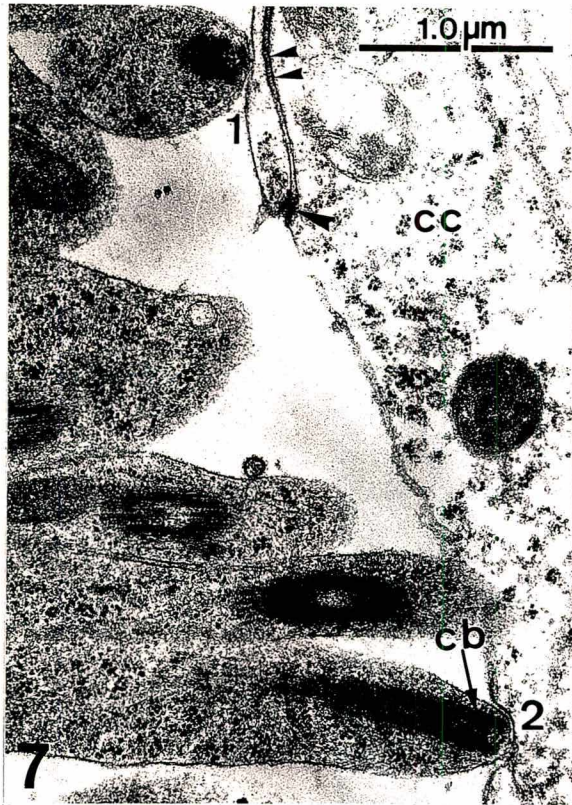


Fig. 11- Secção transversal de flagelos de espermátides apirenes ao nível da peça principal. Nos axonemas (ax) do tipo "9 + 2", observam-se pequenas projeções (pontas de setas menores) ligadas aos subtúbulos B das duplas periféricas. Os axonemas encontram-se parcialmente envoltos por cisternas lisas (setas maiores). Ladeando cada axonema, há dois derivados mitocondriais (dm) em uma disposição angular bem aberta. Presença de microtúbulos isolados (pontas de setas maiores). Grumos de ribosomas (ri). A membrana plasmática (setas menores) torna-se mais evidente nas áreas de justaposição. **46.500x.**

Fig. 12 - Corte transversal de flagelos interligados por meio de pontes citoplasmáticas (P) circundadas por anéis densos (pontas de setas maiores). Na região das pontes, não ocorrem organelas subcelulares. Os flagelos encontram-se em estágio de desenvolvimento semelhante aos da figura anterior. Observam-se, ainda, corpos densos (pontas de setas menores) de natureza desconhecida. **24.800 x.**

Fig. 13 - Porções subterminais de flagelos em corte transversal. A maioria dos axonemas (ax) apresenta ainda o padrão microtubular do tipo "9 + 2", com exceção de um deles (*) sem os microtúbulos centrais. As duplas periféricas não apresentam os braços de dineína nem as projeções lineares nos subtúbulos B, descritos na figura 11. **77.500 x.**

Fig. 14 - Secção transversal de um flagelo em estágio de desenvolvimento mais avançado que os anteriores. No axonema (ax), com padrão microtubular do tipo "9 + 9 + 2", nota-se a coroa de microtúbulos acessórios (pontas de setas maiores), com lúmen elétron-transparente. Nas duplas periféricas, os subtúbulos A e B mostram a organização típica. As pontas de setas menores indicam os braços de dineína. Cisternas lisas (setas finas) envolvem parcialmente os derivados mitocondriais (dm) e o axonema. Glicocálix evidente (seta curta). **100.000 x.**

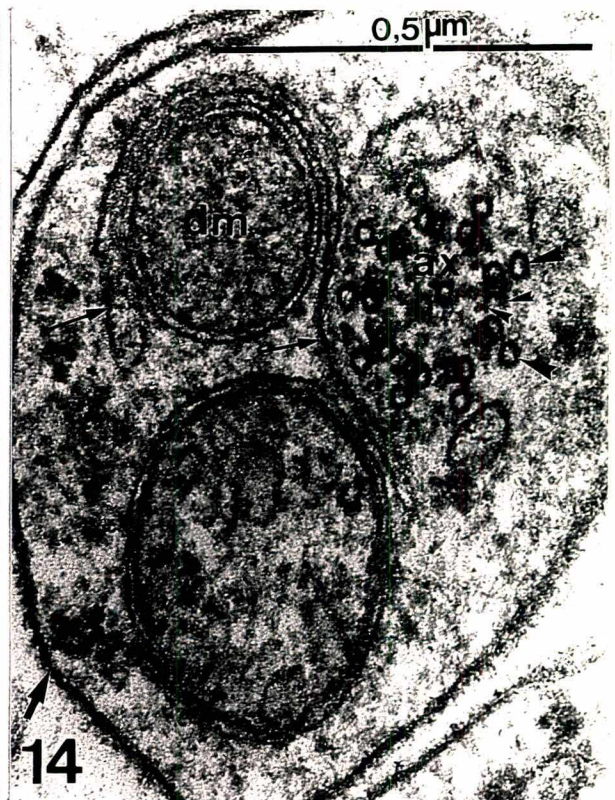
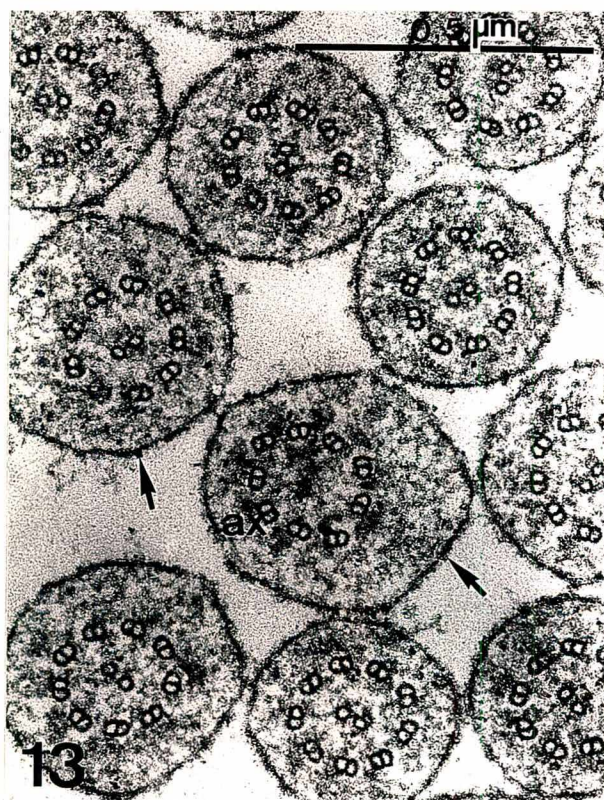
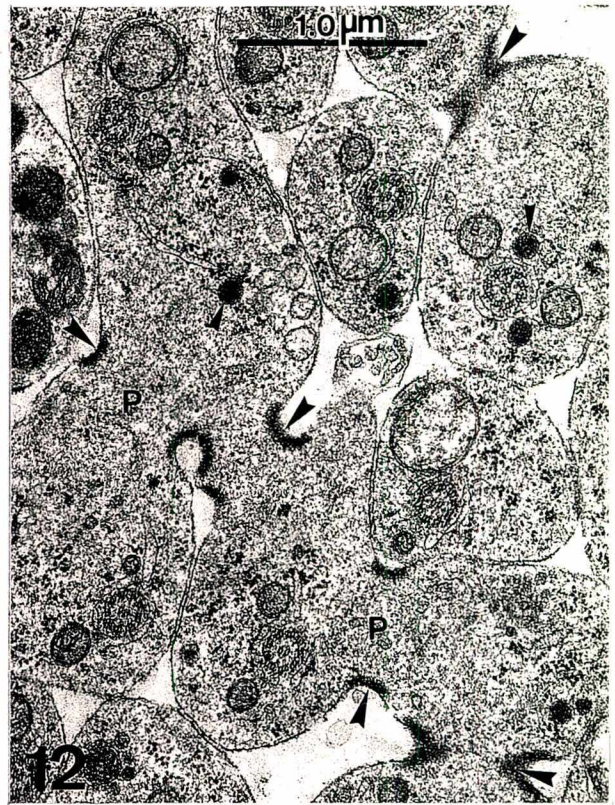
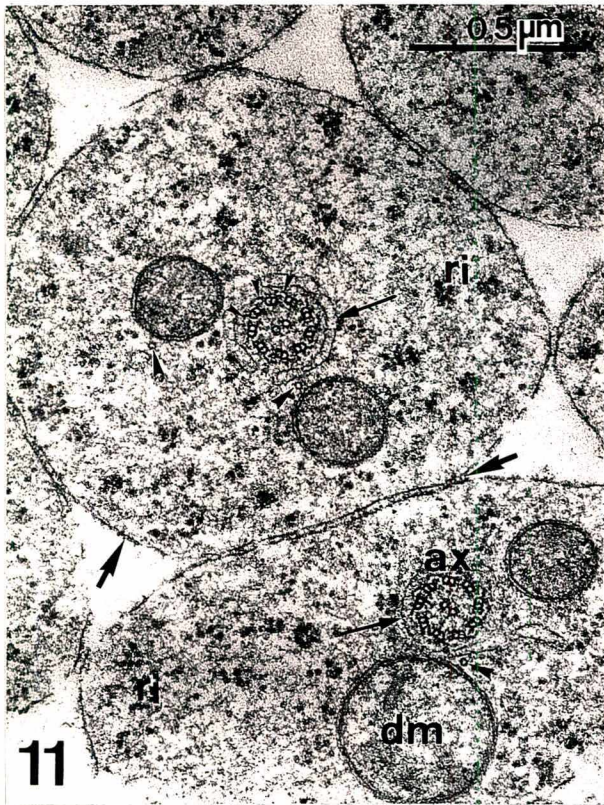


Fig. 15 - Porção de um cisto apirene compacto, mostrando um conjunto de espermátides seccionadas ao nível de regiões subterminais de flagelos em estágio evolutivo um pouco mais avançado que o da figura anterior. Em algumas espermátides, observam-se massas elétron-densas (pontas de setas) dispersas no citoplasma que provavelmente correspondem a grumos de cromatina oriundos de micronúcleos desintegrados. Detectam-se, também, axonemas (ax); retículo endoplasmático; grande quantidade de ribosomas livres (ri) e dois dictiosomas golgianos (G) bem desenvolvidos. 17.600 x.

Fig. 16 - Secção transversal de espermátides apirenes ao nível de regiões terminais e sub-terminais de flagelos, algumas delas contendo grumos densos de cromatina (pontas de setas maiores). Nas espermátides mais volumosas, o axonema (ax), apresentando ainda o padrão microtubular do tipo "9 + 2", encontra-se total ou parcialmente envolto por um envelope membranoso liso (pontas de setas menores). Em alguns flagelos, nota-se a presença de vesículas (v) de tamanhos variados com conteúdo luminal reticular e esparso. Nas porções mais terminais dos flagelos, o volume do citoplasma está bem reduzido, com aspecto mais homogêneo e sem grumos elétron-densos. Cobertura celular (setas) mais evidente nas áreas de justaposição celular. 18.600 x.

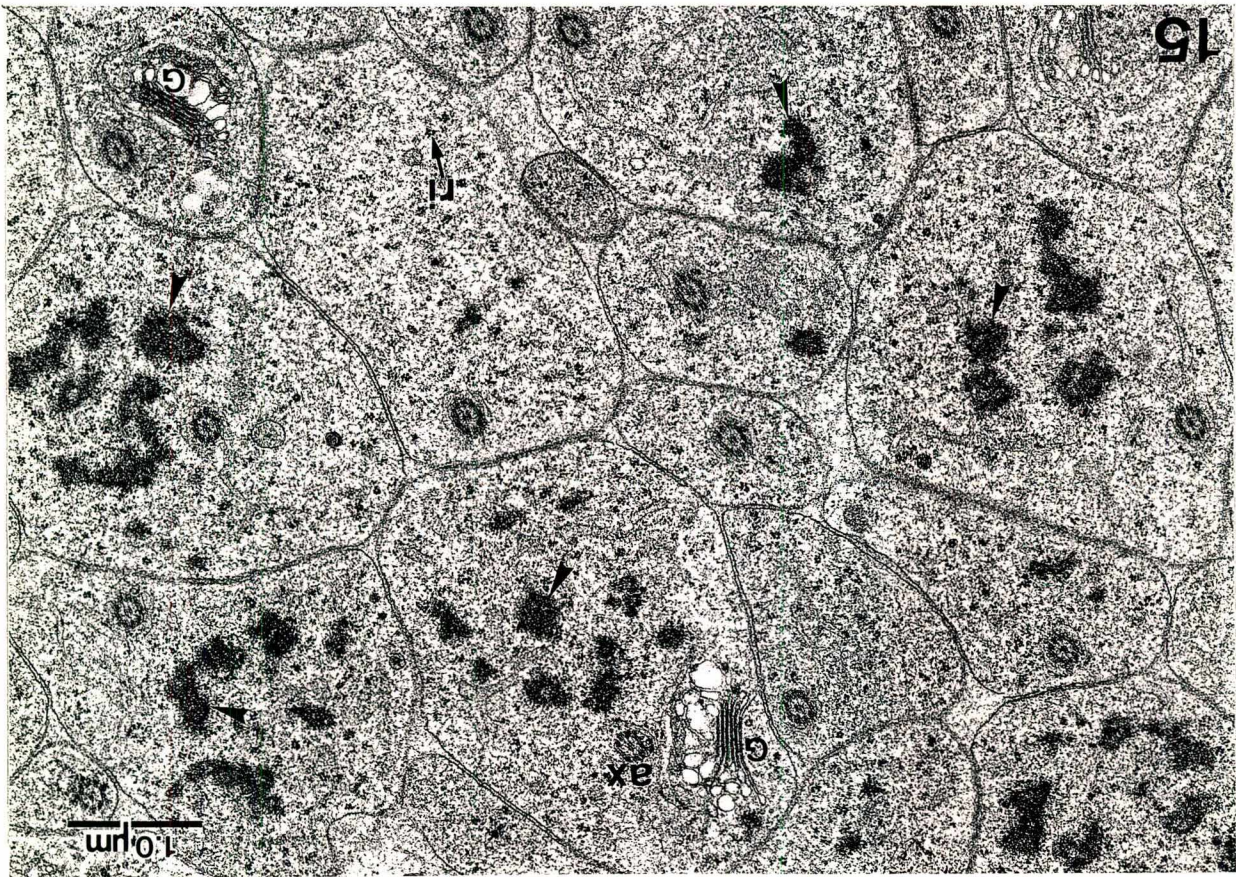
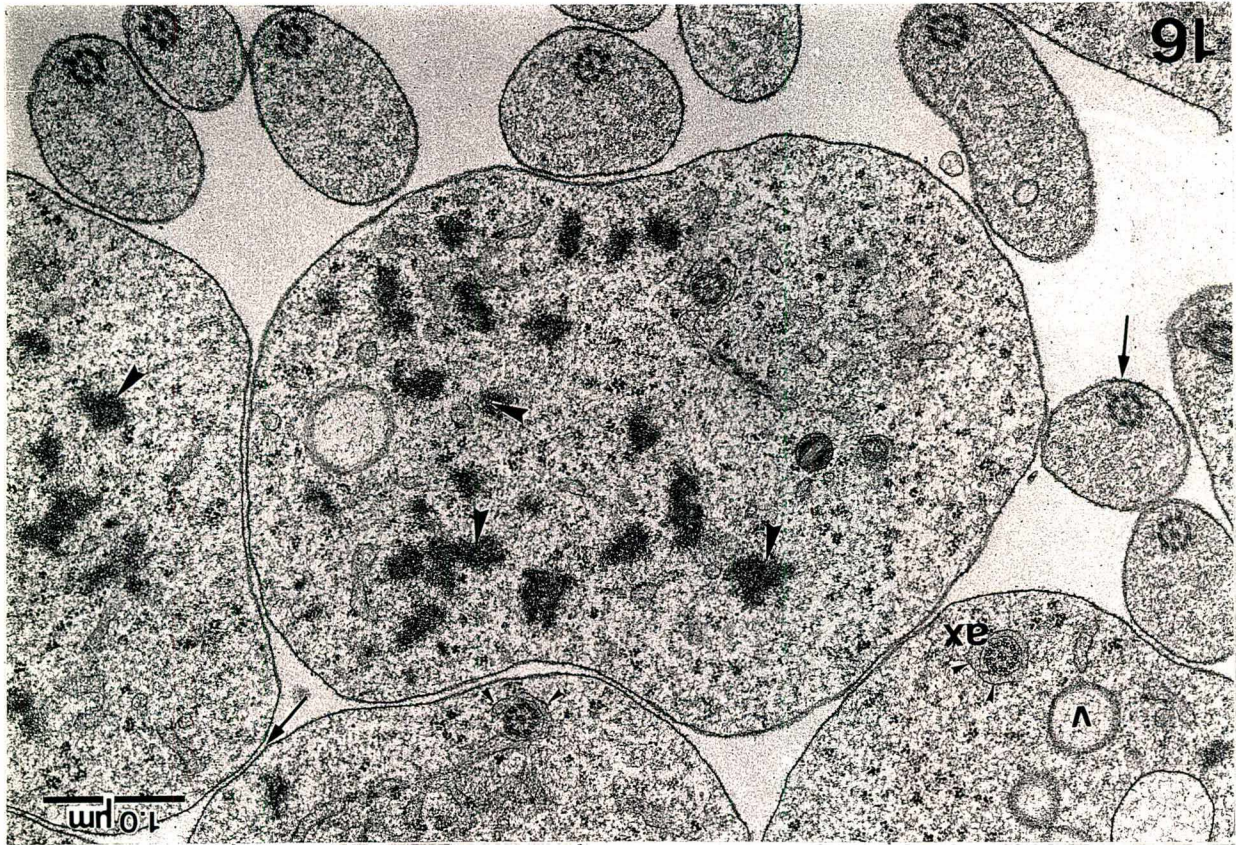


Fig. 17 - Secção transversal de um cisto apirene inteiro ao nível das peças principais dos flagelos (F). O cisto contém 256 espermátides entre projeções citoplasmáticas (setas curtas) das células císticas (cc) limitantes, unidas por várias junções (pontas de setas menores). Em duas espermátides, observa-se a presença de corpos densos granulares (pontas de setas maiores). À esquerda do cisto, notam-se espermátides ainda interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (setas finas e curtas). A seta fina e longa indica o flagelo da espermátide ampliada no encarte. 8.000 x.

Encarte: Corte transversal de um flagelo apirene da fig. 1. O axonema (ax) já apresenta o padrão completo de organização tipo "9 + 9 + 2". Os microtúbulos acessórios apresentam-se interligados por finas pontes (pontas de setas) e seu conteúdo luminal é denso. Apenas os subtúbulos A das duplas periféricas apresentam lúmen denso. Os dois túbulos centrais são elétron-transparentes. Os derivados mitocondriais (dm), com formato de "chinelos", apresentam-se mais ou menos paralelos entre si e possuem uma região circular densa (*) na porção lateral mais estreita. Presença de microtúbulos citoplasmáticos (pontas de setas) próximos aos derivados. O volume do citoplasma está bastante reduzido. 40.000 x.

Fig. 18 - Cisto apirene inteiro contendo 253 flagelos (F) seccionados ao nível de suas porções terminais. A grande maioria dos flagelos apresenta axonemas do tipo "9 + 9 + 2", porém alguns deles (seta) mostram uma configuração mais aberta, indicando início do processo de desorganização microtubular típica de região terminal flagelar. Observam-se acúmulos ribossomais (pontas de setas) no citoplasma de alguns flagelos. cc - célula cística. 12.500 x.

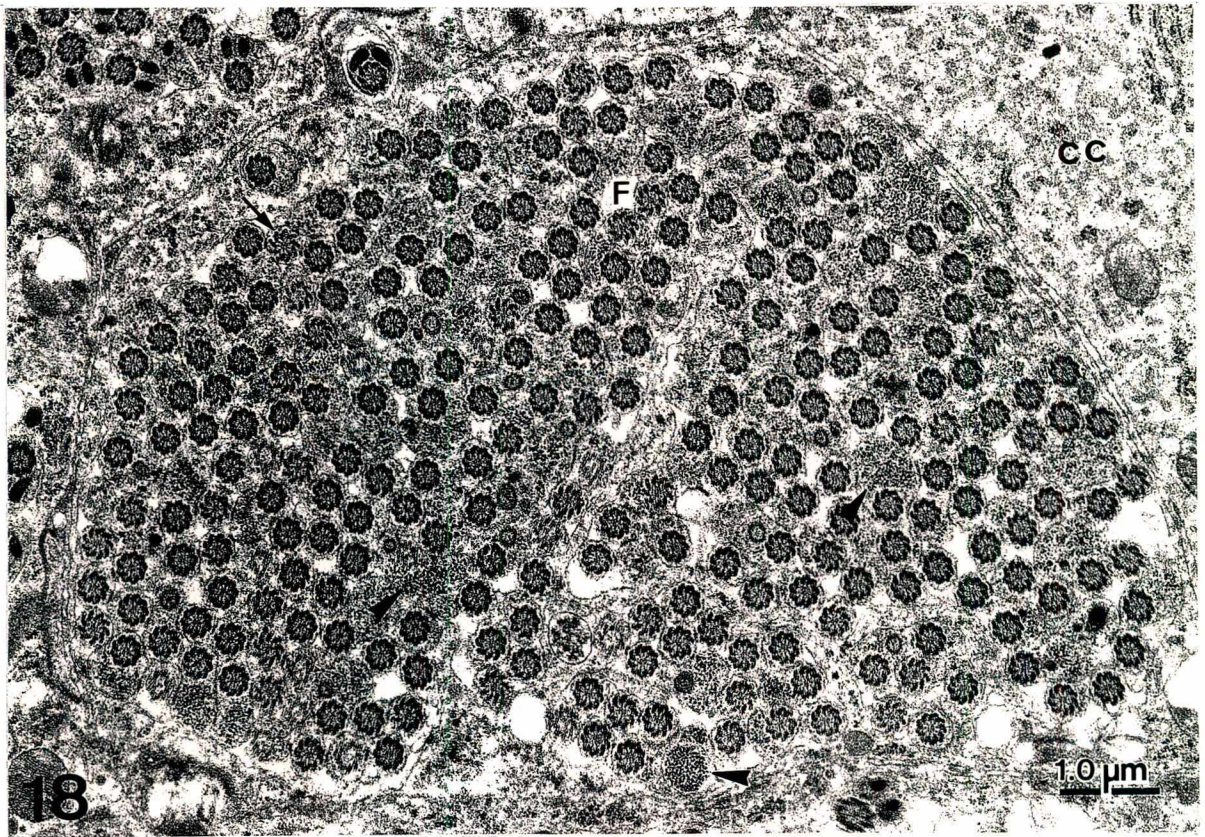
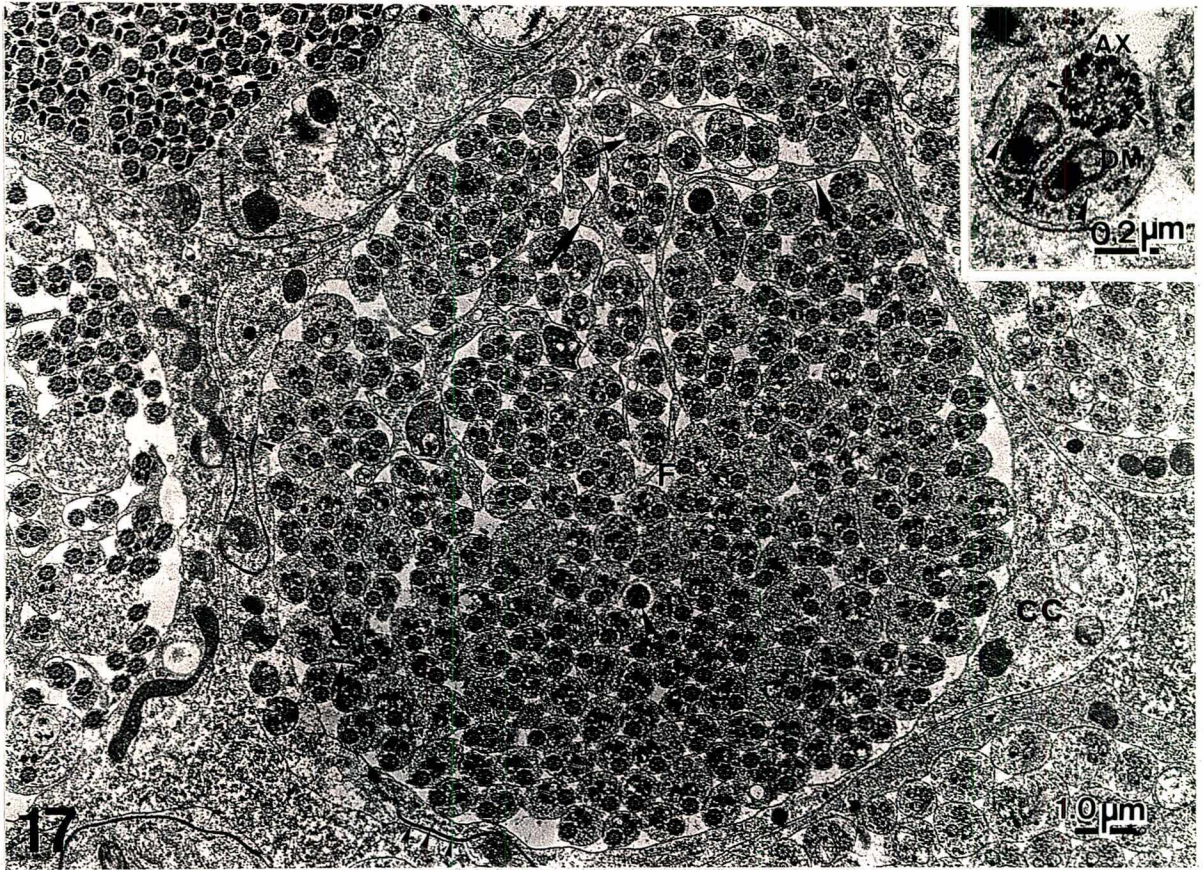


Fig. 19 - Corte transversal panorâmico de um cisto apirene inteiro contendo 256 flagelos (F) seccionados na altura de suas peças principais. **11.000 x**.

Fig. 20 - Grupo de cistos contendo flagelos (F) de espermatozóides apirenes submetidos à criofratura em DMSO a 50%, seguida de maceração em OsO₄ a 0,1% durante ca. 66 horas. Observa-se, no círculo, um flagelo, no qual se destacam o axonema (seta) e os dois derivados mitocondriais (pontas de setas). **MEV - 11.000 x**.

Fig. 21 - Flagelos (F) de espermatozóides apirenes submetidos à criofratura em etanol. Destaca-se a configuração geral dos axonemas (ax), nos quais se distinguem "nove conjuntos" bem unidos entre si. Em um dos flagelos, estão indicados os derivados mitocondriais (DM). **MEV - 27.000 x**.

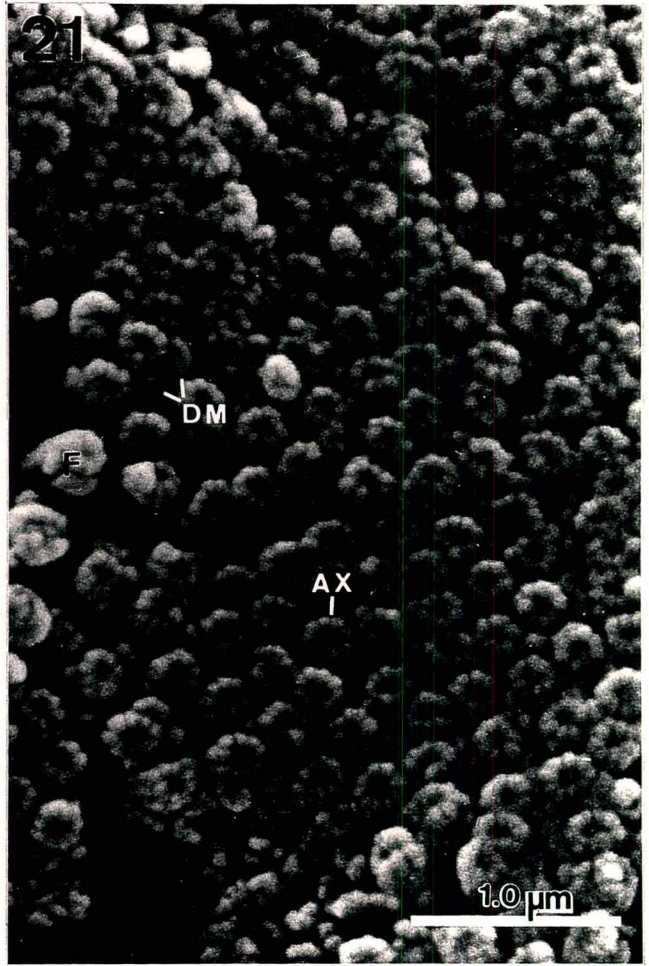
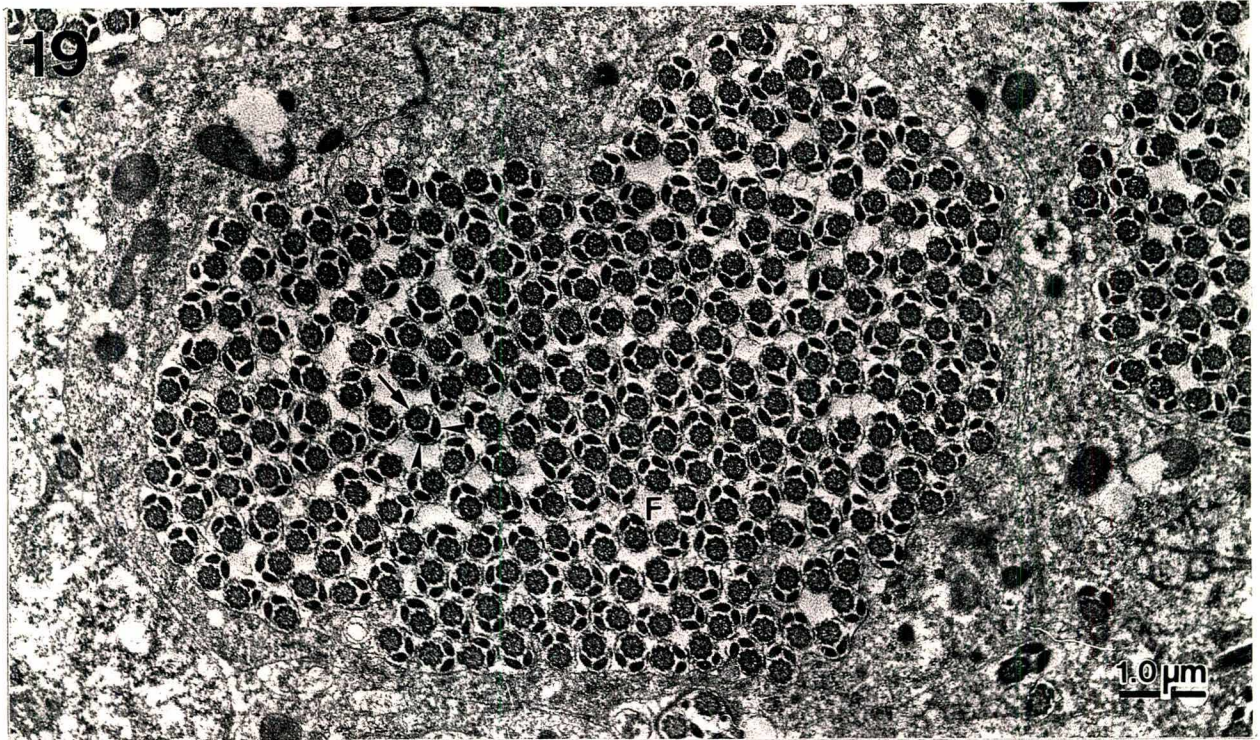


Fig. 22 - Secções transversais de regiões proximais de espermatozóides apirenes em diferentes níveis, desde a extremidade mais anterior (A) ao nível do capuz denso (cd) até a região inicial do flagelo (O), cujo axonema completo apresenta o padrão microtubular "9 + 9 + 2". Observa-se que as regiões mais proximais dos espermatozóides encontram-se inersas no citoplasma da célula cística (cc) e cada qual encoberta totalmente por um capuz denso (cd). Este se diferencia em anéis concêntricos ao redor da membrana plasmática (setas curtas) - evidenciada "negativamente" pela mistura fixadora - e se torna cada vez mais fino e com estriações (setas longas) à medida que as células espermáticas avançam em direção ao lúmen do cisto (lu). Em alguns flagelos livres no lúmen, o capuz denso está reduzido a uma fina cobertura celular (ponta dupla de seta). Alguns microtúbulos esparsos (pontas de setas) são observados no citoplasma da célula cística. Fixação de Dallai & Afzelius (1990). **80.000 x**.

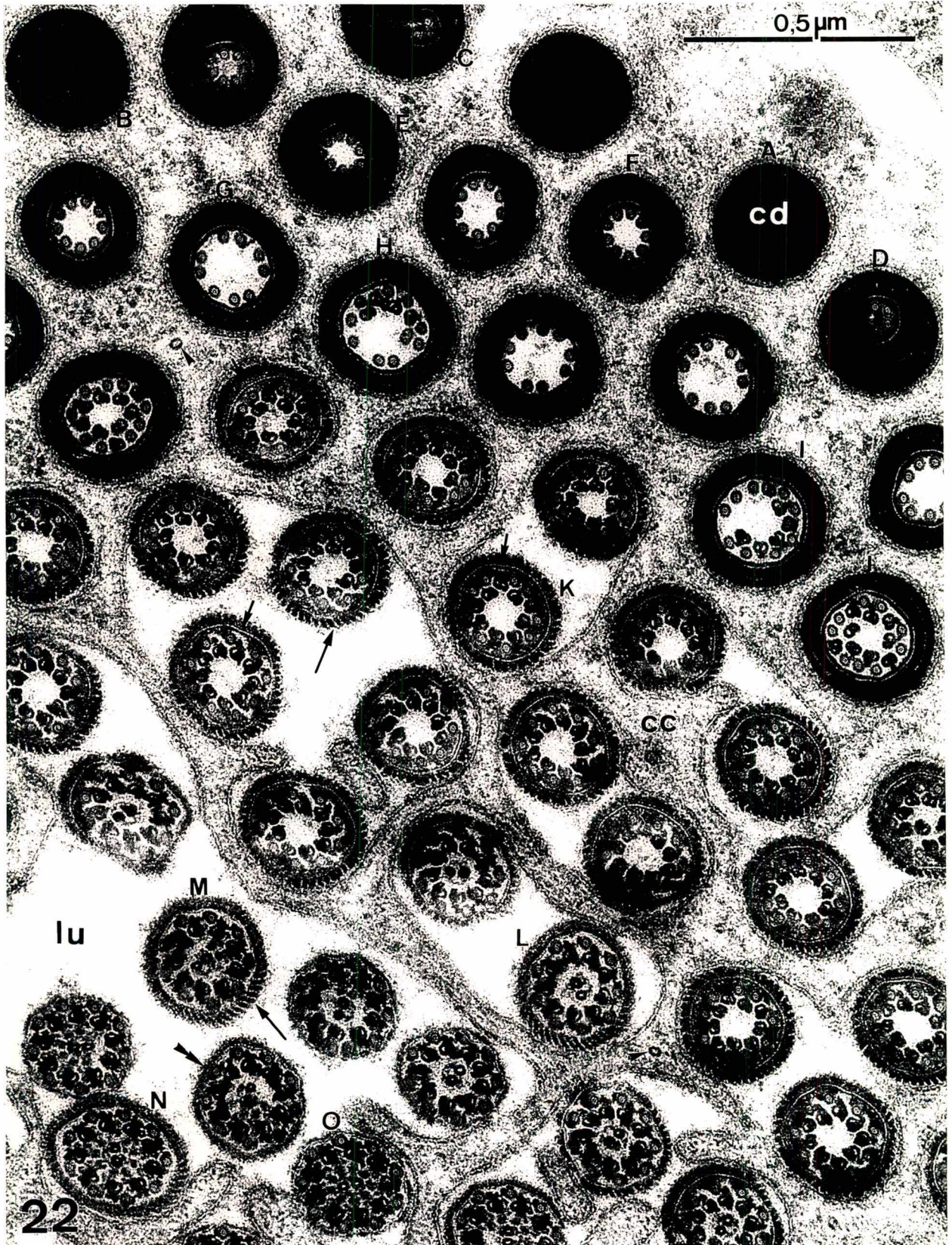


Fig. 28 - Corte equivalente ao nível 'M' da Fig.22. O axonema completo é do tipo "9 + 9 +2". A seta preta menor indica a bainha central junto aos dois microtúbulos centrais (MC). Nos subtúbulos A de alguns pares periféricos, observam-se pequenas projeções (pontas de setas menores). Vários subtúbulos B estão ligados aos microtúbulos acessórios por meio de pontes (pontas de setas maiores). Estes ainda se encontram parcialmente em contato com o material denso adjacente à membrana plasmática (seta branca). Axonema envolto por capuz estriado (seta preta maior).

Figuras 23 a 28 - Ampliação de algumas secções indicadas na Fig. 22 pelas letras E, F, I, J, K e M. **200.000 x**.

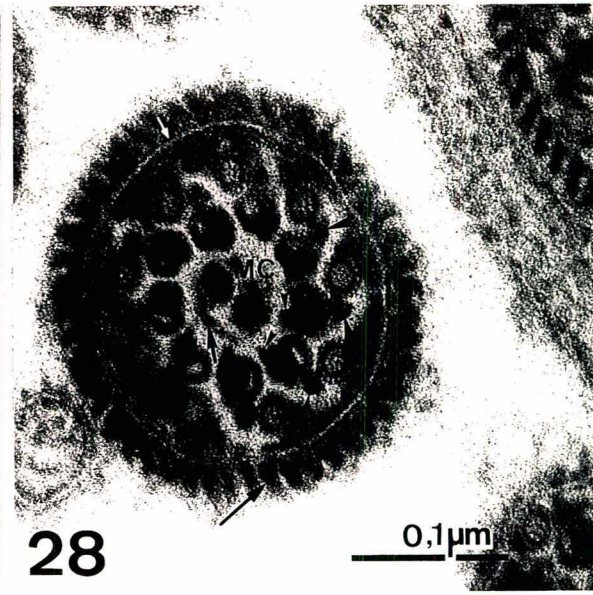
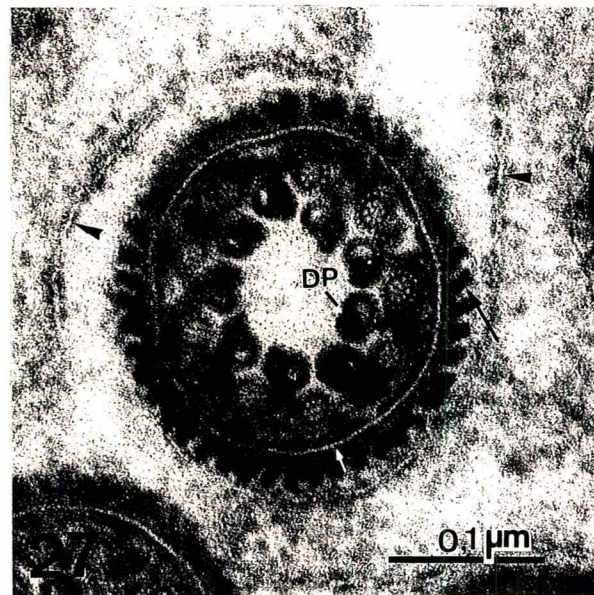
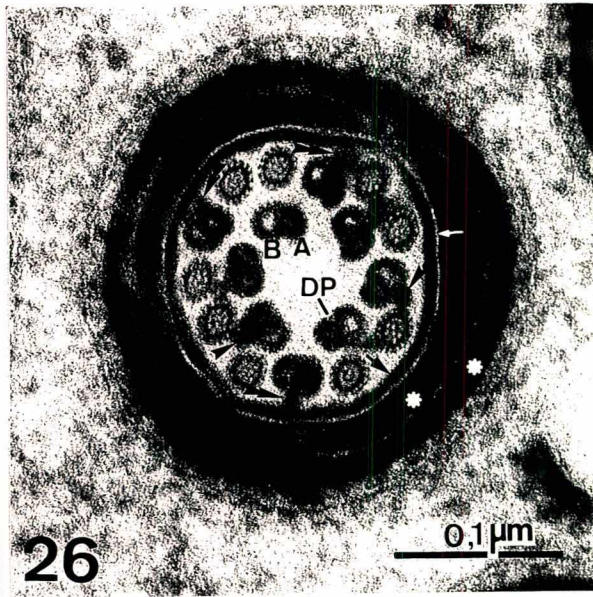
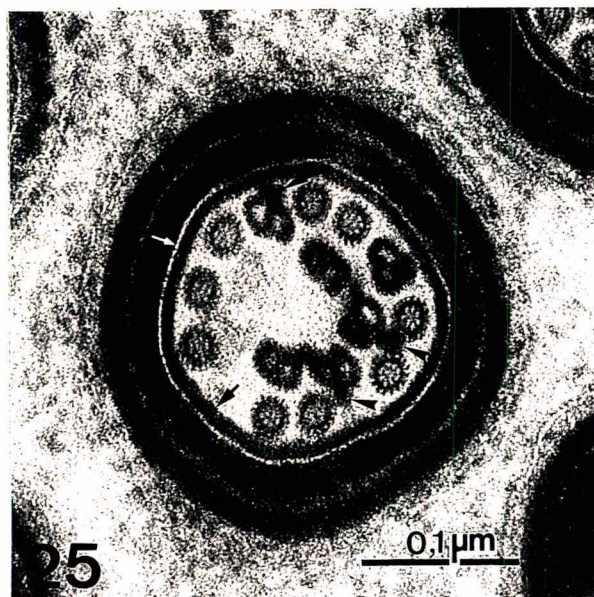
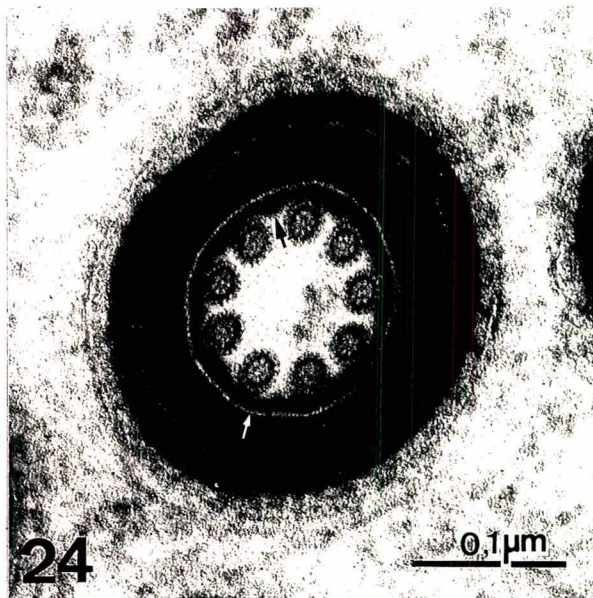
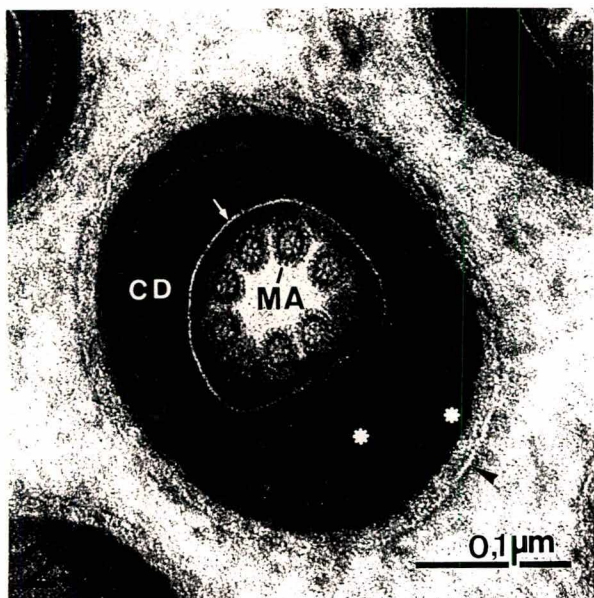
Fig. 23 - Ampliação da secção 'E'. Nove microtúbulos acessórios (MA) estão dispostos bem próximos uns dos outros, formando a coroa microtubular mais externa da região mais proximal do axonema em gradual organização. Duas camadas concêntricas (*) do capuz eletrodense (CD) dispõem-se ao redor da membrana plasmática (seta branca) "corada negativamente". As pontas de setas indicam a membrana plasmática da célula cística também "corada negativamente".

Fig. 24 - Secção correspondente ao nível 'F' da Fig.22. Os microtúbulos acessórios mais espaçados ocupam uma circunferência de 0,1 μ m de diâmetro. Evidencia-se um material elétron-denso (seta preta) entre os microtúbulos e a membrana plasmática (seta branca).

Fig. 25 - Corte ao nível 'I' da figura 22. Cinco microtúbulos duplos incompletos encontram-se próximos aos microtúbulos acessórios, mantendo, com alguns deles, pontes de ligação (pontas de setas). Uma dessas pontes (ponta dupla de seta) está também conectada ao material eletrodense (seta preta) na Fig. 24. Membrana plasmática (seta branca).

Fig. 26 - Ampliação da secção 'J' da figura 22. Já se desenvolveram os nove pares periféricos (DP), nos os subtúbulos A tem menor calibre e apresentam lúmen denso, enquanto que os subtúbulos B, de maior diâmetro, apresentam-se elétron-transparentes. Três dos microtúbulos duplos estão em contato com o material denso (seta preta) por meio de pontes (pontas duplas de setas), os outros estão conectados (pontas simples de setas) aos microtúbulos acessórios, e um livre. Braços de dineína ainda ausentes nos subtúbulos A. O capuz denso externo à membrana plasmática (seta branca) consta de duas camadas concêntricas bem distintas (*).

Fig. 27 - Neste nível de corte correspondente à secção 'K' da Fig. 22, observa-se que os pares periféricos (DP) já estão formando uma coroa regular, porém ainda estão faltando os braços de dineína dos subtúbulos A. Os microtúbulos acessórios encontram-se parcialmente imersos em um material menos denso e situado junto à face interna da membrana plasmática (seta branca). O capuz apresenta projeções radiais neste nível (seta preta). As pontas de setas indicam a membrana plasmática da célula cística.



As figuras 29 a 31 representam flagelos apirenes fixados de acordo com o método de Dallai & Afzelius (1990).

Fig. 29 - Secção transversal ao nível de regiões medianas das porções principais de flagelos de espermatozóides apirenes. O flagelo indicado (seta vazia), apresenta axonema (AX) completo ("9 + 9 + 2"), no qual se destacam os microtúbulos acessórios (pontas de setas maiores), e dois derivados mitocondriais (DM) com matriz parcialmente paracristalina (*). O envoltório membranosos dos derivados mostra um contraste "negativo" (pontas de setas menores). 120.000 x.

Fig. 30 - Vista ampliada do mesmo espermatozóide apirene indicado na figura anterior (seta vazia), demonstrando, principalmente, a sub-estrutura do axonema. A parede de cada microtúbulo acessório (MA) é formada por 16 protofilamentos e seu lúmen é preenchido com 8 a 9 subunidades elétrons-transparentes evidenciados "negativamente". O material denso (setas) localizado entre os microtúbulos acessórios contém 3 a 4 pequenas subunidades globulares evidenciadas "negativamente", uma destas próxima ao protofilamento nº 3 dos subtúbulos B das duplas periféricas (DP). Os subtúbulos A são formados por 13 protofilamentos e os subtúbulos B, por 10 a 11 protofilamentos. Projetando-se dos subtúbulos A, notam-se os braços de dineína em forma de ganchos com pontas curvadas para dentro (pontas de setas duplas). Os dois microtúbulos centrais (MC) apresentam 13 protofilamentos bem distintos. Os dois derivados mitocondriais (DM) de perfil oblongo aproximam-se pelas bases. Sua membrana dupla é vista com contraste "negativo" (ponta de seta) e a matriz é parcialmente cristalizada (*). 300.000 x.

Fig. 31 - Porção de um feixe de espermatozóides apirenes seccionados ao nível de porções sub-terminais e terminais dos flagelos, compreendendo níveis onde o axonema (AX) é completo (nível "a") até a ponta terminal (nível "e") com o axonema já desorganizado. Na maior parte dos flagelos, ainda são detectados dois derivados mitocondriais (DM) e, em alguns deles, observa-se ainda a porção paracristalina (*) da matriz. Ao redor da matriz, está evidenciada "negativamente" a membrana dupla (pontas de setas) na maioria dos derivados mitocondriais. 120.000 x.

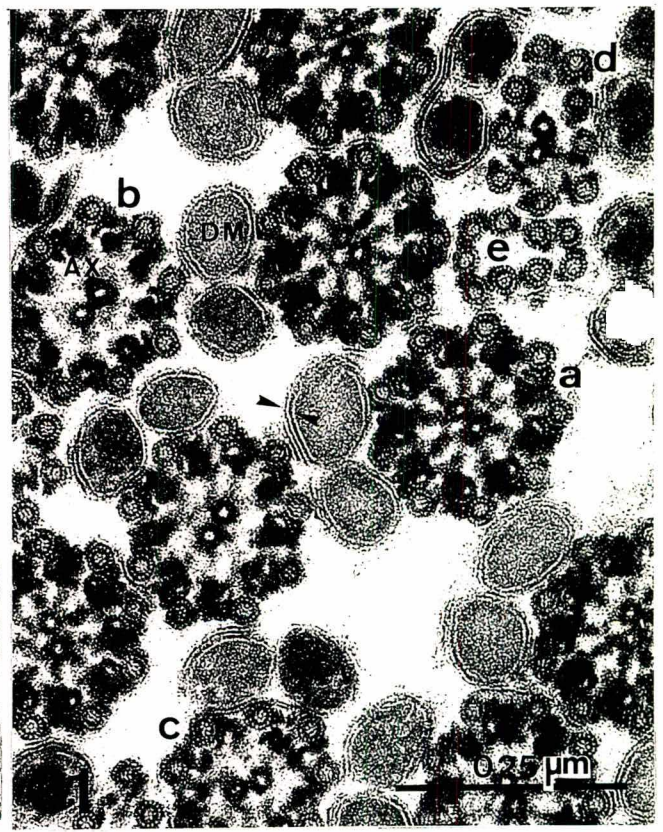
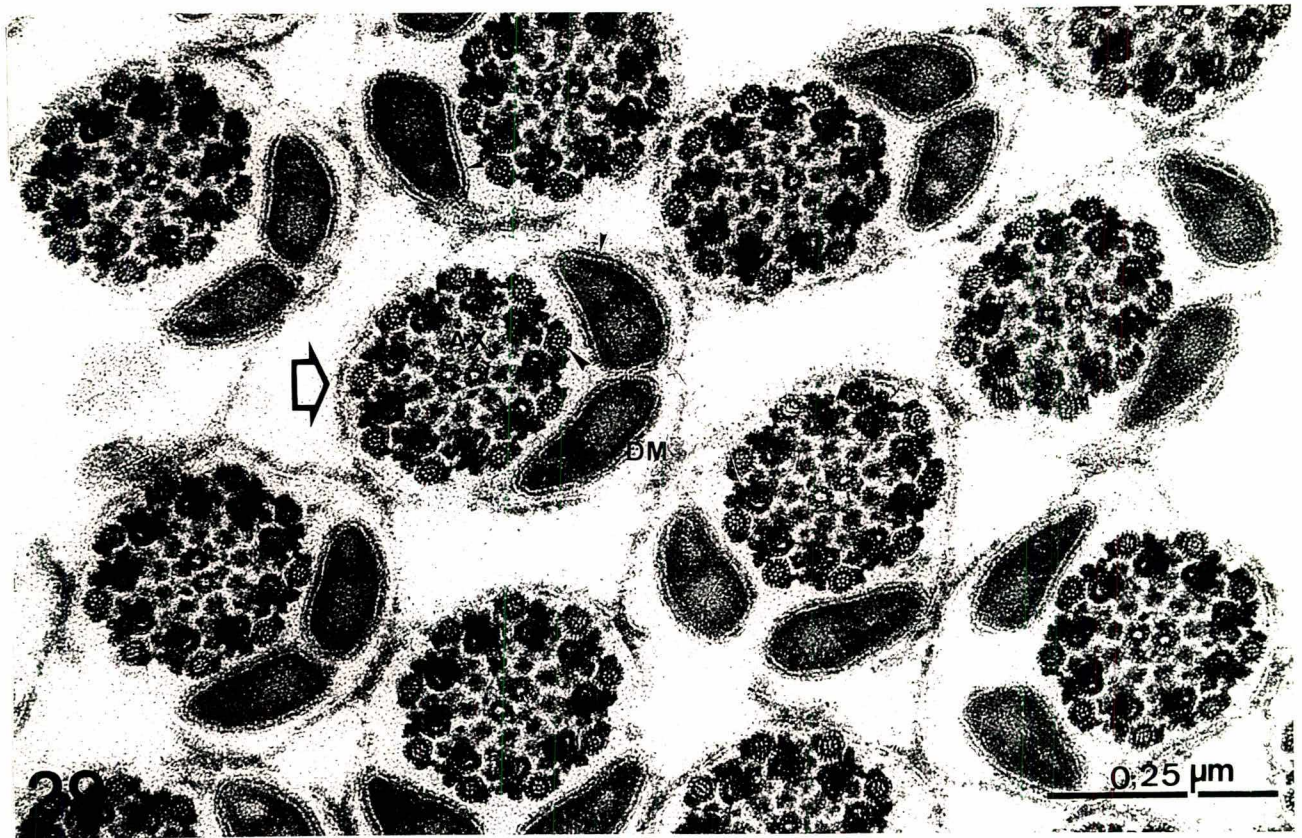
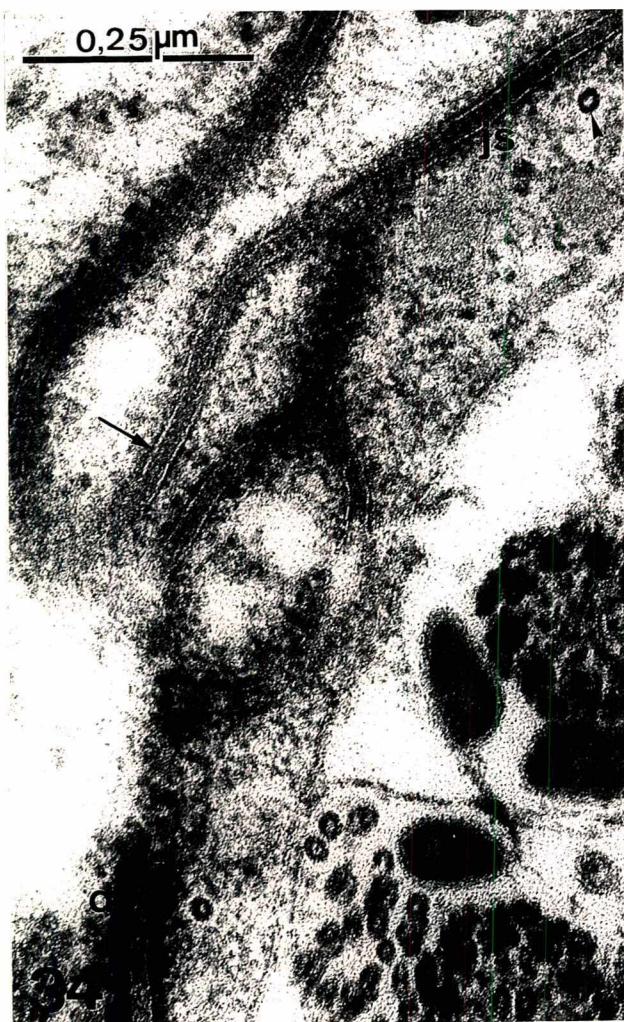
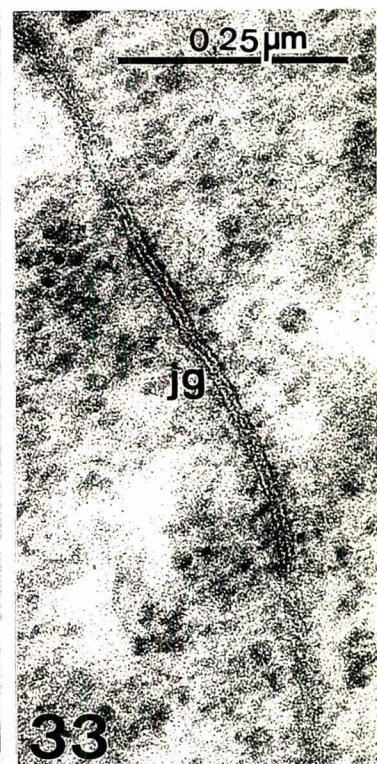
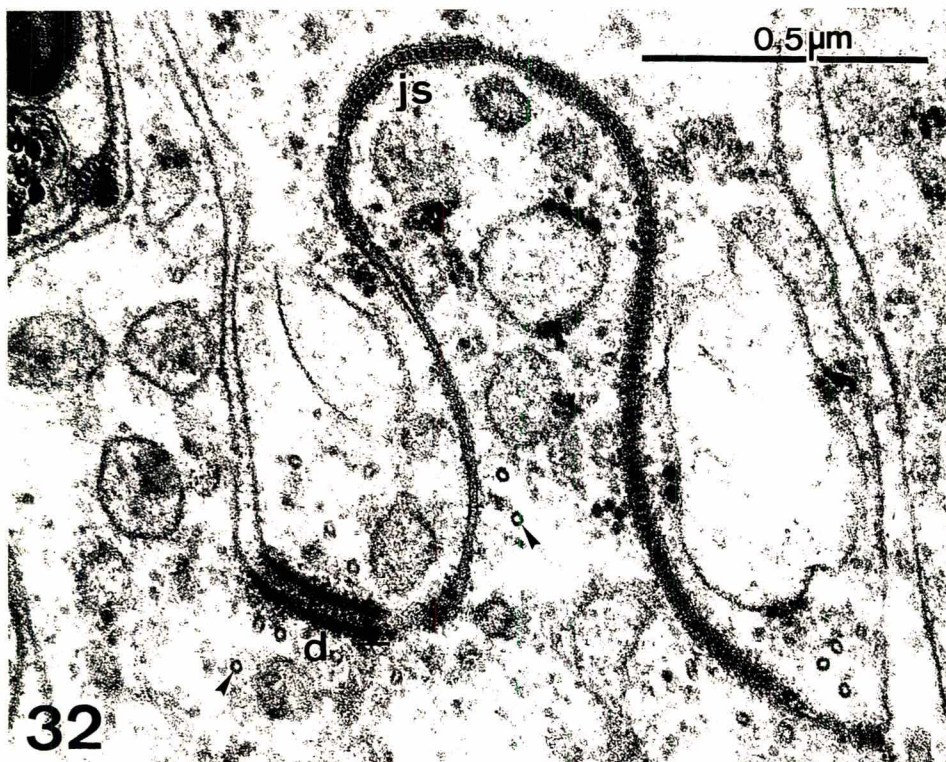


Fig. 32 - Secção longitudinal de uma junção do tipo desmosoma (d) e de uma extensa junção septada (js) entre duas células epiteliais císticas adjacentes. Presença de vários microtúbulos (pontas de setas) no citoplasma das células císticas. **75.000x**.

Fig. 33 - Secção longitudinal de uma junção do tipo "gap" (jg), ou em hiato, entre duas células epiteliais de um mesmo cisto. A estrutura pentalaminar típica deste tipo de junção foi evidenciada pelo método de Dallai & Afzelius (1990). **120.000x**.

Fig. 34 - Corte oblíquo de uma junção septada (js) extensa entre duas células císticas. Os septos e as membranas plasmáticas (setas) se destacam em contraste "negativo". Presença de microtúbulos isolados (ponta de seta) no citoplasma de uma das células. Método de Dallai & Afzelius (1990). **120.000x**.

Fig. 35 - Extensa junção do tipo adesiva (*zonula adherens*) formada pela justaposição das membranas plasmáticas de duas células císticas que envolvem um grupo de células espermáticas em desenvolvimento. c - citoplasma de uma célula espermática próxima da junção. **50.000x**.

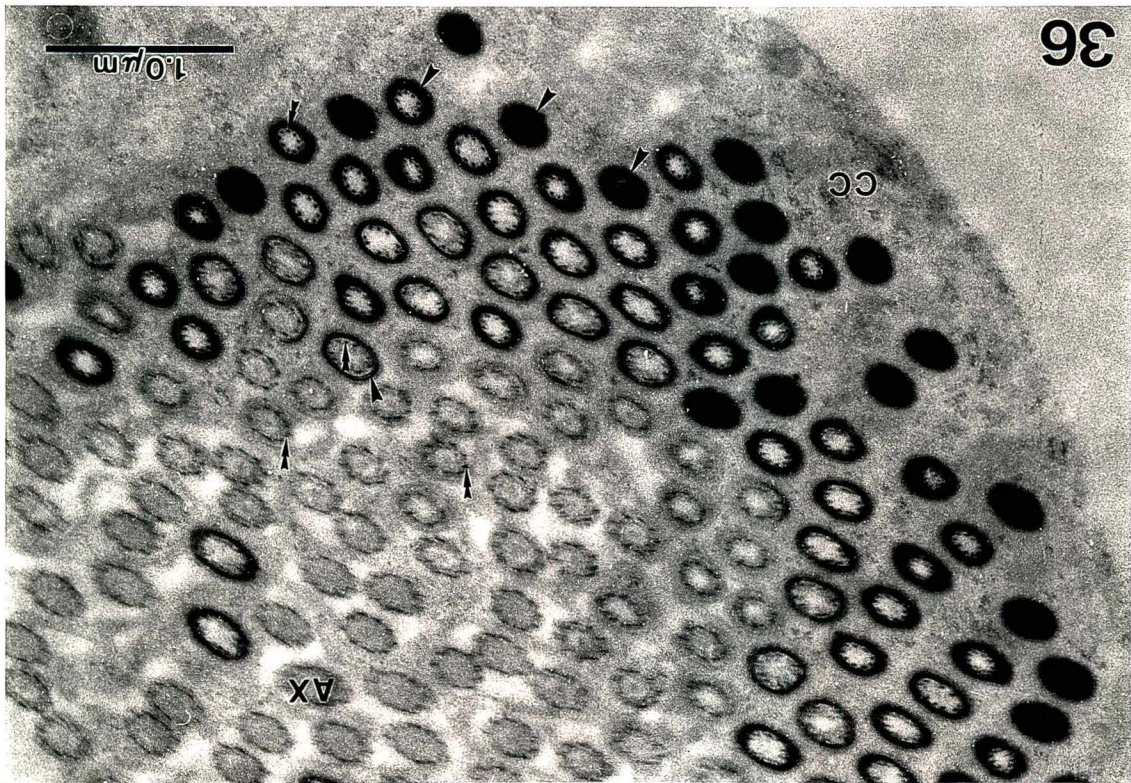
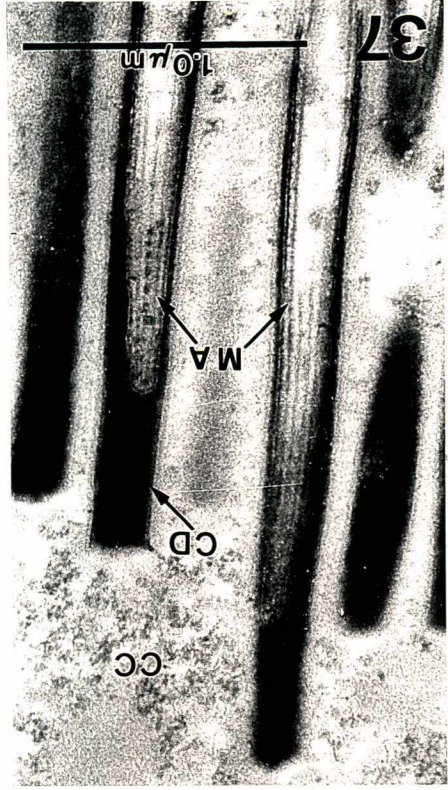
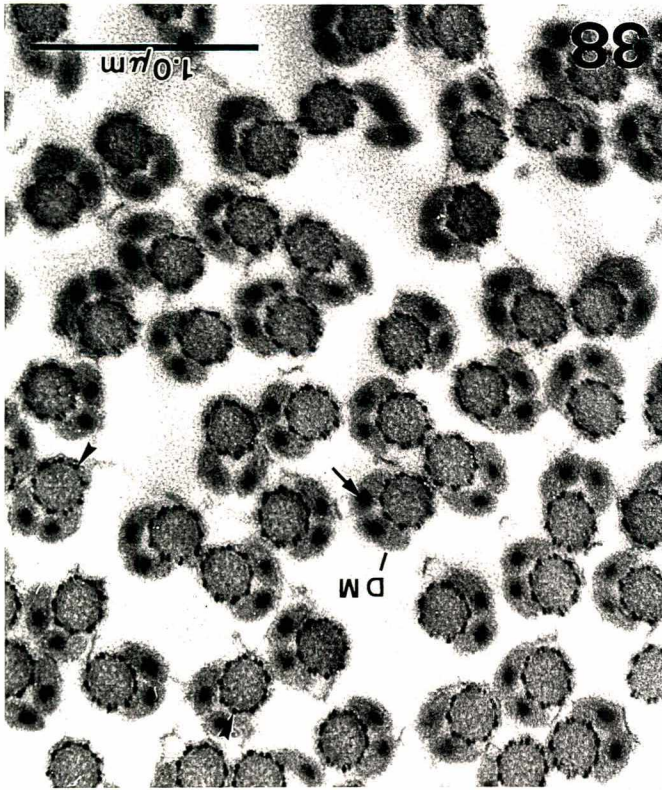


As figuras 36 a 38 mostram espermatozoides apirenes fixados com o método do E-PTA, modificado de Bloom & Aghajanian (1968).

Fig. 36 - Corte transversal-oblíquo de regiões anteriores. Nota-se intensa reação positiva ao E-PTA nos capuzes (pontas de setas) e nos microtúbulos acessório (pontas duplas de setas) dos axonemas (AX). CC - célula cística. Corte sem pós-contrastação. **24.000 x**.

Fig. 37 - Secção longitudinal de regiões anteriores. O capuz denso (CD) que recobre estas regiões e os microtúbulos acessórios (MA) das porções iniciais dos axonemas mostram reação positiva ao E-PTA. CC - célula cística. **37.000 x**.

Fig. 38 - Corte transversal de regiões medianas dos flagelos, mostrando positiva ao E-PTA nos microtúbulos acessórios dos axonemas (ponta de seta) e nas regiões paracristalinas (seta) dos derivados mitocondriais (DM). **30.000 x**.



3. ESPERMIOGÊNESE EUPIRENE

3.1. Formação do Acrosoma, Transformações Nucleares e Alongamento da Cabeça das Espermátides Eupirenes

Em testículos de lagartas de 3º estágio até ca. de 7 dias de pupação, é possível observarem-se cistos volumosos, contendo espermátides eupirenes iniciais. Em espermátides mais precoces de formato variado, no núcleo esférico (ca. 3 a 3,5 µm de diâmetro), observa-se uma faixa de cromatina elétron-densa acolada ao envelope nuclear em quase toda sua extensão (Fig. 39). Ao redor do núcleo, nota-se um envoltório de cisternas do retículo endoplasmático liso, as quais se estendem para o resto do citoplasma (Fig. 39). Neste estágio, os "centríolos" se encontram afastados do núcleo e os flagelos curtos se projetam para o interior de uma vesícula no citoplasma (Fig. 39). As mitocôndrias agrupadas em uma área citoplasmática, começam a se fundir para a formação do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial (Figs. 59 a 63). Quando este atinge o estágio de uma esfera volumosa, elétron-densa e entremeada por finas regiões claras (Fig. 64), estágio de "novelo de barbante" (André, 1962), ele se posiciona ao lado do núcleo, mantendo inalteradas suas características morfológicas. No final desta fase, o centríolo está posicionado em uma depressão nuclear, mas em posição diametralmente oposta ao "Nebenkern".

Quando complexo mitocondrial atinge o estágio de "envelope cromofóbico" (André, 1962), apresentando um centro denso rodeado por um halo mais claro, o núcleo da espermátide continua com quase a mesma morfologia aparente, com uma camada de cromatina elétron-densa acolada ao envelope nuclear, porém mais concentrada em uma determinada área. Nesta fase, várias unidades golgianas estão se agrupando em um dos pólos do núcleo. Somente quando o "Nebenkern" estiver em fase mais avançada, apresentando aspecto semelhante ao de uma "cebola" (André, 1962), é que se observa a formação de um grânulo denso de formato irregular, o grânulo pró-acrossômico, localizado entre um dos

pólos do núcleo e as faces "trans" de dictiosomas golgianos (Fig. 40). O núcleo mantém-se aparentemente inalterado, mesmo quando o "Nebenkern" já estiver diferenciado em dois derivados mitocondriais e estes, iniciando o alongamento (Fig. 42).

O grânulo pró-acrossômico denso se arredonda, achatando-se levemente ao se aproximar do núcleo, onde se aloja em uma depressão (Fig. 41). O pequeno pro-acrosoma de aspecto granular se transforma em uma vesícula acrossômica esférica, volumosa, mais clara e com áreas densas esparsas (Fig. 43). Nas áreas de contato com o núcleo e com a membrana plasmática, notam-se espessamentos da membrana acrossomal (Fig. 43). À medida que progride a formação do acrosoma, o conteúdo vesicular vai se tornando gradualmente mais denso e a membrana acrossomal vai se espessando junto às regiões mais densas. O axonema, localizado entre as regiões iniciais dos derivados mitocondriais, está em posição oposta ao acrosoma. Nesta fase, o núcleo está mais volumoso, apresentando grumos esparsos de heterocromatina próximos do envelope nuclear (Fig. 43).

A vesícula acrossomal se achata, adquirindo aspecto semelhante a uma lente biconvexa e se condensa novamente, mostrando seu conteúdo separado em duas camadas de diferentes densidades e de aspecto finamente fibrilar (Fig. 44). No núcleo, a faixa de cromatina elétron-densa vai-se expandindo da periferia do envelope para o centro, e ainda se nota um denso nucléolo (Figs. 44 e 45). O envelope nuclear apresenta, em geral, aspecto homogêneo, com poros esparsos e apenas espessado na região de inserção do centríolo (Fig. 45). Em cortes transversais de núcleos de espermátides em fase um pouco mais avançada (Fig. 49), observa-se que a cromatina acha-se dispersa por todo o núcleo, formando uma fina rede fibrilo-granular. No acrosoma, as duas regiões de diferentes elétron-densidades estão bem diferenciadas e na área de contato com a membrana plasmática, ele apresenta um espessamento (Fig. 49). As espermátides estão se alongando, porém os núcleos ainda apresentam forma

esférica ou levemente ovalada (Figs. 46 a 48). Aos poucos, a cromatina vai se organizando em grânulos grosseiros, que se dispõem em pequenas fileiras e o envoltório passa a apresentar determinadas áreas espessadas (Figs. 46 a 48). Nota-se, também, que nos núcleos das espermátides de um mesmo cisto, a cromatina está no mesmo estágio de compactação granular, porém alguns acrosomas podem apresentar-se em fases mais imaturas que outros (Fig. 47). Observa-se, inicialmente, que os acrosomas se encontram em posição quase diametralmente oposta àquela do corpúsculo basal ou do axonema isolado, e que estas organelas vão se aproximando gradualmente até se posicionarem muito próximas entre si (Fig. 47). Em outros cortes transversais de núcleos e acrosomas em estágios semelhantes aos das figuras 46 e 47, nos quais são observados os axonemas ladeados pelos derivados mitocondriais, percebe-se que estes estão ligados ao envelope nuclear em duas pequenas áreas densas. Quando o acrosoma está posicionado bem próximo do axonema e dos derivados mitocondriais, avançando no seu desenvolvimento, passa a apresentar a forma predominante de um cone, cujo ápice está em contato direto com uma pequena região da membrana plasmática. Nesta área, na face externa da membrana, pela primeira vez é detectada a presença de um minúsculo apêndice reticular, semelhante a um pequeno "pom-pom" de base densa. Este apêndice extracelular permanecerá e se desenvolverá nas fases subseqüentes da maturação nuclear e acrossomal (Figs. 50 a 55, 57 e 58), durante o alongamento da cabeça das espermátides, estando presente também na periferia dos flagelos (Figs. 78 a 84 e 87).

Em estágio subseqüente da maturação, o acrosoma modifica sua forma, adquirindo o aspecto piriforme. Em corte transversal da célula, sua porção basal arredondada está em contato com o núcleo e a porção estreitada, com a membrana plasmática no local de inserção do apêndice reticular. O centro da região basal é menos denso, sugerindo a formação de um futuro túbulo. No núcleo, a cromatina mantém-se sob a forma de grânulos densos, organizando-se

em filamentos, e o envelope nuclear apresenta-se espessado em quase toda sua extensão (Fig. 50). Ao redor deste último, nota-se, então, a presença de cisternas estreitas e lisas, que contornam parcialmente o núcleo (Fig. 50).

No período de alongamento inicial da cabeça das espermatídes, observa-se, em corte transversal de regiões bem anteriores, que o acrosoma adquire a forma de um túbulo de parede espessa com lúmen elétron-transparente (Fig. 51). Notam-se uma fileira de microtúbulos citoplasmáticos e cisternas, que rodeiam o acrosoma parcialmente, sendo mantida a íntima ligação com a membrana plasmática na região do apêndice reticular (Fig. 51). Na mesma figura, observa-se parte de um núcleo seccionado transversalmente na sua região posterior junto com o corpúsculo basal, que se localiza em uma depressão nuclear. Nota-se, também, o envelope nuclear espessado e rodeado por microtúbulos esparsos e cisternas com lúmen estreito. A cromatina mantém o aspecto de grânulos densos, formando pequenas fileiras, porém um pouco mais esparsas.

Durante o alongamento da cabeça das espermatídes, observa-se, tanto em cortes transversais (Figs. 52 e 53) como longitudinais (Fig. 55), que o acrosoma se transforma definitivamente em uma longa estrutura tubular de parede menos espessa e base dilatada, que flanqueia o núcleo em quase toda sua extensão, mantendo-se sempre próximo do apêndice reticular extracelular. Durante o alongamento do núcleo, ocorre grande redução do seu volume, acompanhada de crescente compactação da cromatina, a qual, em cortes transversais (Figs. 52 e 53), mostra-se sob a forma de pontos espessos (ca. 18 a 20 nm de diâmetro). Ao redor do núcleo, observa-se uma fileira simples de microtúbulos citoplasmáticos envoltos por uma cisterna estreita, lisa e com extremidades dilatadas (Figs. 52 e 53). Neste estágio de alongamento da cabeça da espermatíde, junto à base do núcleo e envolvendo parcialmente o corpúsculo basal, nota-se a presença de um adjunto do centríolo, formado por uma rede de filamentos espessos e densos (Fig. 54). Esta estrutura não persistirá nos espermatozóides eupirenes.

Em fases mais avançadas da compactação nuclear, os filamentos cromatínicos vão-se tornando gradualmente mais espessos, formando um reticulado bem elétron-denso e entremeado de espaços claros. À medida que a condensação nuclear progride, observa-se, em corte longitudinal (Fig. 55), que os filamentos da rede cromatínica vão-se tornando cada vez mais próximos e paralelos entre si, até que esta atinja um grau de compactação que conferirá aspecto homogêneo ao núcleo muito denso (Fig. 56). Neste estágio avançado, ao redor do núcleo, ainda são observados microtúbulos citoplasmáticos ligados ao envelope por meio de pequenas pontes (Fig. 56). O núcleo se estreita na sua região posterior, onde flanqueia o corpúsculo basal e a porção inicial do axonema, conforme foi observado em estágio anterior (Fig. 54). O acrosoma tubular mantém seu aspecto geral, bem como sua posição em relação ao núcleo e ao apêndice reticular. Este último, por sua vez, apresenta-se com o formato de um "pom-pom" volumoso, ligado por meio de septos à periferia celular, em uma depressão da membrana plasmática.

Nas cabeças dos espermatozóides eupirenes (Fig. 58), o acrosoma tubular persiste, ladeando o núcleo, porém localizado mais próximo dos apêndices laciniados extracelulares. Estes apêndices somente surgem no final da espermiogênese, formando uma manta radial na periferia das cabeças (Figs. 57 e 58) e dos flagelos dos espermatozóides eupirenes (Fig. 87).

3.2. Formação e Desenvolvimento do Complexo Mitocondrial e sua transformação em Derivados Mitocondriais

Nas espermátides iniciais, logo após a telófase II da meiose, as mitocôndrias encontram-se aglomeradas em uma região do citoplasma, afastadas do núcleo e em processo inicial de fusão, para formar o complexo mitocondrial ou "Nebenkern" (Figs. 59 e 60). A figura 61 representa um complexo mitocondrial em estágio inicial de uma espermátide provavelmente apirene, por ser menor em tamanho e por apresentar matriz menos densa.

À medida que progride o processo de fusão e o rearranjo mitocondrial, a matriz vai se tornando gradualmente mais densa e septos finos são observados no estreito espaço compreendido entre áreas contíguas do complexo mitocondrial (Fig. 63). Este espaço uniforme é ocupado por citoplasma.

Com o prosseguir do desenvolvimento, o "Nebenkern" aumenta de volume e de densidade, formando uma esfera densa e volumosa, cuja ultra-estrutura se assemelha a um labirinto entrecortado por estreitos meandros menos densos (Fig. 64), ocupados por citoplasma. Este aspecto é característico de uma fase conhecida como estágio de "novelo de barbante" (André, 1962). Septos finos interligam áreas vizinhas do complexo mitocondrial, que mostra algumas áreas da camada mais externa dilatadas e pobres em cristas e grânulos densos; a matriz mantém a mesma elétrion-densidade (Figs. 64 e 65).

Em estágio subsequente, as diversas áreas da camada externa do "Nebenkern" se fundem e se dilatam ainda mais, apresentando-se, no final, como duas regiões contíguas de conteúdo homogêneo e menos densas que o centro. Este ainda mantém o aspecto enovelado. Nesta fase, que corresponde ao estágio do "envelope cromofóbico" (André, 1962), o "Nebenkern" se localiza próximo do núcleo e do axonema. Este se estende a partir do corpúsculo basal inserido numa pequena depressão nuclear; ainda neste estágio, irá se alojar em uma reentrância compreendida entre as duas camadas periféricas do "nebenkern".

Avançando um pouco mais no seu desenvolvimento, a matriz de todo complexo mitocondrial volta a adquirir elétrion-densidade homogênea e as duas camadas periféricas mostram-se, em vários pontos, fundidas com diferentes regiões do centro do "Nebenkern", que mantém ainda o aspecto de labirinto (Fig. 66). Cristas esparsas são detectadas na matriz. O axonema, do tipo "9 + 2", localiza-se em uma das duas reentrâncias superficiais do complexo, as quais correspondem às regiões por onde começará a separação dos futuros derivados mitocondriais (Fig. 66). Esta fase antecede àquela conhecida como estágio de

"cebola" (André, 1962), em que o complexo mitocondrial apresenta suas camadas dispostas em túnicas concêntricas. No período imediatamente subsequente (Fig. 67), já podemos distinguir claramente 8 camadas superpostas no "Nebenkern", as quais de fato correspondem a apenas 4 compartimentos profundamente encaixados entre si. Esta estrutura gradualmente evoluirá em outra de 3 compartimentos (Fig. 68), os quais, superpostos, nos fornecem a impressão de ser formados por 6 camadas (Fig. 69). Eventualmente, encontramos alguns vacúolos no interior destas camadas, tanto nesta fase (Fig. 68) como em outras subsequentes (Fig. 70 e 71). Em seguida, o complexo mitocondrial inicia o processo de individualização, aparentando ser formado de 4 camadas superpostas (Fig. 70), as quais correspondem realmente aos dois derivados mitocondriais em processo final de separação. É comum, observarem-se, no mesmo cisto eupirene, espermátides em fases evolutivas do "Nebenkern" muito próximas, desde a fase de 4 capas concêntricas (Fig. 70) até aquela em que os derivados mitocondriais já estão completamente individualizados (Fig. 71).

3.3. Organização e desenvolvimento do flagelo: as transformações do Axonema e dos Derivados Mitocondriais durante o período de alongamento

Logo após sua individualização, os derivados mitocondriais das espermátides eupirenes, no início do seu alongamento junto com o flagelo, apresentam tamanhos e elétrons-densidades desiguais, além de conter pequenos vacúolos, preenchidos com citoplasma. A matriz ainda apresenta algumas pequenas cristas espalhadas ou ligadas ao envelope do complexo mitocondrial. Em fase um pouco mais avançada (Fig. 71), a elétrons-densidade dos dois derivados se torna mais evidente. O derivado de menor volume e com elétrons-densidade semelhante à do citoplasma, mostra, em corte transversal, um a dois vacúolos na matriz, ou mesmo nenhum, e pequenas cristas esparsas (Fig. 71, 72

e 74). A matriz do derivado mitocondrial maior é a mais densa e possui maior número de pequenas cristas, apresentando, com freqüência, um a dois vacúolos, preenchidos por citoplasma, que lhe dão o formato de uma "rosquinha" ou de um número "oito" (Fig. 71). Nos mesmos cistos, observam-se flagelos de espermatídes, cujos derivados maiores apresentam formato de letra "C" ou de halteres bem densos, indicando que se encontram em fase um pouco mais avançada (Fig. 75). Eventualmente, figuras mielínicas podem ser observadas no interior de um dos derivados mitocondriais (Fig. 73) ou, mais raramente, durante sua extrusão (Fig. 74).

O axonema flagelar permanece localizado em uma das reentrâncias entre as duas camadas externas do "Nebenkern", por onde ocorreu a separação dos dois derivados mitocondriais (Figs. 71 a 75). O padrão microtubular do filamento axial ainda é do tipo "9 + 2", porém os subtúbulos A dos pares periféricos apresentam dois braços de dineína; dos subtúbulos B, projetam-se pequenos prolongamentos que irão formar os microtúbulos acessórios da coroa mais externa (Figs. 75 a 77). Tanto os subtúbulos dos pares periféricos quanto os dois túbulos centrais apresentam lúmen elétron-transparente. Ao redor do axonema, são observadas cisternas lisas (Figs. 75 e 76). Junto a regiões medianas dos flagelos em alongamento, neste estágio, notam-se, também, grandes massas de citoplasma descartado, contendo muitas mitocôndrias, complexo de Golgi, cisternas do retículo endoplasmático, corpos multivesiculares, corpos densos, vacúolos e muitos ribosomas livres (Fig. 72). Somente nas regiões subterminais dos flagelos, que apresentam axonema e um dos derivados, é possível observarem-se espermatídes com citoplasma abundante e interligadas por meio de pontes citoplasmáticas (Fig. 77).

No estágio subsequente da evolução flagelar, as espermatídes, em corte transversal (Fig. 78), apresentam citoplasma menos denso e mais reduzido, que contém corpos multivesiculados e vários grupos de ribosomas, além de pequenos vacúolos e cisternas lisas próximas do axonema e dos derivados. Nos

axonemas, agora do tipo "9 + 9 + 2", nota-se que: (a) o conteúdo dos nove microtúbulos acessórios recém formados ainda é elétron-transparente e estes ainda se mantêm ligados aos subtúbulos B; (b) o lúmen dos subtúbulos A dos pares periféricos mostram-se levemente elétron-densos e (c) dos microtúbulos centrais continua claro (Fig. 78). Os derivados mitocondriais mantêm sua desigualdade de tamanho, porém ambos adquiriram aspecto circular, em corte transversal, e sua matriz mostra-se homogênea com pequenas cristas (Fig. 78). Na periferia flagelar, pela primeira vez, detecta-se a presença do apêndice reticular bem discreto e ligado a uma saliência suave da membrana plasmática, associada a um botão citoplasmático pequeno e denso (Fig. 78). Este apêndice, nos estágios seguintes e em diferentes alturas de corte dos flagelos (Figs. 79 a 84 e 87), vai evidenciando seu aspecto reticular, além de aprofundar-se numa depressão da membrana plasmática, com a qual passa a ligar-se por meio de septos (Figs. 82 a 84 e 87). O botão citoplasmático denso subjacente à membrana na região do apêndice reticular desaparece.

No citoplasma flagelar de espermátides um pouco mais evoluídas, em corte transversal (Figs. 79), observam-se camadas justapostas de microtúbulos citoplasmáticos, intercaladas por cisternas lisas, próximas dos derivados mitocondriais. Estes mantêm o aspecto esférico, porém, no derivado maior, são percebidas esférulas densas adjacentes ao envelope nuclear. O axonema e os derivados mitocondriais estão separados por uma cisterna lisa, a qual em fases subseqüentes (Figs. 81 e 82), se estenderá, fundindo-se com outras cisternas que rodeavam parcialmente o axonema e os derivados mitocondriais. Elas dão origem a um envoltório membranoso situado ao redor de ambos e os isolando do resto do citoplasma. Entre as cisternas lisas que formam este envelope e os derivados mitocondriais, há sempre uma fileira simples de microtúbulos citoplasmáticos (Figs. 79 a 82), que, em fases mais avançadas, somente passarão a ladear as regiões corticais dos derivados que estão se espessando gradualmente (Figs. 81 e 82). Em cortes transversais do derivado mitocondrial

maior, percebe-se a formação gradual de um espessamento na região interna da parede situada na face oposta ao axonema e o aumento do número de esférulas acoladas na membrana interna do derivado em uma área próxima do filamento axial do flagelo (Figs. 81 e 82). No derivado menor, pode ocorrer ou não um discreto adensamento na camada cortical do seu envelope (Figs. 81 e 82). Gradualmente, a matriz do derivado maior vai se tornando mais densa que a do menor (Figs. 82 a 84).

No axonema, em cortes transversais de flagelos de espermatídes mais avançadas (Figs. 80 a 83), observa-se o seguinte: (a) os microtúbulos acessórios se desligam dos subtúbulos B dos pares periféricos, seu lúmen vai-se tornando gradualmente denso até atingir a maior densidade em relação aos demais túbulos axonemáticos, e se formam ligações entre eles; (b) os pares periféricos mantêm-se praticamente inalterados quando comparados às fases precedentes; e (c) o lúmen dos túbulos centrais vai gradualmente se tornando elétron-denso, porém em menor intensidade se comparados à elétron-densidade dos túbulos acessórios. A partir da figura 83, nota-se uma drástica redução no volume citoplasmático dos flagelos das espermatídes em fase final de maturação. Na figura 84, que representa uma secção transversal da região mediana da peça principal de flagelos de espermatídes praticamente maduras, percebe-se: (a) o total desaparecimento de microtúbulos no citoplasma das células, (b) a presença de duas pequenas cisternas associadas a uma área densa e situadas nas regiões laterais entre os dois derivados e o axonema; (c) os dois derivados mitocondriais de tamanhos e densidades diferentes (evidenciados também em imagem de microscopia eletrônica de varredura na figura nº 85); (d) o derivado maior com uma zona cortical e uma medular bem distintas; a camada cortical, em secções longitudinais (Fig. 86), mostra uma estriação oblíqua regular, com um período de ca. 36nm, formando um ângulo de ca. 45° com o eixo maior do derivado; (e) o axonema do tipo "9 + 9 + 2" completamente organizado; e (f)

espessamentos periféricos da membrana plasmática, principalmente em áreas próximas do apêndice reticular.

Mesmo neste estágio muito avançado, ainda não se notam os apêndices laciniados extra-celulares, que somente começarão a se organizar na periferia de espermátides praticamente maduras (Fig. 87). Nesta mesma figura, observa-se que: (a) o citoplasma já foi quase completamente eliminado; (b) as pequenas cisternas estão reduzidas a duas vesículas situadas lateralmente entre o axonema e o derivado maior; (c) este último apresenta, na sua zona cortical, um botão denso adjacente ao axonema, que vai formar o eixo cortical denso do derivado maior no espermatozóide eupirene; (d) a membrana plasmática se justapõe intimamente à coroa periférica de microtúbulos acessórios, cujo conteúdo luminal é bem denso e homogêneo; (e) o apêndice reticular volumoso, ligado por septos curtos à membrana plasmática, se localiza em uma depressão bem próxima do túbulo acessório compreendido entre os pares periféricos nº 6 e nº 7.

Com a preparação IV, os flagelos dos espermatozóides eupirenes, em cortes transversais e observados em grandes aumentos (Figs. 88 e 89), mostram detalhes ultra-estruturais não detectáveis com o uso das outras fixações. Nesta fixação, a membrana plasmática e o envelope membranoso dos derivados mitocondriais coram-se "negativamente". A parede dos microtúbulos acessórios eupirenes, também evidenciada "negativamente", é formada por 16 protofilamentos e o seu lúmen é elétron-transparente (Fig. 89); percebe-se diferenciação estrutural entre as áreas densas que ligam os túbulos acessórios entre si (Fig. 89). Junto ao axonema do flagelo eupirene, observam-se duas pontes densas ligando a membrana plasmática aos microtúbulos acessórios situados entre os pares periféricos nº 6 e nº 7 e entre os de nº 8 e nº 9, respectivamente (Figs. 88 e 89). A subestrutura dos pares periféricos dos axonemas de espermatozóides eupirenes (Fig. 89) é similar àquela já descrita anteriormente para as duplas periféricas de flagelos apirenes (Fig. 30), tanto

quanto ao número de protofilamentos de suas paredes quanto ao conteúdo dos subtúbulos A e B. Os dois túbulos centrais do filamento axial do flagelo eupirene apresentam parede formada por 13 protofilamentos (Fig. 89), porém o conteúdo do lúmen é levemente elétron-denso (Figs. 88 e 89). Em corte transversal, o “botão denso” do derivado mitocondrial maior do flagelo eupirene, que corresponde ao eixo cortical, apresenta-se elétron-transparente (Figs. 88 e 89) com esta fixação especial. O apêndice reticular extracelular, em corte transversal, mostra bem seu aspecto reticulado, mas os septos de ligação com a membrana celular não são preservados (Fig. 88).

3.4. Estágios da Espermiogênese Eupirene (Descrição Sucinta)

As características ultra-estruturais das espermatídes eupirenes em desenvolvimento, detalhadamente explicadas nos itens anteriores, foram distribuídas em 10 diferentes estágios, descritos sucintamente a seguir, considerando as células de modo global.

Estágio 1 - Espermatíde Inicial

Espermatídes com núcleos esféricos, contendo heterocromatina acolada ao envelope nuclear, e envoltos por um envelope de cisternas do retículo endoplasmático (Fig. 39). Mitocôndrias agrupadas no citoplasma, iniciando sua fusão para formar o complexo mitocondrial ou "Nebenkern" (Figs. 39, e 59 a 63). Citoplasma rico em polisomas livres e cisternas lisas e granulares; presença de corpos multivesiculares e unidades do complexo de Golgi (Figs. 39, 59 e 60). O flagelo curto e afastado do núcleo se projeta para interior de uma vesícula (Fig. 39). Largas pontes interligam espermatídes vizinhas na altura dos núcleos. Presença de expansões de citoplasma ao redor das espermatídes (Fig. 39).

Estágio 2 - Espermátide Inicial

O "Nebenkern" volumoso e denso se localiza próximo do núcleo. O envelope de cisternas do RE ao redor do núcleo desaparece. Ao final da fase, o complexo mitocondrial apresenta-se no estágio de "novelo de barbante" (Figs. 64 e 65). O flagelo do tipo "9 + 2" se aprofunda no citoplasma até justapor-se ao núcleo. O corpúsculo basal situa-se em uma depressão nuclear e em oposição ao "nebenkern". Citoplasma rico em polisomas livres, com esparsas cisternas do retículo granular e várias unidades do Golgi situadas próximas do núcleo. Presença de largas pontes citoplasmáticas.

Estágio 3 - Espermátide Inicial

O aspecto geral do núcleo mantém-se inalterado. O "Nebenkern" evolui para a fase do chamado "envelope cromofóbico" (Fig. 66). O axonema ("9 + 2") situa-se em uma das reentrâncias do complexo mitocondrial (Fig. 66). Forma-se o pro-acrosoma, que se aproxima do envelope nuclear (Fig. 40). O flagelo cresce em direção à periferia celular. O citoplasma continua com a aparência das fases anteriores (Fig. 41). Persistência das pontes intercelulares na altura dos núcleos.

Estágio 4 - Espermátide inicial

O núcleo aumenta de volume e a heterocromatina se expande da periferia para o centro (Fig. 42 a 45), adquirindo aspecto fibrilo-granular (Fig. 46). O pro-acrosoma se transforma em uma vesícula acrossômica (Figs. 43 e 44), que se modifica em um acrosoma lenticular com duas camadas distintas (Figs. 44, 46, 47 e 49). O complexo mitocondrial adquire o aspecto de "cebola" e progride no seu desenvolvimento (Figs. 67 a 70), até sua individualização em dois derivados mitocondriais com formato, volume, e elétrons-densidade diferentes (Figs. 71 a 74). Nos flagelos, que seguem alongando, o axonema, rodeado por cisternas lisas e disposto entre os dois derivados mitocondriais

(Figs. 71, 75 e 76), mostra o mesmo padrão. Os subtúbulos B apresentam os primórdios dos túbulos acessórios (Figs. 75 a 76). Grandes massas de citoplasma descartado são observadas próximas dos flagelos (Fig. 72). As pontes citoplasmáticas situam-se em porções subterminais dos flagelos (Fig. 73).

Estágio 5 - Espermatídes em Alongamento

Este período se caracteriza, principalmente, pelas transformações nucleares e acrossômicas da cabeça das espermatídes e pelo aparecimento do apêndice reticular extra-celular (Figs. 47 a 51 e 78). A forma do núcleo não se altera (Fig. 49). A cromatina fibrilo-granular ocupa todo o espaço intranuclear (Fig. 48) e vai-se condensando gradualmente (Figs. 47 e 49). Ocorre espessamento de áreas periféricas do envelope nuclear (Fig. 49). O acrosoma modifica-se até transformar-se em uma estrutura tubular justaposta ao núcleo e adjacente ao apêndice reticular (Fig. 51). Os derivados mitocondriais se inserem em regiões espessadas do envelope nuclear. Cisternas lisas e estreitas são observadas no citoplasma perinuclear (Figs. 50 e 51). No final deste estágio, o axonema apresenta o padrão tubular "9 + 9 + 2", mas o lúmen dos microtúbulos acessórios ainda é elétron-transparente (Fig. 78). Aparecem microtúbulos citoplasmáticos entre os derivados mitocondriais. O citoplasma flagelar de volume reduzido apresenta muitos polisomas livres, alguns corpos multivesiculares e dictiosomas do complexo de Golgi. Na sua periferia, nota-se, o apêndice reticular (Fig. 78).

Estágio 6 - Espermatídes em Alongamento

Os eventos principais são: a formação do adjunto do centríolo e o aparecimento de microtúbulos citoplasmáticos ao redor do núcleo (Figs. 52 e 53), do acrosoma tubular na cabeça das espermatídes e ladeando os derivados mitocondriais nos flagelos. No núcleo em alongamento, a cromatina forma um

emaranhado de filamentos espessos separados por espaços claros (Figs. 51 e 52). Uma cisterna lisa estreita e adjacente à coroa de microtúbulos se estende gradualmente, isolando o núcleo e o acrosoma do resto do citoplasma perinuclear (Figs. 52 e 53). O "centríolo" se insere na região basal do núcleo e este último estende-se lateralmente até a porção inicial do axonema (Fig. 54). O conteúdo dos túbulos acessórios recém formados e dos subtúbulos A dos pares periféricos se torna elétron-denso (Figs. 79 e 80). O axonema ("9 + 9 + 2") está separado dos derivados mitocondriais por uma cisterna lisa e estreita (Fig. 80). No início da fase, há várias fileiras de microtúbulos intercalados por cisternas, ladeando parcialmente os derivados (Fig. 79). No final, apenas uma fileira de microtúbulos e uma cisterna lisa flanqueiam os derivados mitocondriais (Fig. 80). As cisternas ao redor do axonema e dos derivados se fundem em um envoltório único. O derivado mitocondrial maior se diferencia (Figs. 79 e 80). Muitos polisomas ocorrem no citoplasma flagelar. Na periferia do flagelo, destaca-se o apêndice reticular com aspecto semelhante aos das regiões cefálica e centriolar (Figs. 79 e 80).

Estágio 7 - Espermatídes em Alongamento

A principal característica nuclear deste estágio é a transformação dos filamentos cromatínicos em uma de malha densa que vai se tornando cada vez mais espessa. Há maior redução do volume nuclear. No citoplasma perinuclear, persistem a coroa de microtúbulos e os polisomas livres. O acrosoma tubular, justaposto ao núcleo (Fig. 55), mantém-se na mesma posição. O apêndice reticular está mais desenvolvido. O adjunto do centríolo persiste, porém se apresenta mais denso e menor. No axonema, o conteúdo dos túbulos acessórios mostra maior densidade (Fig. 81). Na matriz do derivado maior, formam-se esférulas densas adjacentes à face próxima ao axonema e as zonas corticais espessadas opostas são ladeadas por microtúbulos (Figs. 81 e 82). Uma cisterna lisa e estreita isola o axonema, os derivados mitocondriais e os microtúbulos

citoplasmáticos do resto do citoplasma (Fig. 82). O apêndice reticular esférico é mais desenvolvido na região flagelar e se liga à membrana por meio de septos (Fig. 82).

Estágio 8 - Espermatídes em Alongamento

As cabeças mais finas, mais longas e mais compactas das espermatídes se inserem profundamente no citoplasma da célula cística apical. O citoplasma perinuclear está muito reduzido. Ainda persistem os microtúbulos e a cisterna lisa ao redor do núcleo. A cromatina se organiza em fibrilas cada vez mais densas e o acrosoma tubular apresenta-se dilatado na região basal do núcleo (Fig. 55). O adjunto do centríolo está ainda presente. Os flagelos se organizam em feixes. O apêndice reticular mantém-se na mesma posição (Fig. 83). O volume do citoplasma flagelar se reduz ainda mais. O envelope liso ao redor do axonema e dos derivados mitocondriais (ou do derivado maior) desaparece, ou envolve apenas o axonema (Fig. 83). Ocorre redução do número de microtúbulos ao redor do derivado maior. A matriz deste último se diferencia em uma faixa cortical mais elétrion-densa e uma zona medular menos elétrion-densa (Fig. 83). Na zona cortical, as esférulas coalescem e formam uma faixa, que irá originar o eixo cilíndrico denso do derivado maior. Prolongamentos citoplasmáticos da célula cística se projetam entre as células espermatícas.

Estágio 9 - Espermatídes em Maturação

Nesta fase, o núcleo mostra aspecto denso e homogêneo, com cromatina compactada. Uma coroa de microtúbulos perinucleares mantém-se ligados ao envelope nuclear (Fig. 56). O citoplasma perinuclear homogêneo está muito reduzido. O adjunto do centríolo desaparece até o final da fase. O núcleo se estreita na base, prologando-se até a porção inicial do flagelo, ladeando o axonema. O apêndice reticular está mais desenvolvido. Nos flagelos (Fig. 84), observa-se que: (a) o axonema está completo; (b) os dois derivados

mitocondriais de tamanhos e elétron-densidades diferentes estão envoltos por um único envelope, e somente o maior apresenta duas camadas distintas (Fig. 86); (c) persistem duas pequenas cisternas laterais, associadas a duas áreas densas entre o axonema e os derivados mitocondriais (Fig. 84); no final da fase, as cisternas se reduzem a duas vesículas e as áreas densas persistem em forma de pequenas pontes (Fig. 87); (d) os microtúbulos citoplasmáticos desapareceram (Figs. 84 e 87); (e) próximo ao apêndice reticular, os apêndices laciniados começam a diferenciar-se (Fig. 84).

Estágio 10 - Espermatozóides nos Cistos

Os espermatozóides completaram sua maturação nos cistos intratesticulares. Na região da cabeça (Figs. 57 e 58), a membrana plasmática, justaposta ao núcleo e ao acrosoma tubular que o ladeia, apresenta uma coroa de apêndices laciniados e um apêndice reticular de posição mais periférica (Figs. 57 e 58). O núcleo muito denso apresenta cromatina altamente compactada (Fig. 58). O acrosoma tubular está justaposto à face plana do núcleo. Na região basal do núcleo, este se estende junto ao corpúsculo basal e à porção inicial do axonema. O adjunto do centríolo desapareceu completamente. As cabeças dos espermatozóides estão separadas pelo citoplasma da célula cística (Figs. 57 e 58), orientando-se em uma única direção.

Nos flagelos, em corte transversal, quase toda a periferia da membrana está decorada com uma manta de apêndices laciniados. O apêndice reticular, nas regiões flagelares iniciais, é esférico, volumoso, e os septos, que o ligam à membrana plasmática, estão muito reduzidos. Membrana celular intimamente justaposta ao derivado mitocondrial maior (ou aos dois derivados), e ao axonema. No derivado mitocondrial maior reniforme, as cristas helicoidais muito modificadas confluem para o eixo cortical denso, justaposto ao axonema. Na zona medular, não há nenhum material de natureza paracristalina. No axonema completo, destacam-se os microtúbulos acessórios de maior calibre e

de conteúdo com maior elétron-densidade. Nas regiões medianas da peça principal do flagelo (Figs. 88 e 89), a manta radial é muito reduzida ou ausente e o apêndice reticular está menor. Presença de duas pontes densas ligando o axonema à membrana plasmática (Fig. 89). Nas regiões medianas e mediano-posteriores dos flagelos, os espermatozóides eupirenes estão mais livres na luz do cisto (Figs. 93 e 94). Nas regiões mais anteriores do feixe eupirene, os flagelos dispõem-se em uma configuração hexagonal (Fig. 90, 91 e 95). Maiores detalhes sobre a organização ultra-estrutural dos espermatozóides eupirenes que completaram sua maturação nos cistos testiculares de imagos foram descritos anteriormente (Medeiros, 1986).

3.5. Detecção de Proteínas Básicas com E-PTA

Os apêndices reticulares dos flagelos dos espermatozóides eupirenes apresentam forte reação positiva ao E-PTA, tanto em cortes transversais (Figs. 90 e 91) como longitudinais (Fig. 92). Uma leve reação positiva ao E-PTA foi observada na periferia dos microtúbulos acessórios (Fig. 90).

3.6. Microscopia de Varredura

3.6.1. Montagem Total de Espermatozóides

Preparações de acordo com o método I permitiram observar feixes inteiros de espermatozóides eupirenes e apirenes (Fig. 96). Os feixes eupirenes são extremamente longos (ca. de 1 mm de comprimento) em comparação com os feixes apirenes, cujo comprimento varia de 200-250 μm no máximo. Portanto, os espermatozóides eupirenes são ca. de 4 a 5 vezes maiores que os apirenes. Os feixes eupirenes mostram torção helicoidal ao longo de toda a extensão dos flagelos dispostos paralelamente (Figs. 96 e 97) e estes terminam em diferentes alturas na extremidade distal do feixe (Fig. 98). Na região mais proximal do

feixe eupirene (Fig. 96), estão localizadas as cabeças longas e finas dos espermatozóides, também dispostas paralelamente, ocupando níveis levemente diferentes e conferindo um contorno arredondado à região anterior do feixe.

3.6.2. Criofratura de Testículo de Imago

Os flagelos dos espermatozóides, tanto eupirenes como apirenes, fraturados, mostram-se agrupados em feixes contidos em cistos separados e distribuídos de modo aleatório nos folículos testiculares (Fig. 93). Os feixes eupirenes, criofraturados em diferentes alturas dos seus flagelos, podem apresentar-se compactos em uma configuração hexagonal típica (Fig. 95) ou dispor-se mais livres no lúmen cístico (Fig. 94). Nos feixes apirenes criofraturados (Figs. 20, 21 e 93), a disposição dos flagelos não forma nenhuma configuração geométrica, mesmo quando bem próximos uns dos outros, como também se nota em cortes transversais (Fig. 19).

FIGURAS

Fig. 39 - Secção longitudinal de uma espermátide eupirene em fase bem precoce do processo de espermiogênese. Inicialmente, o núcleo (N) de volume reduzido apresenta grumos densos de cromatina (*) acolados à face interna do envelope nuclear. Camadas de cisternas lisas e granulares do retículo endoplasmático (RE) se dispõem ao redor do núcleo e próximo dos derivados mitocondriais (seta) em transformação. Numa área próxima ao núcleo, observa-se a porção inicial de um flagelo projetando-se parcialmente no interior de uma vesícula (círculo). G - complexo de Golgi. **9.200 x**.

Fig. 40 - Neste corte de uma espermátide eupirene, nota-se, em uma região próxima do núcleo (N), a formação inicial do pro-acrosoma (PA) de formato irregular e situado entre as regiões "trans" de duas unidades golgianas (G) bem desenvolvidas. No núcleo, a cromatina (C) apresenta aspecto semelhante àquela da fig. 79. "Nebenkern" (NK) em transformação, localizado próximo do núcleo e de uma unidade golgiana. V - vesícula. **30.000 x**.

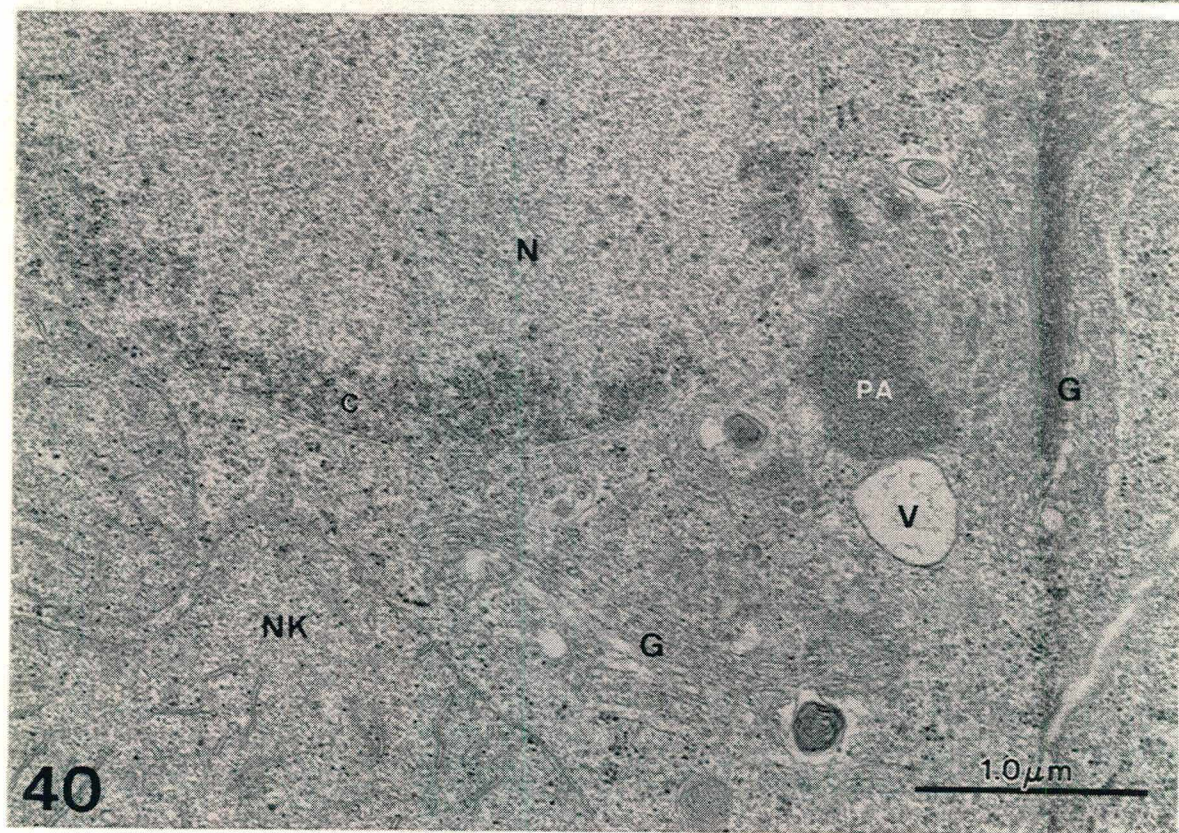


Fig. 41 - Corte transversal de uma espermátide eupirene em estágio inicial de desenvolvimento. Nesta fase, o pro-acrosoma (PA) já está localizado em posição adjacente ao envoltório nuclear, apresentando formato de um grânulo ± esférico. Golgi (G) bem desenvolvido próximo ao grânulo pro-acrosomal. O núcleo (N) permanece com aspecto semelhante ao das figuras anteriores. Presença de corpos multivesiculados (CMV) no citoplasma. Notam-se, também, duas invaginações citoplasmáticas (*) da célula cística (CC) vizinha no citoplasma da espermátide. As pontas de setas indicam junções septadas entre as membranas plasmáticas da espermátide e da célula cística. **18.000 x.**

Fig. 42 - Corte longitudinal de uma espermátide eupirene em estágio semelhante a da fig. 81. O núcleo (N) situa-se em posição lateral ao corpúsculo basal (CB) e parte do axonema (AX). A cromatina (C) permanece sem modificações aparentes. Parte do derivado mitocondrial (DM) situa-se entre o núcleo e região proximal do axonema. Complexo de Golgi (G) bem desenvolvido. Célula cística (CC) com retículo endoplasmático granular (REG) bem desenvolvido e um dictiosoma golgiano (G). **18.000 x.**

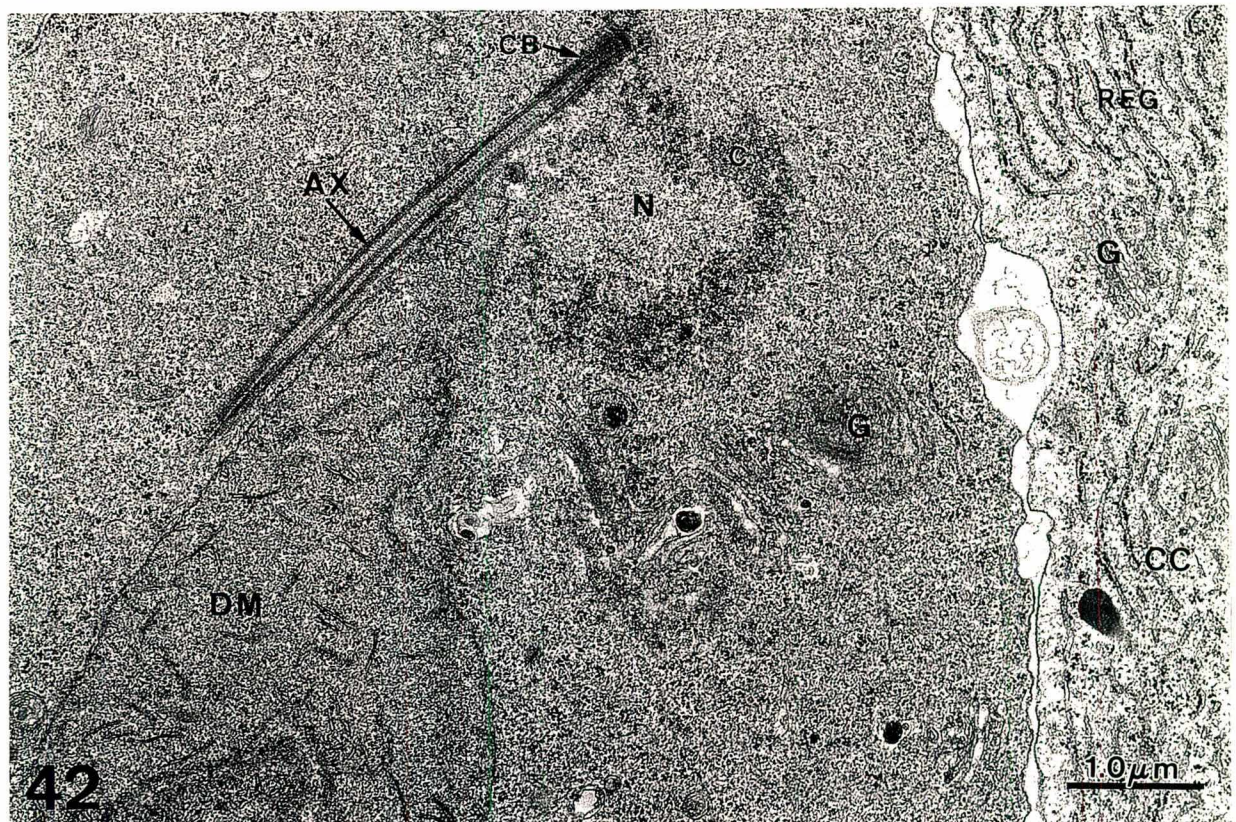
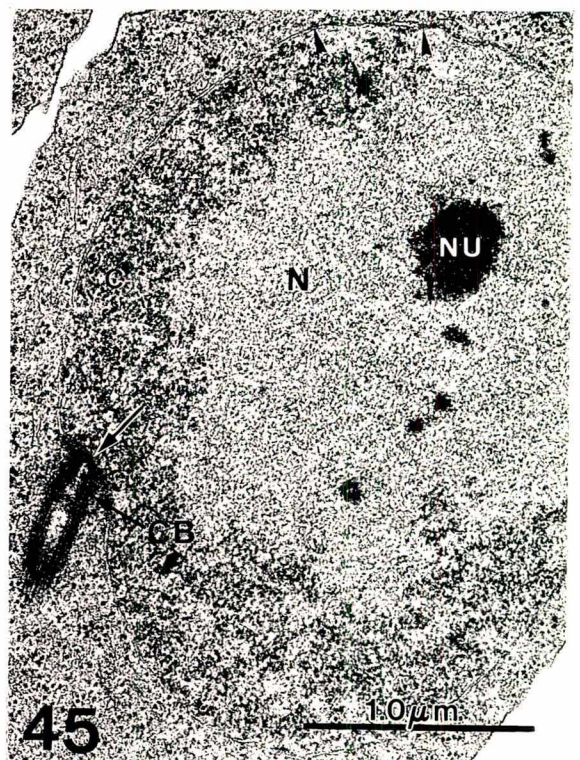
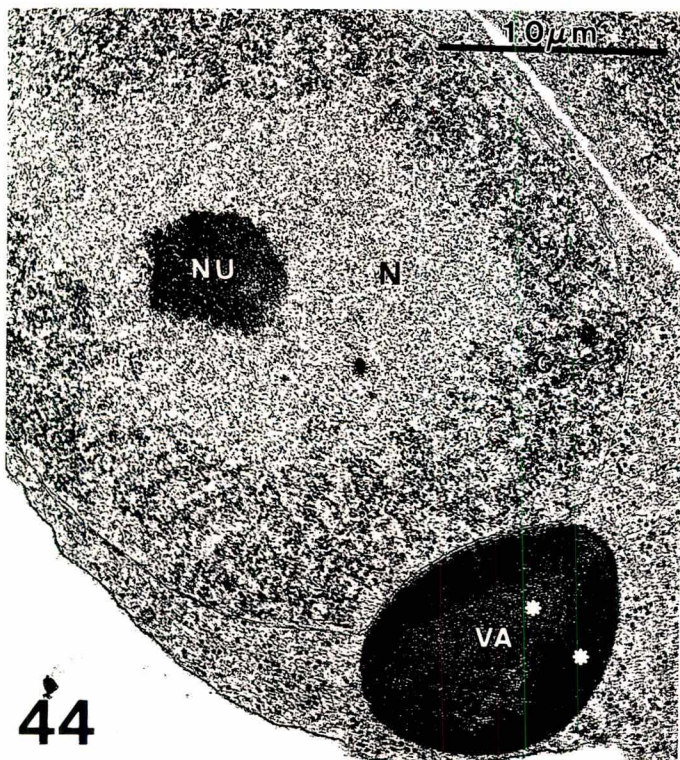
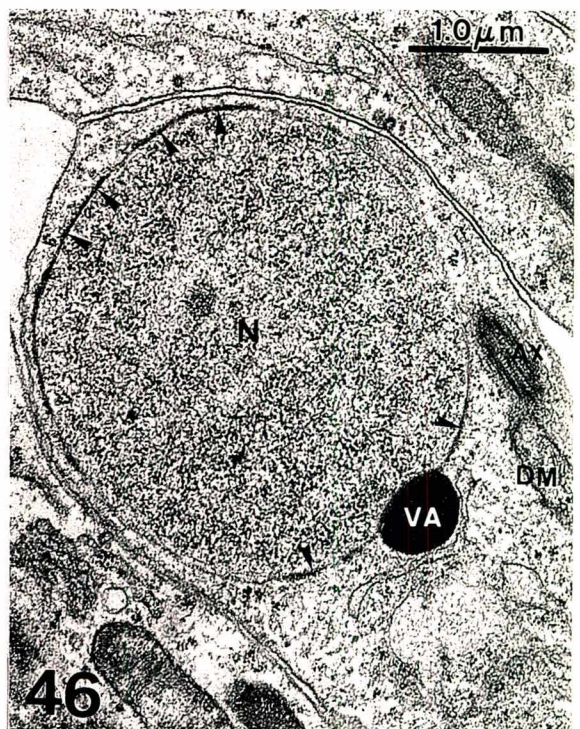


Fig. 43 - Região anterior de uma espermátide eupirene. O grânulo proacrossômico se transformou em uma vesícula acrossômica (VA) esférica e situada numa depressão do núcleo (N). Nesta região de contato, a vesícula acrossômica apresenta um espessamento da sua membrana (seta) e a área de contato com a membrana plasmática mostra-se elétron-densa (pontas de setas). O conteúdo vesicular finamente granular apresenta uma área de início de condensação. O núcleo mostra uma faixa de cromatina (C) muito esparsa e subjacente ao envelope nuclear. Presença de nucléolo filamentososo (NU). **20.000 x.**

Fig. 44 - Corte longitudinal da região anterior de uma espermátide eupirene. A vesícula acrossômica (VA), agora, está situada em posição oposta àquela da fig. 83. Seu conteúdo bem elétron-denso apresenta duas regiões de diferentes densidades (*). O núcleo (N) apresenta uma faixa densa e contínua de cromatina (C) periférica de aspecto granular. Nucléolo (NU) ainda presente. **30.000 x.**

Fig. 45 - Neste corte longitudinal da região anterior de uma espermátide eupirene, observa-se a inserção do corpúsculo basal (CB) em uma depressão do núcleo (N). Nesta área nota-se um espessamento (seta) do envelope nuclear. Cromatina (C) em estado morfológico semelhante ao da figura anterior. Nucléolo (NU) ainda presente. **30.000 x.**

Fig. 46 - Secção longitudinal da região apical de uma espermátide eupirene em fase um pouco mais avançada que as das figuras anteriores. A vesícula acrossômica (VA) agora está situada numa posição totalmente oposta àquela mostrada na fig. 83, em função de um giro de ca. 180° do núcleo (N). Em certas áreas do envelope nuclear, observam-se grupos de poros (pontas de setas). Nucléolo ausente. Cromatina granular de aspecto homogêneo. DM - derivados mitocondriais; AX - axonema flagelar. **18.000 x.**



44

45

43

46

Fig. 47 - Secção transversal de parte de um cisto contendo regiões anteriores de espermátides eupirenes. Estas se encontram em diferentes estágios de maturação considerando, principalmente, as posições relativas da vesícula acrossômica (VA) e do corpúsculo basal (CB) ou do axonema (ponta dupla de seta). Nucléolo presente. A ponta simples de seta indica um dos derivados mitocondriais. A célula assinalada com seta acha-se ampliada na figura seguinte. **9.200 x**.

Fig. 48 - Vista ampliada da espermátide assinalada na Fig. 47. A vesícula acrossômica (VA) está em fase inicial de condensação e ainda em contato com a membrana plasmática. O núcleo (N) apresenta espessamentos em seu envelope (pontas de setas). **29.400 x**.

Fig. 49 - Vista ampliada de regiões anteriores de duas espermátides eupirenes em estágio evolutivo intermediário ao das Figs. 45 e 46. As vesículas acrossômicas (VA) mostram duas regiões de diferentes elétrons-densidades (*). Na espermátide à esquerda, a vesícula já está situada no pólo distal da célula e próxima de um derivado mitocondrial (DM). Na outra, a vesícula acrossomal ainda se encontra em contato direto com a membrana plasmática, marcado por um espessamento (seta). AX - axonema; N - núcleo. **30.000 x**.

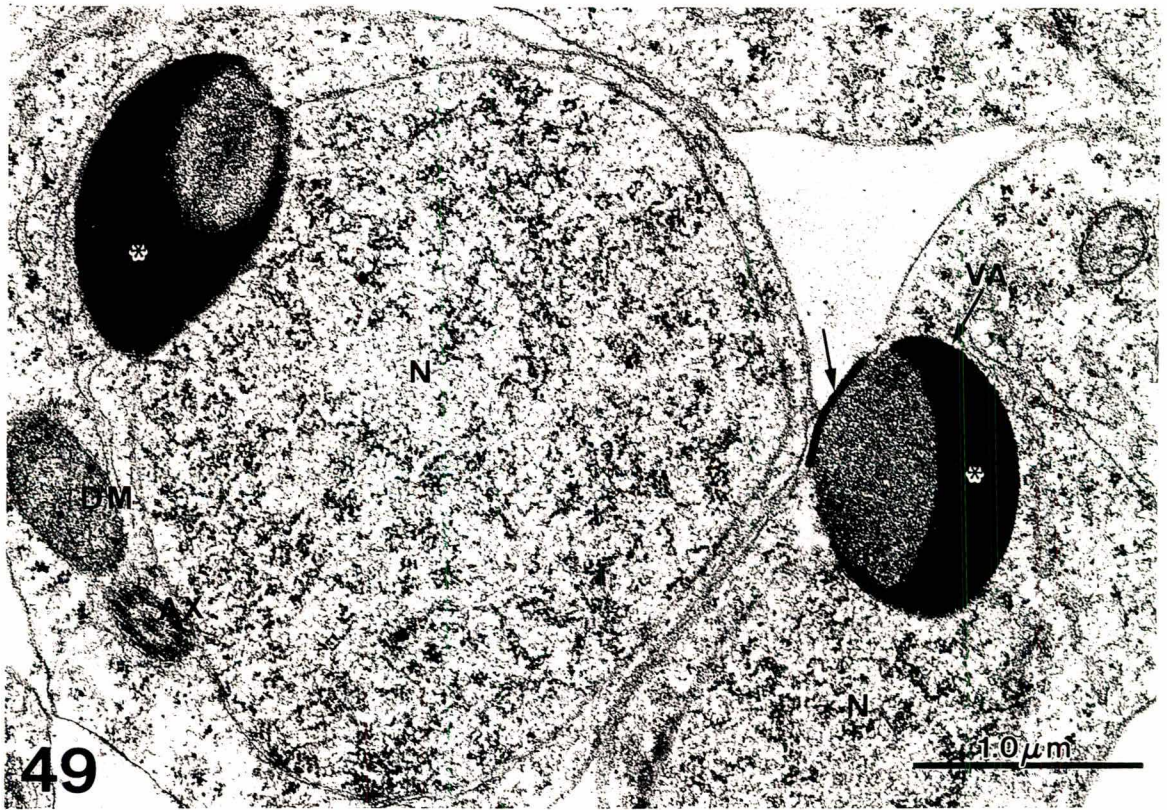
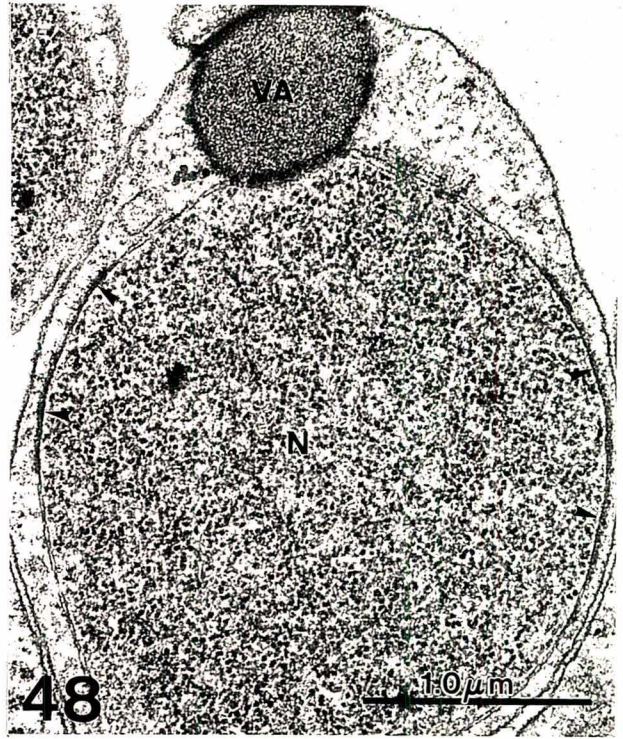
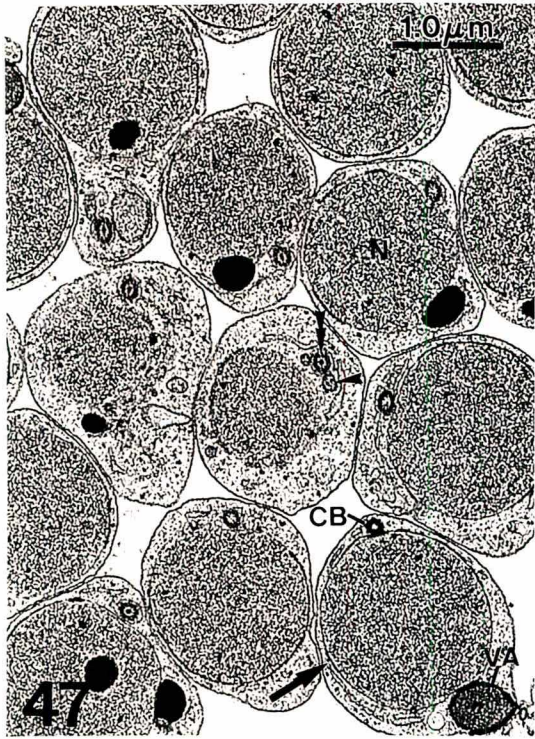


Fig. 50 - Espermátide eupirene seccionada transversalmente ao nível do núcleo (N) e do corpúsculo basal (CB), que está alojado numa depressão em um dos pólos do núcleo. A cromatina apresenta-se mais condensada, formando fileiras de grânulos. Cisternas lisas (pontas duplas de setas) ladeiam parcialmente o envelope nuclear. Nota-se, agora, a presença do apêndice reticular (AR), ligado à superfície externa da membrana plasmática em uma região próxima ao corpúsculo basal. **36.000 x.**

Fig. 51 - Secção transversal de duas outras espermátides equivalentes à da figura anterior. A célula do canto superior direito foi seccionada na região apical da cabeça, onde se observa somente o acrosoma tubular (AT) excêntrico, de paredes espessas e rodeado por uma fileira de microtúbulos (ponta de seta). Presença de cisternas (pontas duplas de setas) ladeando os microtúbulos. Na periferia celular, o apêndice reticular (AR) situa-se muito próximo do acrosoma tubular. Alguns microtúbulos (ponta de seta) aparecem entre o envelope nuclear e estreitas cisternas lisas (pontas duplas de setas). CB - corpúsculo basal; N - núcleo. **50.000 x.**

Fig. 52 - Corte transversal na altura da região posterior da cabeça de uma espermátide eupirene. O núcleo (N) de volume reduzido se encontra em estágio mais avançado no processo de compactação da cromatina, a qual se apresenta sob a forma de filamentos espessos (setas). Numa depressão nuclear e adjacente ao apêndice reticular (AR), observa-se a porção terminal do acrosoma tubular (AT). Uma fileira de microtúbulos (pontas de setas) ocupa o espaço entre uma cisterna lisa (ponta dupla de setas) e o envelope nuclear. **54.000 x.**

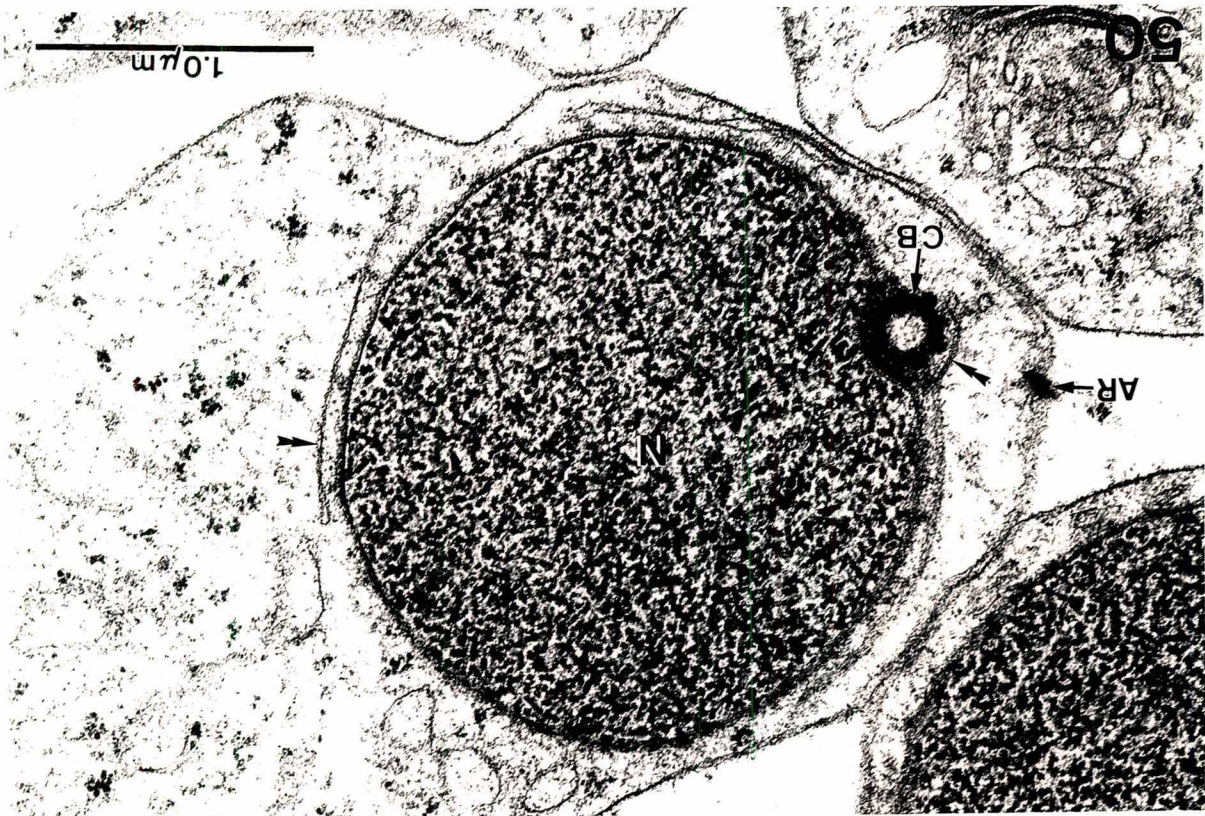
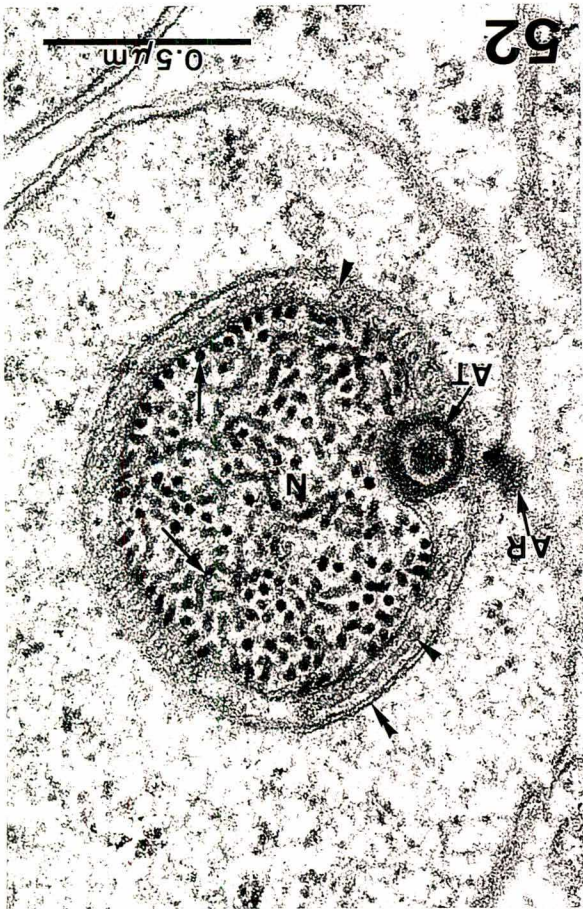


Fig. 53 - Corte transversal ao nível da região mediana da cabeça de uma espermátide eupirene em estágio evolutivo um pouco mais avançado que o da figura 52. O núcleo (N) apresenta uma rede de filamentos espessos de cromatina. Entre o envelope nuclear e o acrosoma tubular (AT) há um espessamento (seta). Ao redor do envoltório nuclear, dispõe-se uma fileira de microtúbulos (pontas de setas) circundados por uma estreita cisterna (ponta dupla de seta) que se prolonga até a região do acrosoma. O apêndice reticular (AR) permanece bem próximo do acrosoma. **45.000 x.**

Fig. 54 - Corte transversal de espermátide eupirene ao nível da região posterior da cabeça. Observa-se o corpúsculo basal (CB) compreendido entre o adjunto do centríolo bem desenvolvido (AC) e uma faixa estreita do núcleo (N). Cromatina em estágio semelhante ao da figura 53. Uma fileira única de microtúbulos (ponta de seta) ladeia parcialmente o núcleo. Um envelope membranoso (ponta dupla de seta), oriundo de uma cisterna lisa, isola o núcleo, o corpúsculo basal e o adjunto do centríolo, do resto do citoplasma. Outra fileira de microtúbulos citoplasmáticos (ponta de seta) se dispõe entre esse envelope e uma cisterna lisa (seta) mais externa. AR - apêndice reticular. **60.000 x.**

Fig. 55 - Corte longitudinal de parte da cabeça e da região proximal do flagelo de uma espermátide eupirene. Observa-se o acrosoma tubular (AT) ladeando o núcleo (N). A seta indica o limite inferior do acrosoma tubular. A cromatina se apresenta sob a forma de filamentos espessos (setas brancas). CB - corpúsculo basal; AR - apêndice reticular. **60.000 x.**

Fig. 56 - Corte transversal de um núcleo (N) de espermátide eupirene, apresentando cromatina compactada e com aspecto homogêneo. Ao redor do núcleo, presença de uma fileira de microtúbulos citoplasmáticos interligados por meio de pequenas pontes (pontas de setas). **90.000 x.**

Fig. 57 - Corte oblíquo de cabeças de espermatozóides eupirenes ao nível das regiões apicais. As cabeças estão mergulhadas completamente no citoplasma da célula cística (CC). Núcleos (N) com cromatina condensada ao máximo e envoltos por coroas de apêndices laciniados (AL). Mais externamente, notam-se os apêndices reticulares (AR). **10.500 x.**

Fig. 58 - Cabeças de espermatozóides eupirenes seccionadas ao nível de suas regiões medianas. O acrosoma tubular (AT) localiza-se ao lado da face aplanada ou levemente côncava do núcleo (N). AL - apêndices laciniados; AR - apêndices reticulares. **16.000 x.**

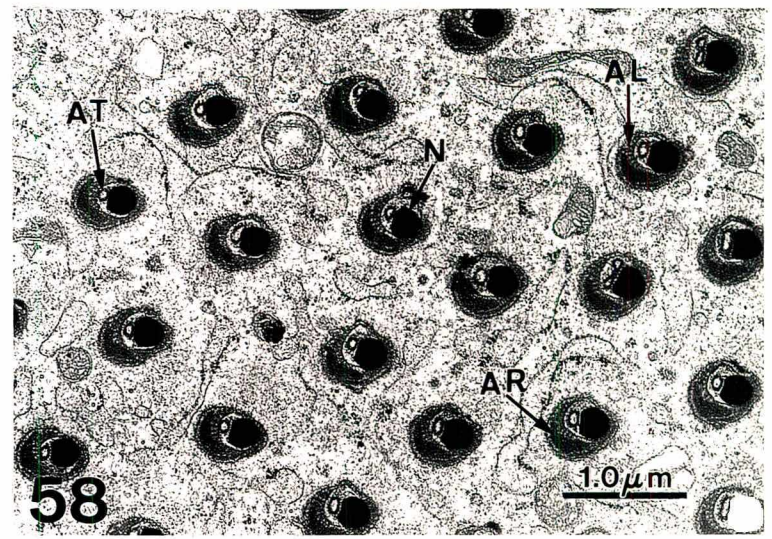
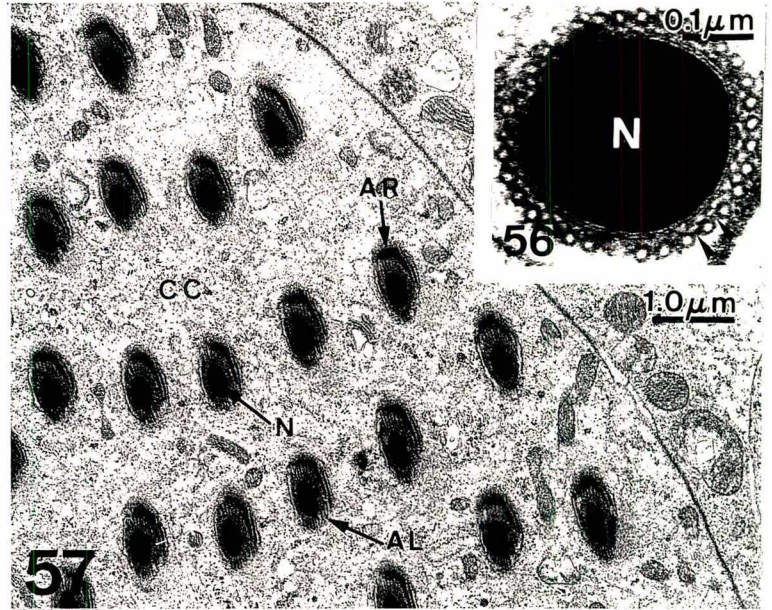
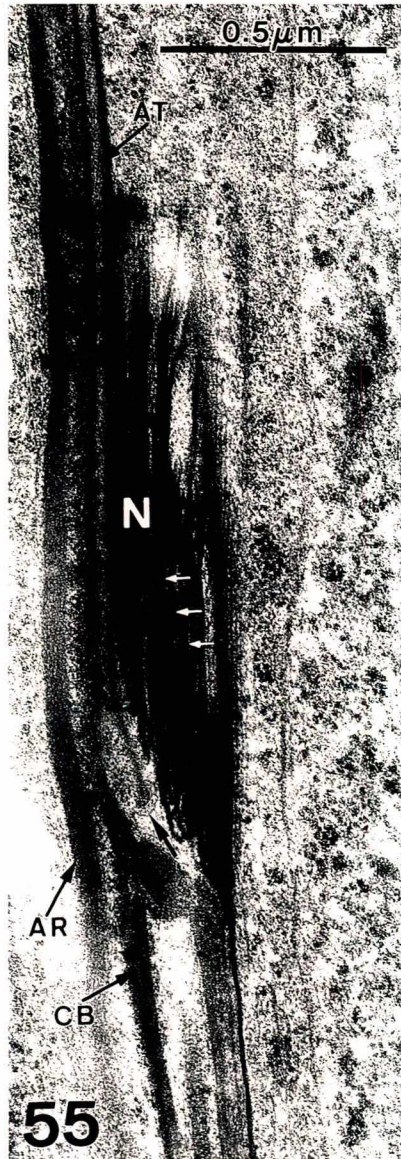
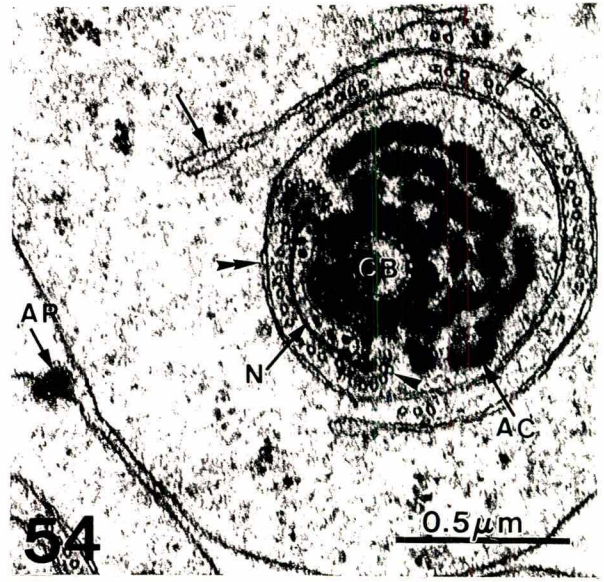
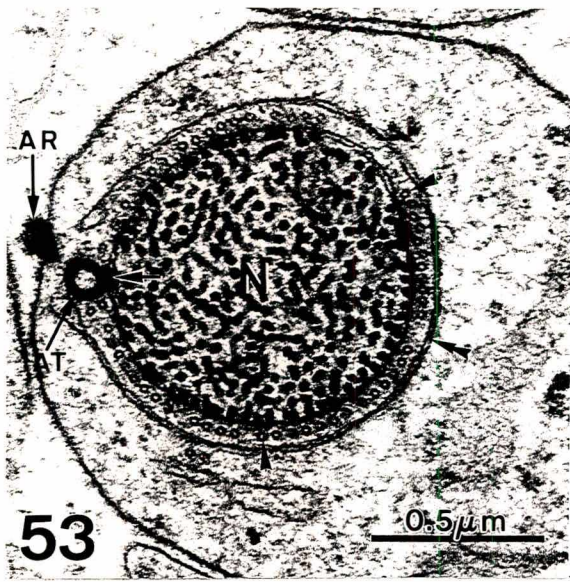


Fig. 59 - Citoplasma de uma espermátide eupirene, na qual se destaca parte de um "Nebenkern" (NK) em estágio inicial. Nas mitocôndrias (mi) deste complexo, evidenciam-se os envelopes membranosos (setas) e algumas cristas (pontas de setas). Próximo ao complexo mitocondrial, observa-se um complexo de Golgi (G). O citoplasma apresenta grande número de ribosomas (R) livres, mas o retículo endoplasmático granular (REG) é reduzido. **16.000 x**.

Fig. 60 - Grupo de espermátides em desenvolvimento com agrupamentos compactos de mitocôndrias no estágio inicial da formação dos "Nebenkern" (NK). Destaca-se, também, em uma das células espermáticas, sáculos de um complexo de Golgi (G). No canto superior direito, observam-se o núcleo (N) e o citoplasma (C) de uma célula cística vizinha. Preparação de criofratura em etanol. **MEV - 6.000 x**.

Fig. 61 - Complexo mitocondrial ("Nebenkern") de espermátide, provavelmente apirene, em fase de desenvolvimento mais avançada que aquelas mostradas nas figuras anteriores. Em algumas mitocôndrias do complexo, ainda estão evidentes as cristas (setas). As pontas simples de setas indicam grânulos densos típicos da matriz mitocondrial e a ponta dupla de seta indica o envelope membranosos. Citoplasma rico em ribosomas livres (R). **28.000 x**.

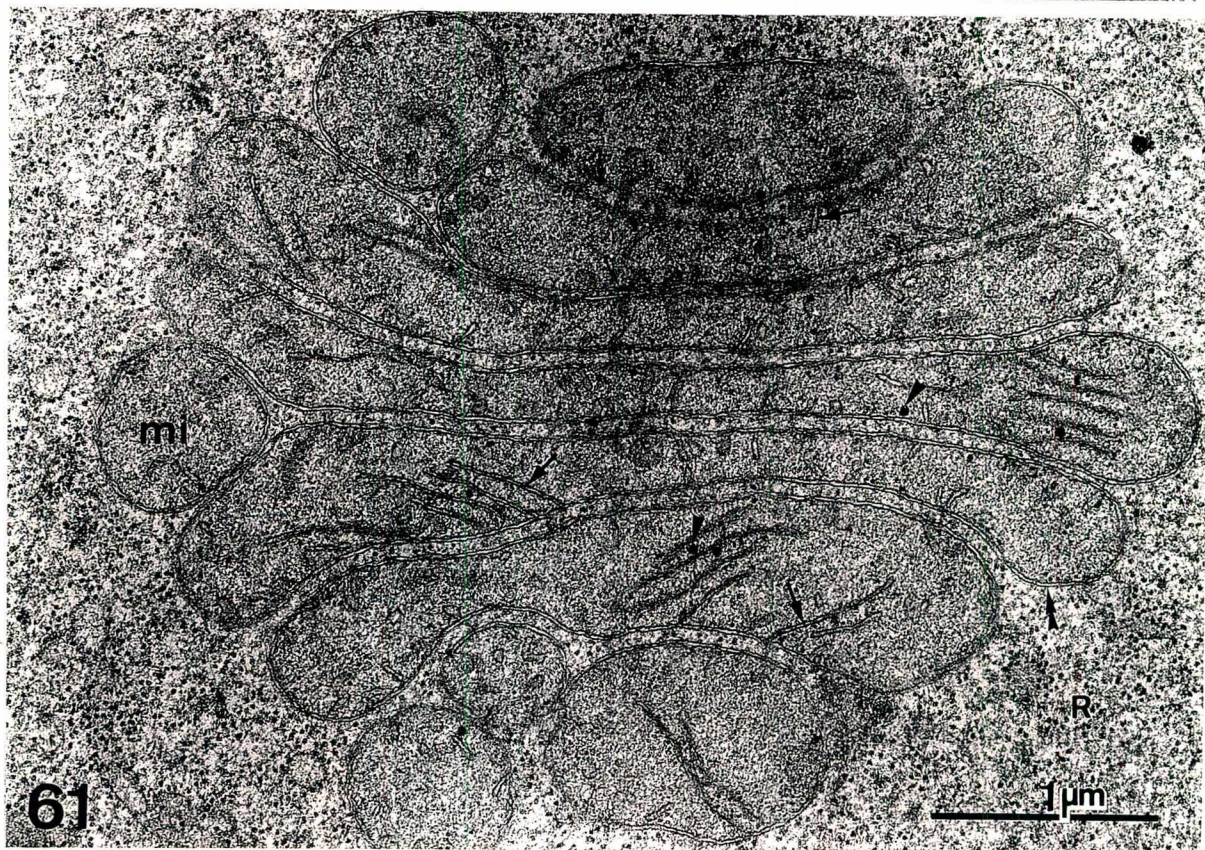
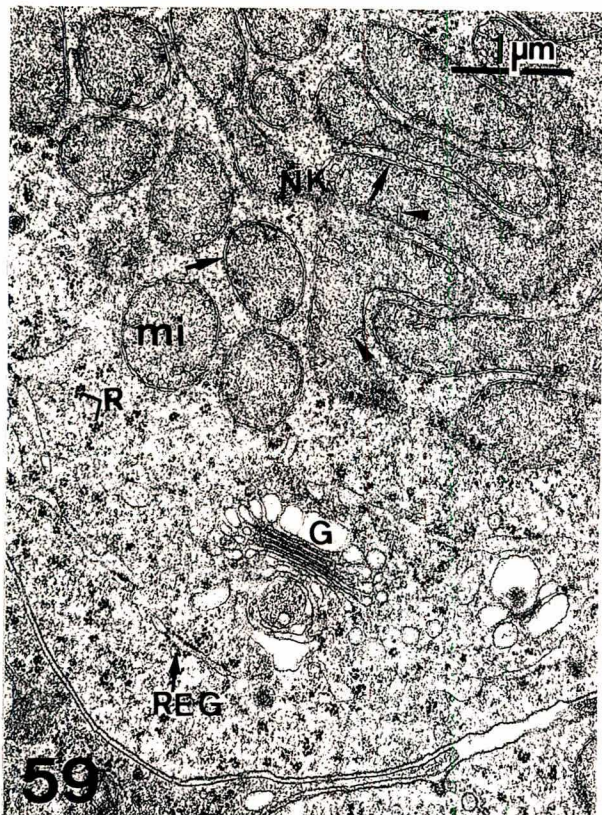


Fig. 62 - "Nebenkern" de espermátide eupirene em uma fase de desenvolvimento mais avançada que aquelas mostradas nas figuras da prancha anterior. Nota-se que o processo de fusão mitocondrial está mais avançado (*) e que as cristas mitocondriais já estão reduzidas em tamanho e número, com exceção de algumas delas (setas). Presença de grânulos densos (pontas de setas) típicos da matriz mitocondrial. A ponta dupla de seta indica o envelope do "Nebenkern". **24.000 x.**

Fig. 63 - Secção transversal de outro "Nebenkern" em um estágio semelhante ao da figura anterior. Na densa matriz mitocondrial do "Nebenkern", observa-se um menor número de cristas de tamanho reduzido (setas). Nos espaços sinuosos claros do complexo mitocondrial, nota-se a presença de finos septos (pontas de setas menores). **36.000 x.**

Fig. 64 - Secção transversal de um complexo mitocondrial de espermátide eupirene num estágio mais avançado que os das figuras anteriores. Além da maior fusão mitocondrial, nota-se que o "Nebenkern" apresenta agora um aspecto de "labirinto" em função da maior remodelação mitocondrial. As cristas ainda estão presentes (setas), porém seu tamanho é mais reduzido. Nota-se, também, que algumas das regiões periféricas do "nebenkern" apresentam-se mais volumosas, com aspecto mais homogêneo e desprovida de cristas (*). Entre regiões vizinhas do "Nebenkern", observam-se finos septos (pontas de setas). **15.000 x.**

Fig. 65 - Ampliação de outro "Nebenkern" equivalente ao da figura 64. As cristas mitocondriais (setas), embora reduzidas em tamanho, e os grânulos densos da matriz ainda persistem. Evidencia-se a presença dos finos septos (pontas de setas) que interligam regiões vizinhas do complexo mitocondrial. A matriz das porções periféricas mais dilatadas (*) apresenta aspecto homogêneo, sem cristas. Envelope mitocondrial bem evidente (ponta dupla de seta). **30.000 x.**

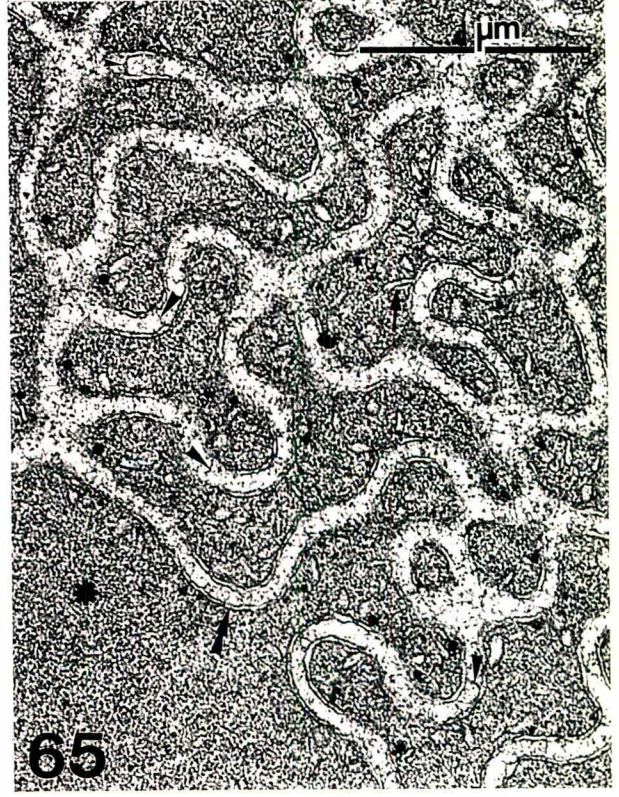
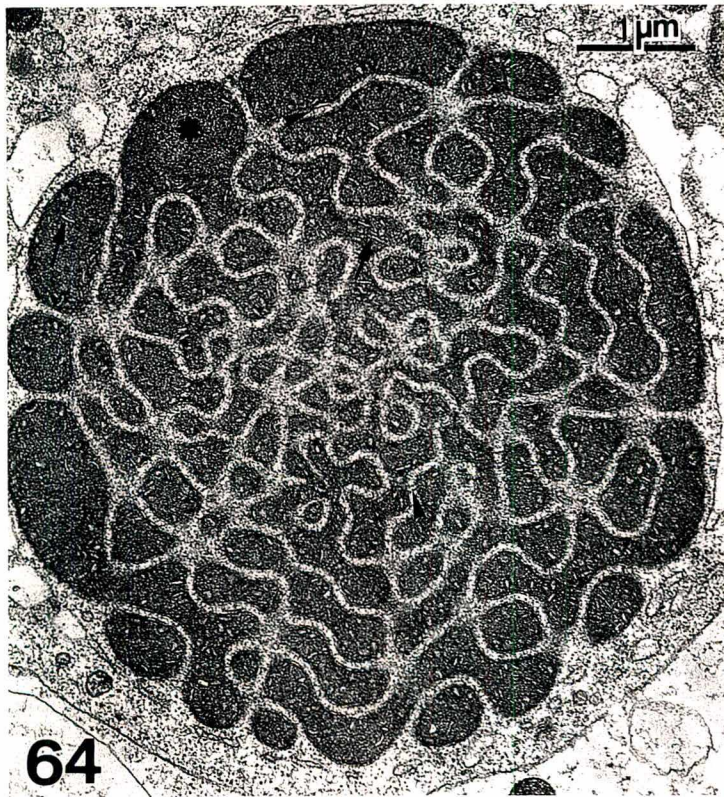
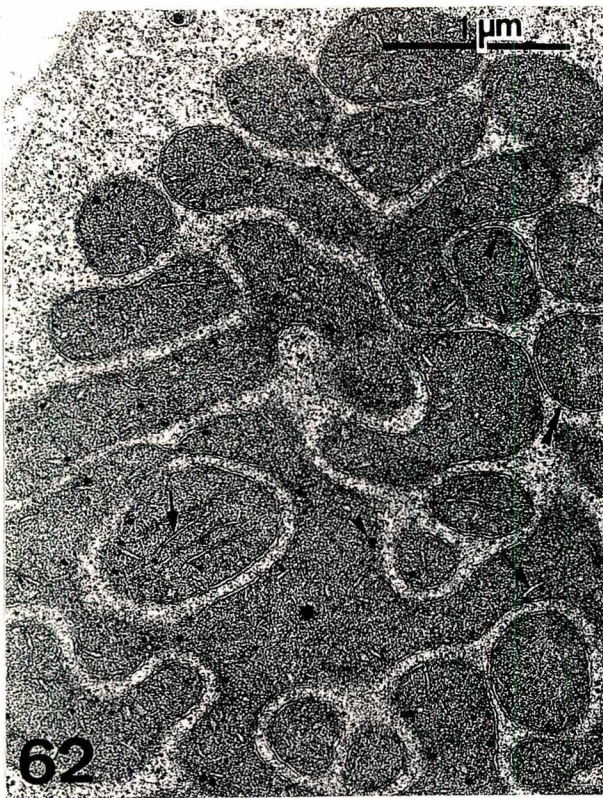


Fig. 66 - "Nebenkern" (nk) de uma espermátide eupirene. Neste estágio de desenvolvimento, a matriz mitocondrial volta a ser mais transparente e as camadas periféricas menos dilatadas. Há algumas cristas remanescentes (seta) e um número menor de grânulos densos na matriz. Entre compartimentos vizinhos no "nk", observam-se, também, alguns finos septos (pontas de setas). As duas camadas periféricas do complexo se estendem para o interior do mesmo por meio de pontes (*), imbricando-se nas camadas mais internas do "labirinto" mitocondrial. O axonema (AX) situa-se paralelamente e próximo a uma determinada região do "nk". A seta maior indica a região de contato entre as camadas periféricas, que coincide com o plano de simetria do complexo mitocondrial. Citoplasma rico em ribosomas livres (ri) e com esparsas cisternas do retículo endoplasmático granular (REG). **24.500 x**.

Fig. 67 - Neste estágio, o complexo mitocondrial se assemelha muito ao do chamado "onion Nebenkern". Considerando o plano de simetria do "nk" (setas), observam-se oito camadas sobrepostas imbricadas e bem distintas (numeradas de 1 a 8). Percebe-se que as camadas nº 2, 4, 6 e 8 estão interligadas e que o mesmo acontece com as camadas nº 3, nº 7 e, provavelmente, com a camada nº 1. A seta menor indica algumas cristas mitocondriais remanescentes e as pontas de setas, alguns septos interligando os envoltórios de camadas justapostas. O axonema flagelar permanece na mesma posição relativa. Citoplasma rico em ribosomas (ri) e com esparsas cisternas do retículo endoplasmático granular (REG). **20.000 x**.

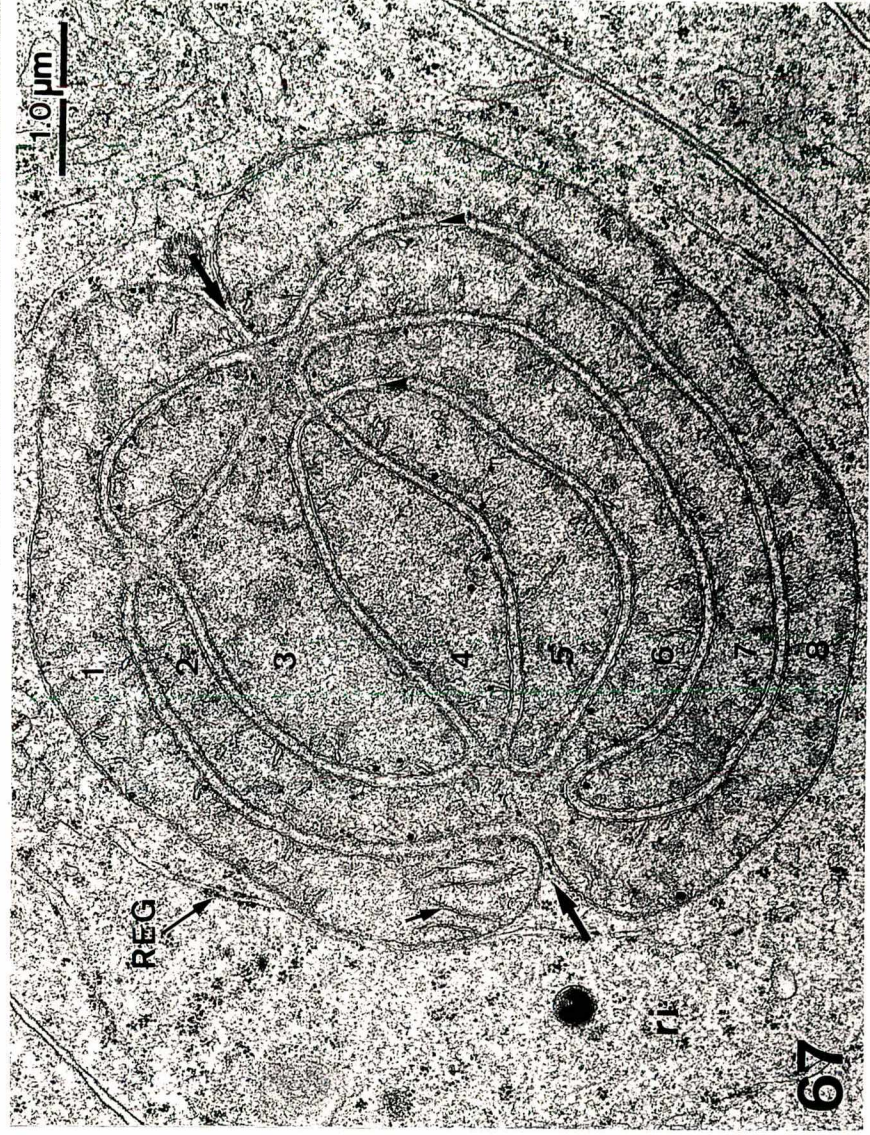
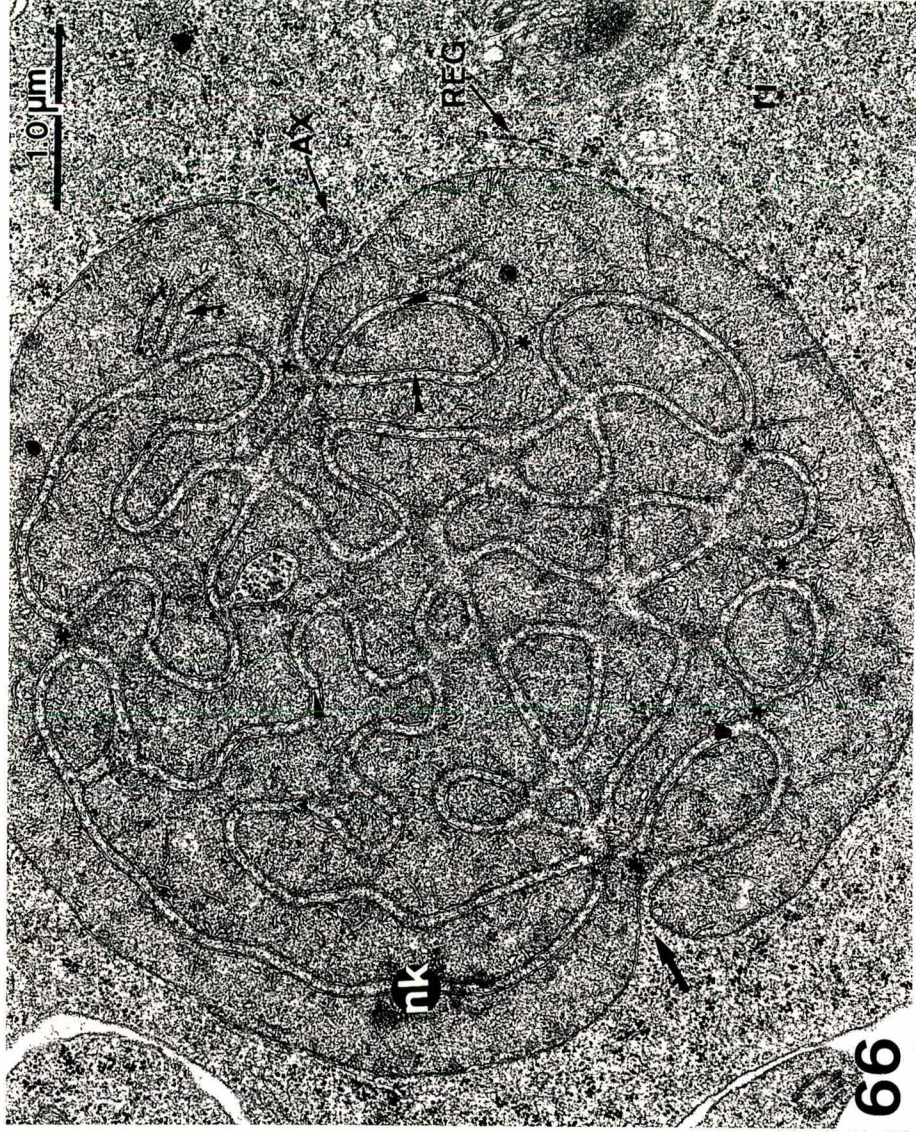


Fig. 68 - Secção oblíqua através de um "Nebenkern" mostrando, nesta fase de desenvolvimento, que já estão definidas três camadas concêntricas que se imbricam (asteriscos maior, médio e menor). As pontas de setas indicam que a camada mais externa (asterisco maior) do "Nebenkern" é contínua com a região mais central. **12.500 x.**

Fig. 69 - Secção transversal do "Nebenkern" de espermátide eupirene em fase de desenvolvimento semelhante à da figura anterior. Destacam-se 6 camadas numeradas (1-6), que representam, de fato, três regiões imbricadas, a saber: (1ª) camadas 1 e 3; (2ª) camadas 2 e 5; e a (3ª) camadas 4 e 6. O axonema (AX) permanece na mesma posição relativa ao "Nebenkern". **12.000 x.**

Fig. 70 - Secções transversais de dois derivados mitocondriais (DM) em fase de individualização. Observam-se quatro camadas superpostas e numeradas de 1 a 4, que correspondem a apenas duas regiões imbricadas. As camadas 1 e 3 formarão um derivado mitocondrial e as camadas 2 e 4, o outro. AX - axonema.; G - complexo de Golgi. **10.000 x.**

Fig. 71 - Secção transversal de duas espermátides eupirenes, nas quais se observam os derivados mitocondriais (DM) já individualizados. Um deles apresenta sempre matriz mais densa, além de um ou dois canais (asteriscos) preenchidos por citoplasma, que lhe conferem o aspecto de um número "8" ou de uma "rosquinha". O derivado de matriz mais clara pode ou não apresentar um único canal. Nesta fase, observa-se, no citoplasma, com freqüência, a presença de corpos multivesiculados (CMV) e dictiosomas do complexo de golgi (G) próximos aos derivados mitocondriais. **12.500 x.**

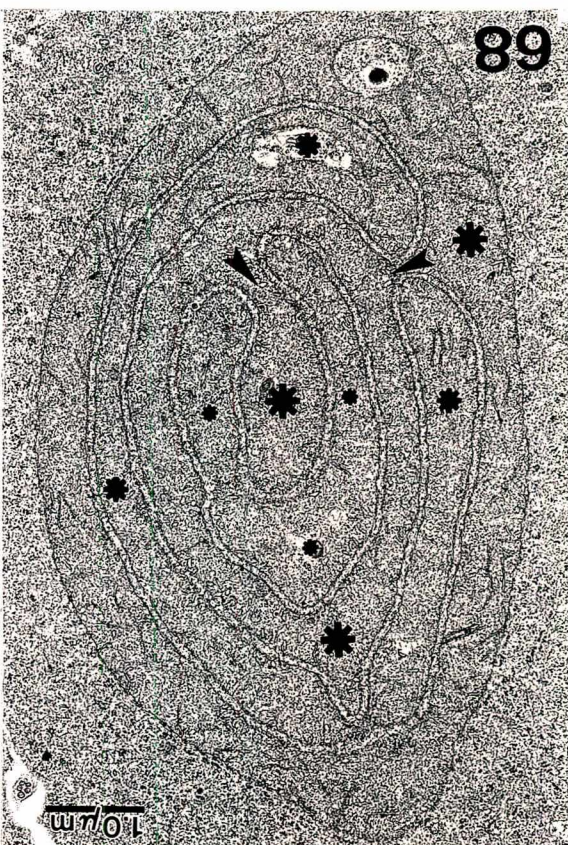
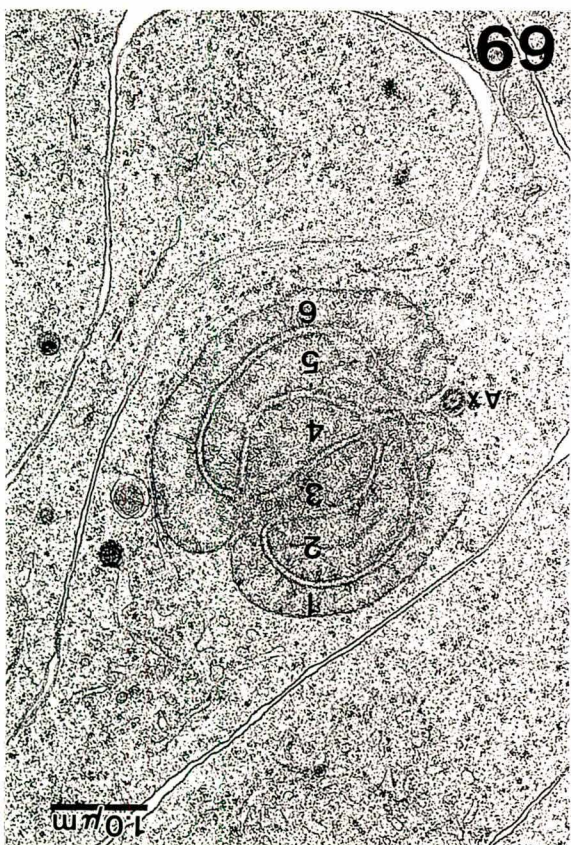
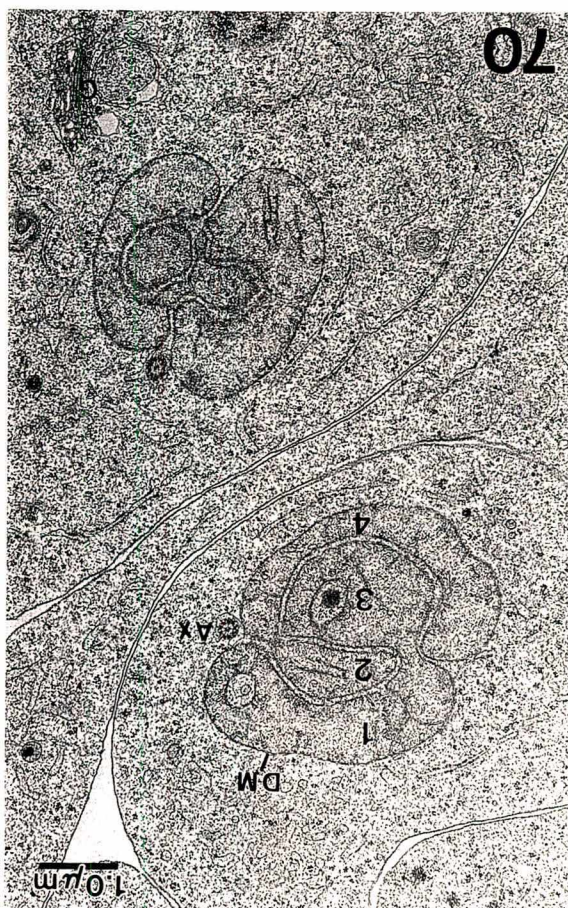
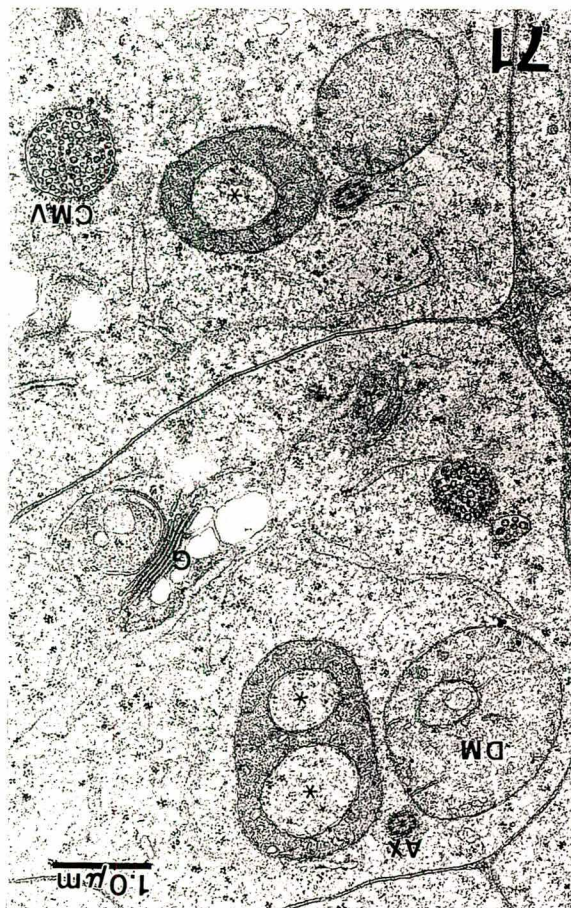


Fig. 72 - Extensa massa citoplasmática observada entre flagelos de espermátides eupirenes descartada durante o alongamento e transformação dos flagelos. Contém, em processo de desorganização, muitas mitocôndrias (M), diversos vacúolos (V) de conteúdo finamente fibrilar, muitos ribosomas (R), algumas cisternas do retículo endoplasmático (REG) próximas a sáculos golgianos (G), um corpo multivesicular (CMV) e corpos densos (CD). AX - axonema; DM - derivado mitocondrial. **15.000 x**.

Fig. 73 - Figura mielínica (FM) formada por membranas descartadas e, excepcionalmente, localizadas no interior de um derivado mitocondrial (DM). Flagelo de espermátide eupirene em processo de alongamento. **35.000 x**.

Fig. 74 - Figura mielínica (FM) formada por membranas enroladas que estão sendo descartadas (seta) do citoplasma de um flagelo de espermátide eupirene. DM - derivado mitocondrial; AX - axonema flagelar. **35.000 x**.

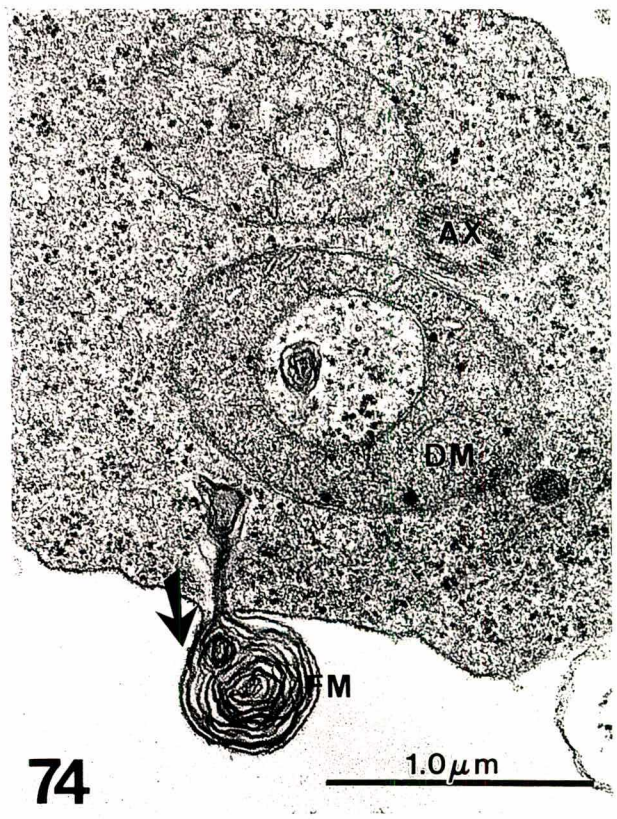
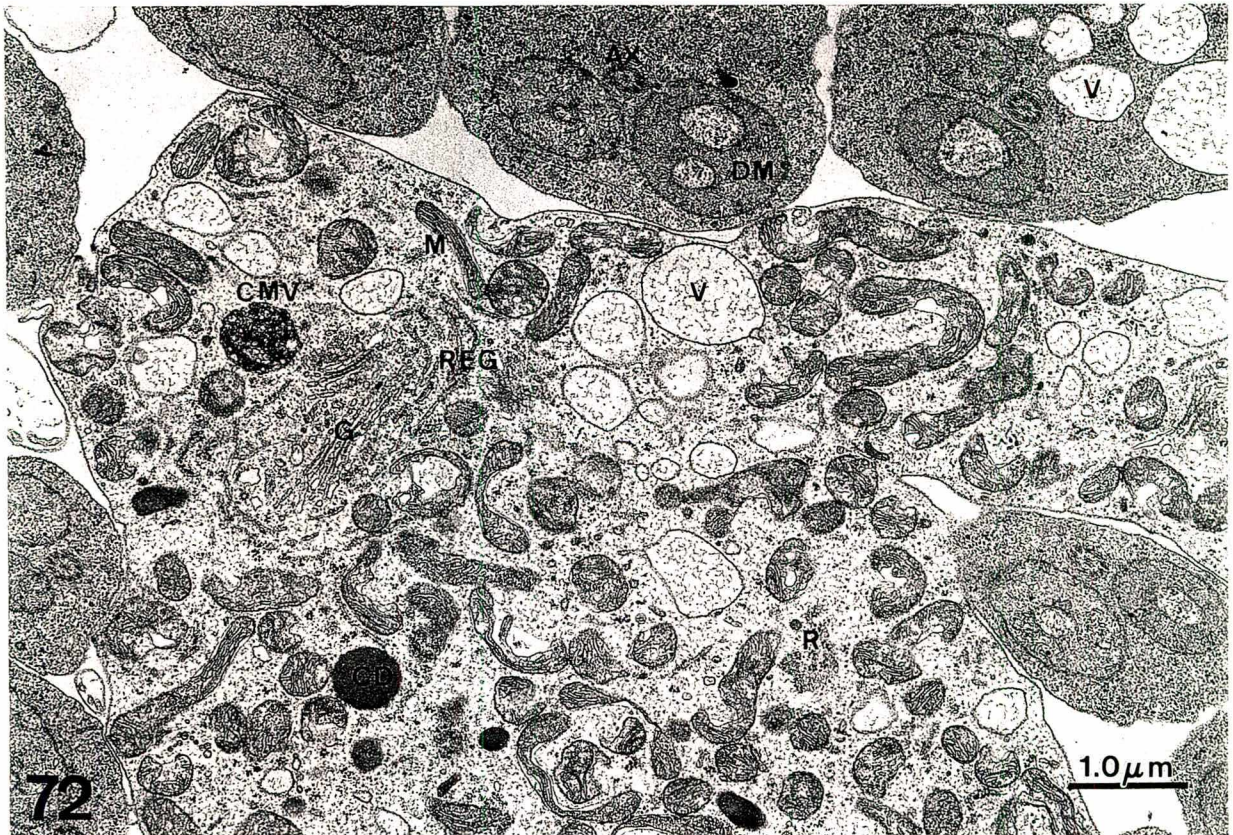


Fig. 75 - Neste estágio, os axonemas (AX) ainda apresentam padrão de organização microtubular do tipo "9 + 2". Todos os microtúbulos têm o lúmen elétron-transparente. Cisternas lisas (pontas de setas) envolvem parcialmente o axonema. Os derivados mitocondriais (DM) apresentam formas e tamanhos desiguais e a matriz do derivado mais longo apresenta maior elétron-densidade. Próximo do derivado mitocondrial maior da espermatíde inferior, observa-se um dictiosoma do complexo de Golgi (G). O citoplasma é rico em ribosomas (R) livres. As setas indicam a cobertura celular da membrana plasmática. **50.000 x.**

Fig. 76 - No axonema, as pequenas projeções lineares (pontas de setas maiores) ligadas aos sub-túbulos B das duplas periféricas representam os túbulos acessórios em formação. As pontas de setas menores indicam os braços de dineína dos sub-túbulos A. As setas indicam as cisternas lisas que envolvem quase totalmente o axonema. A matriz dos dois derivados mitocondriais (DM) tem a mesma densidade. G - sáculos golgianos. **105.000x.**

Fig. 77 - Regiões flagelares sub-terminais. Observam-se três espermatídes ainda ligadas por meio de pontes citoplasmáticas (P). Estas regiões são rodeadas por anéis densos (setas). O citoplasma das pontes não apresenta diferenciação notória. O axonema (AX) ainda é do tipo "9 + 2" e, próximo a ele, encontra-se apenas um dos dois derivados mitocondriais (DM). Membranas formando figuras mielínicas (FM) são freqüentes no citoplasma dos flagelos dessas regiões sub-terminais. No citoplasma da célula central, observa-se uma invaginação citoplasmática de uma célula cística vizinha (asterisco). As pontas de setas indicam junções septadas entre as membranas plasmáticas da espermatíde e da célula cística. R - ribosomas. **28.000 x.**

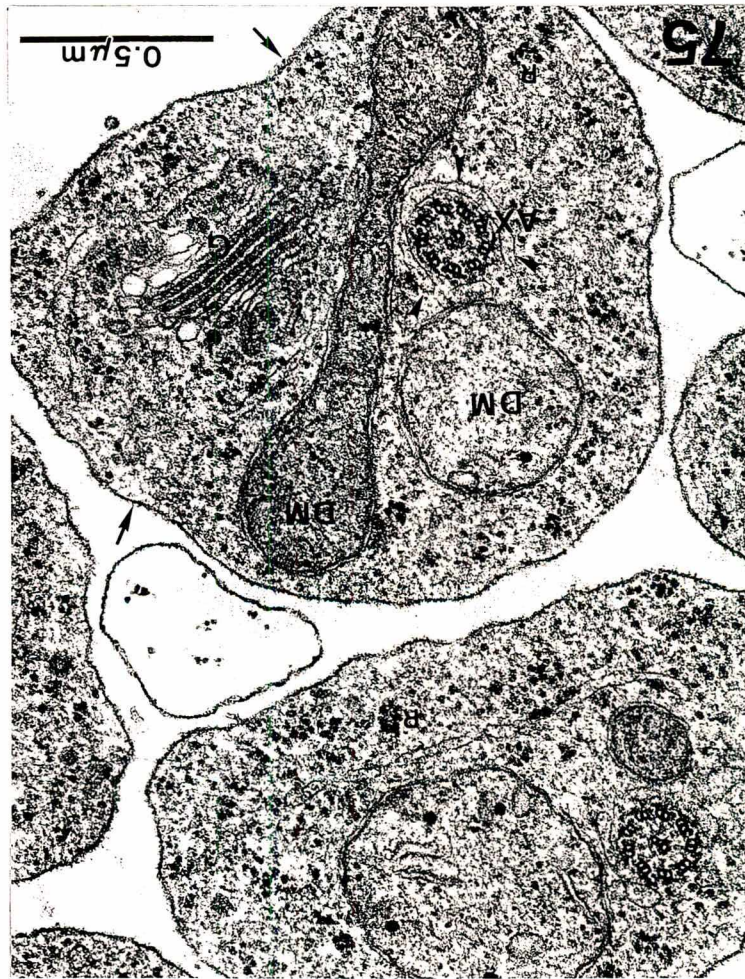
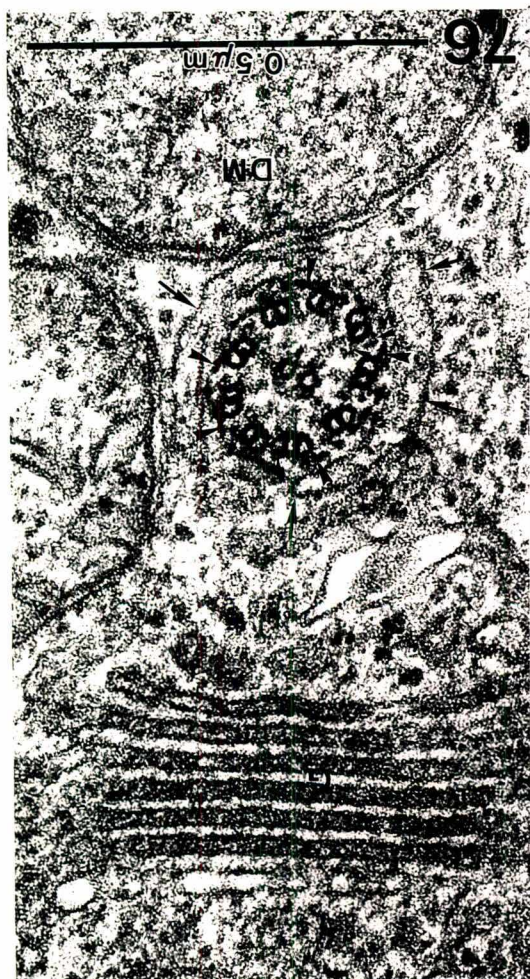
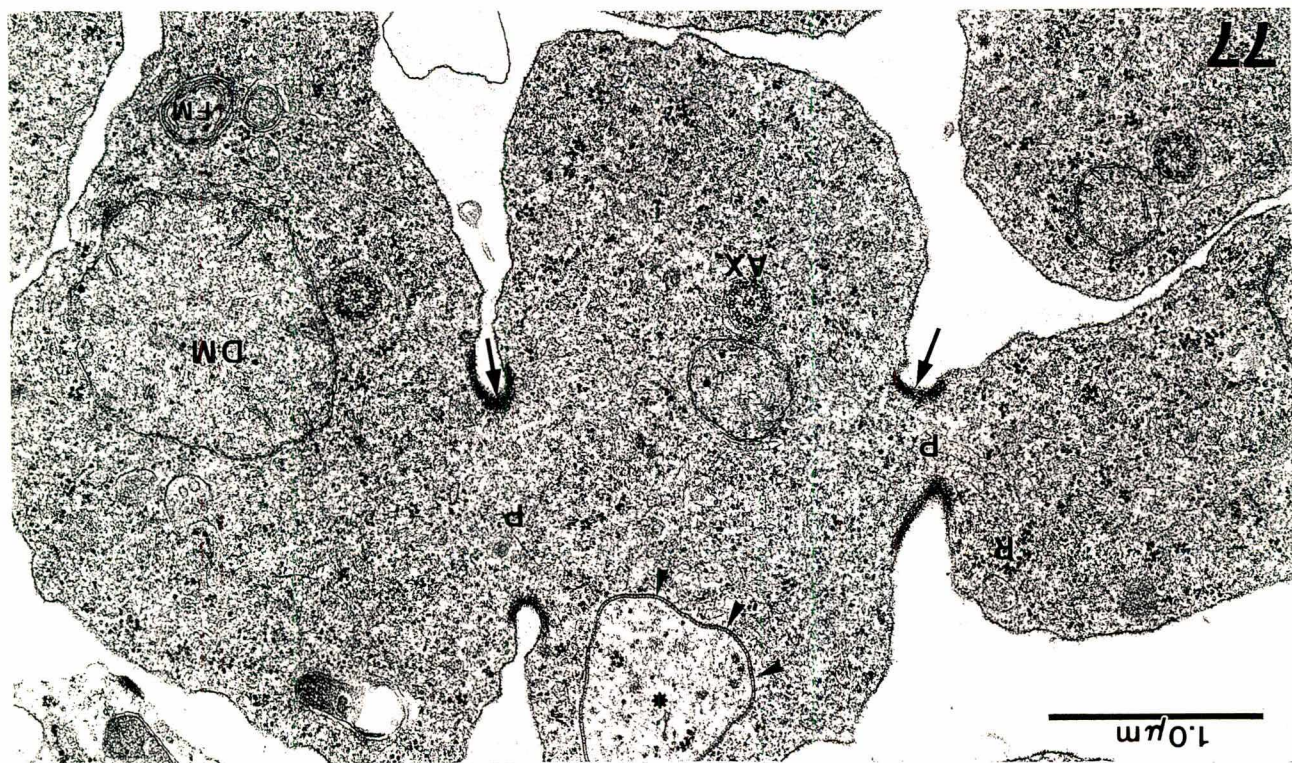


Fig. 78 - Secção transversal de flagelo de espermátide eupirene em estágio mais avançado que os da prancha anterior. O axonema já apresenta o padrão de organização tubular do tipo "9 + 9 + 2", com a coroa periférica de microtúbulos acessórios ainda vazados. Ao redor do axonema, notam-se cisternas (pontas de setas maiores) e vesículas (V) lisas. Vê-se ainda dois derivados mitocondriais (DM) desiguais no tamanho e com cristas vestigiais. No citoplasma, notam-se ribosomas (R) livres e um corpo multivesiculado (CMV). A face externa da membrana plasmática mostra uma fina cobertura (pontas de setas menores) e um pequeno apêndice reticular (AR). 60.000 x.

Fig. 79 - Estágio subsequente do desenvolvimento do axonema (AX). Os túbulos acessórios (pontas duplas de setas) apresentam baixa elétrondensidade luminal e estão ainda ligados aos sub-túbulos B. Os sub-túbulos A mostram elétrondensidade semelhante no seu lúmen e apresentam dois braços de dineína. Cisternas lisas (pontas de setas maiores) ocorrem ao lado do axonema, dos dois derivados mitocondriais (DM) e do complexo de Golgi (G). Fileiras de microtúbulos citoplasmáticos são indicadas por meio de pontas de setas menores. 54.000 x.

Fig. 80 - Neste estágio mais avançado, nota-se que os derivados mitocondriais (DM) e o axonema (AX) estão parcialmente envoltos por cisternas lisas (setas) e microtúbulos arranjados em uma única fileira (pontas duplas de setas menores). Os microtúbulos acessórios (pontas duplas de setas maiores) mostram-se desligados dos pares periféricos. Junto ao apêndice reticular (AR), cuja posição é oposta ao axonema, observa-se um botão elétrondenso (seta). 90.000 x.

Fig. 81 - Neste estágio mais avançado de transformação do flagelo, a espermátide eupirene já apresenta redução do volume citoplasmático. No axonema, os microtúbulos acessórios (pontas triplas de setas) apresentam lúmen bem elétrondenso. Principalmente no derivado mitocondrial maior (DM), nota-se um espessamento parcial da camada cortical (pontas de setas menores) e, ao lado desta, observa-se uma fileira de microtúbulos citoplasmáticos (pontas duplas de setas). No estreito espaço compreendido entre as áreas aplanadas dos dois derivados justapostos, observa-se uma camada densa e fina (seta branca). Um envoltório membranososo liso (pontas de setas maiores) contorna completamente o axonema e o derivado mitocondrial menor, envolvendo apenas parcialmente o maior. AR - apêndice reticular extra-celular. 63.000 x.

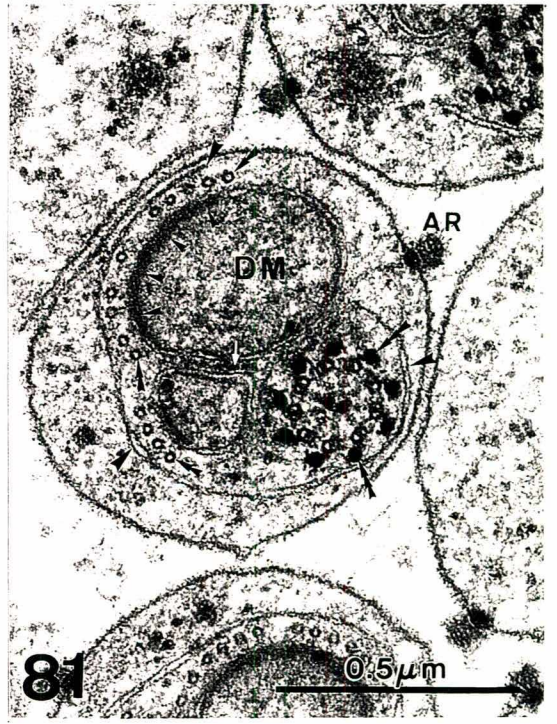
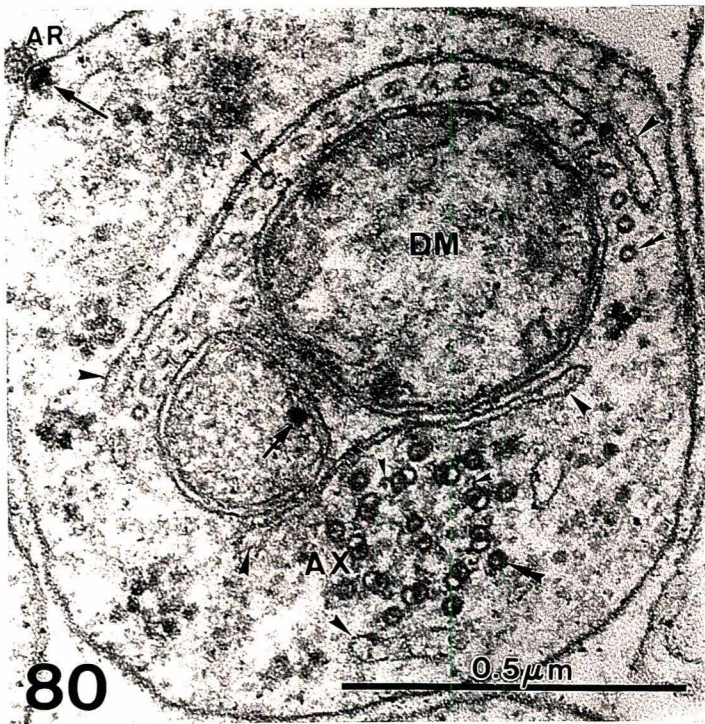
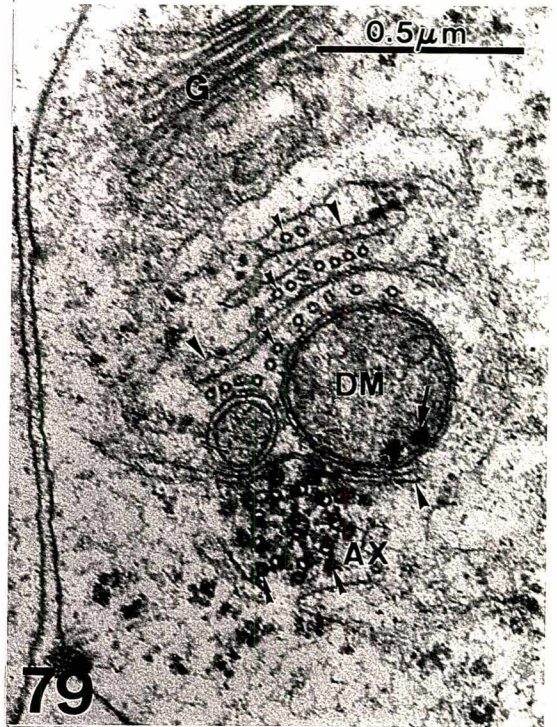
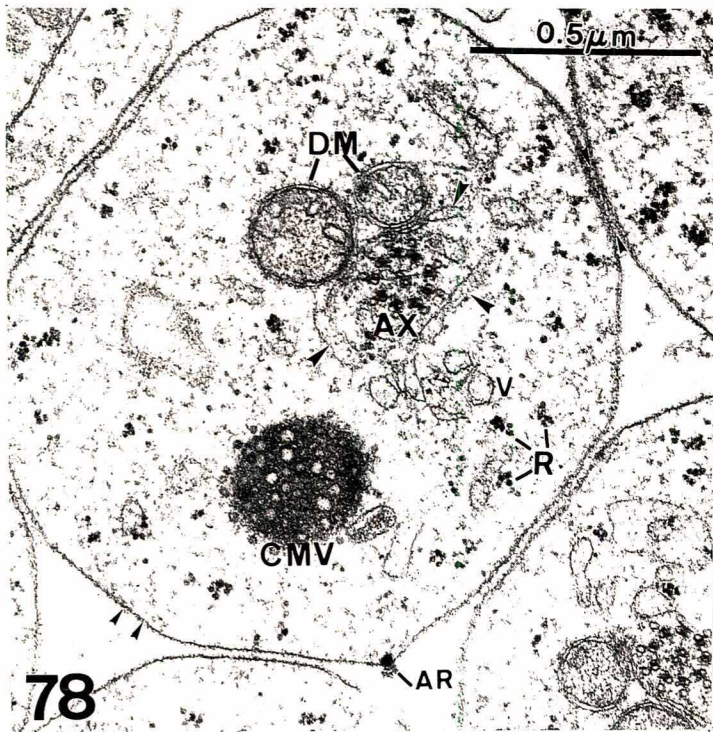


Fig. 82 - Corte transversal de um flagelo já com o volume reduzido. O citoplasma apresenta ainda vários grupos de ribosomas livres (R). O axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM) estão individualmente envoltos por um envelope membranoso (setas), isolados do resto do citoplasma. No axonema (ponta de seta), destacam-se os túbulos acessórios (ponta dupla de seta maior) de conteúdo bem elétron-denso. O derivado maior possui uma camada cortical assimétrica e espessa, adjacente a uma fileira de microtúbulos citoplasmáticos. A região do derivado maior próxima ao axonema mostra uma fileira de esférulas elétron-densas (ponta dupla de seta menor), que não são observadas no derivado menor (DM*). AR - apêndice reticular. 47.000 x.

Fig. 83 - Regiões sub-terminais de flagelos de espermatídes em fase mais avançada, com citoplasma bem reduzido. Destacam-se o axonema (AX) do tipo "9 + 9 + 2" e o derivado mitocondrial maior (DM). O axonema encontra-se ainda envolto por um envelope membranoso (seta); os microtúbulos acessórios mostram conteúdo bem elétron-denso (ponta maior de seta dupla). O derivado maior apresenta uma camada cortical bem densa (pontas de setas menores) e uma medular menos densa. Presença de alguns microtúbulos citoplasmáticos (ponta de seta maior) ladeando parcialmente o derivado maior. O derivado menor é apenas vestigial (*). O apêndice reticular (AR) situa-se numa depressão da membrana plasmática, ligado por meio de pequenos septos (ponta menor de seta dupla). 72.000 x.

Fig. 84 - Corte transversal de uma área de um cisto eupirene contendo flagelos de espermatídes em fase terminal de maturação. Em cada flagelo, observam-se dois derivados mitocondriais (DM) de tamanhos desiguais e justapostos ao axonema (AX) do tipo "9 + 9 + 2". A camada cortical do derivado maior adjacente ao menor, mostra condensações em forma de faixa (setas brancas duplas) ou esférulas densas (setas brancas simples). Estas esférulas irão formar, no espermatozóide eupirene, um eixo cilíndrico denso nesta região. No axonema completo, destacam-se os microtúbulos acessórios (pontas duplas de setas). Na região lateral entre o axonema e os derivados mitocondriais, observam-se duas cisternas lisas (setas) associadas a pequenas áreas elétron-densas (asterisco). O apêndice reticular (AR) continua presente. Glicocálix evidente (pontas de setas). cc - citoplasma da célula cística. 63.000 x.

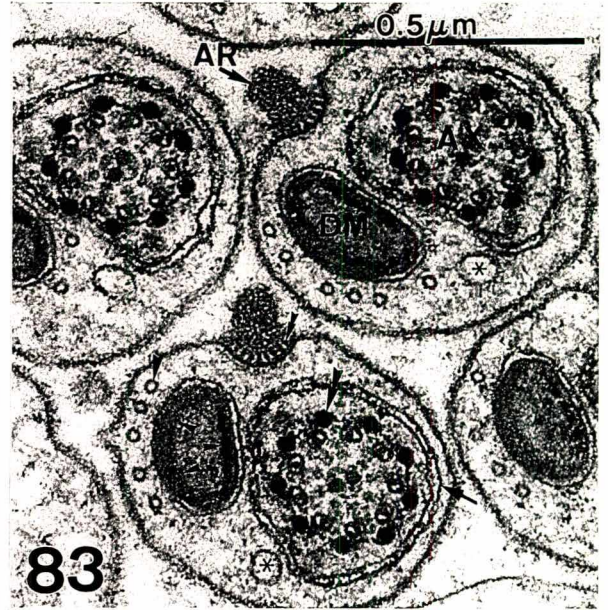
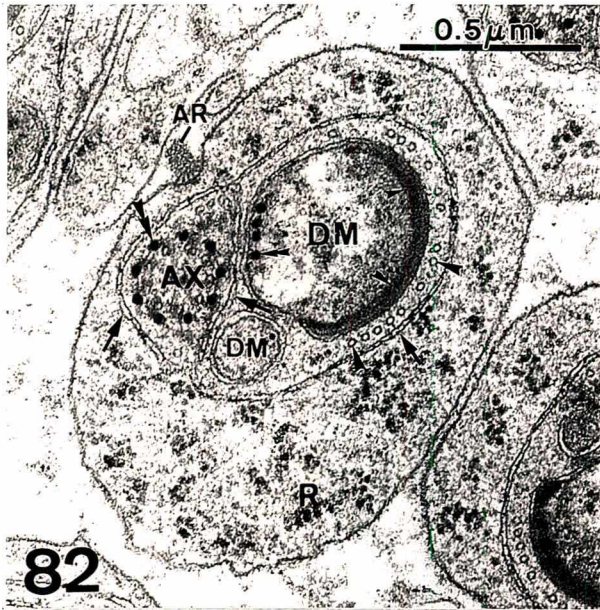


Fig. 85 - Criofratura em etanol de espermátides eupirenes em fase final de maturação. Nos flagelos, destacam-se derivados mitocondriais (DM) criofraturados longitudinalmente. As setas maiores indicam dois derivados mitocondriais da mesma célula, com tamanho desigual. A seta menor indica um septo e o asterisco, a região medular do derivado. N - núcleo da espermátide. MEV - 6.000 x.

Fig. 86 - Secção longitudinal de flagelos de espermátides quase maduras. As cristas (setas) da região cortical do derivado mitocondrial maior (DM) formam um ângulo de 45° em relação ao eixo maior do derivado com espaçamento de 36 nm (d) . No axonema (AX), destacam-se os microtúbulos acessórios mais densos (pontas de setas). 28.000 x.

Fig. 87 - Secção transversal de regiões posteriores da peça principal de flagelos eupirenes. Nesta altura de corte, somente é observado o derivado mitocondrial maior (DM). Na sua região cortical, nota-se a presença de um eixo denso (setas brancas pequenas) próximo do microtúbulo acessório (ponta dupla de seta) correspondente ao par periférico nº8. No axonema (AX) completo, destacam-se os microtúbulos acessórios (pontas duplas de setas) densos e de maior calibre. As setas pretas indicam duas pequenas vesículas entre o axonema e o derivado mitocondrial. AR - apêndice reticular ligado à membrana plasmática por meio de septos (pontas de setas); AL - apêndices laciniados. 120.000 x.

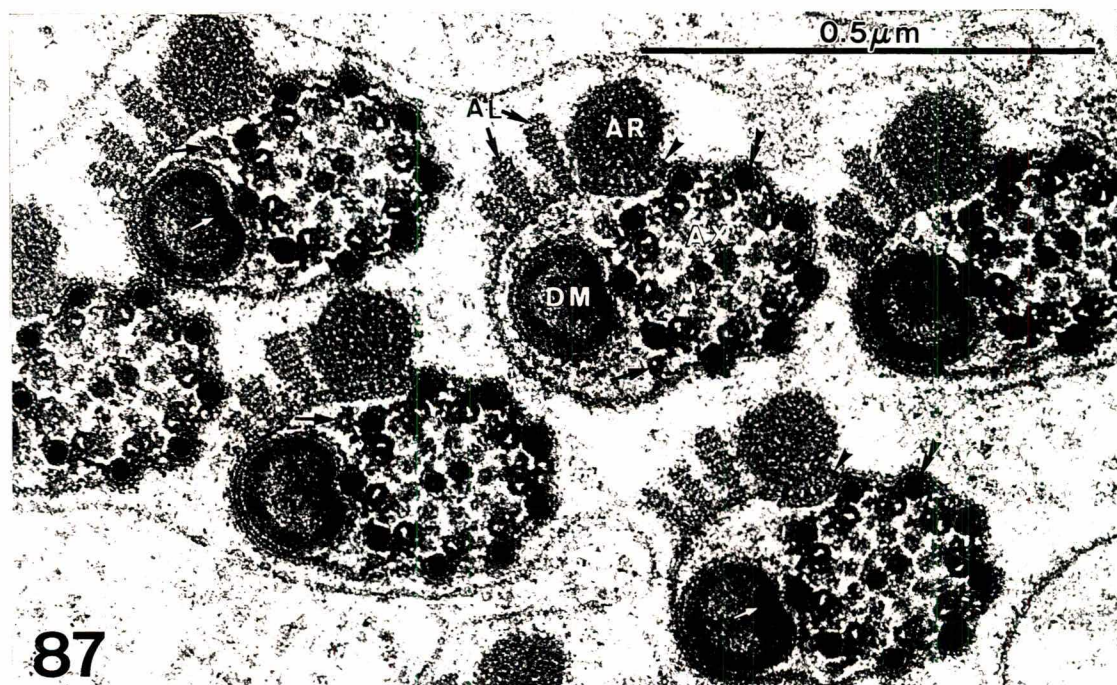
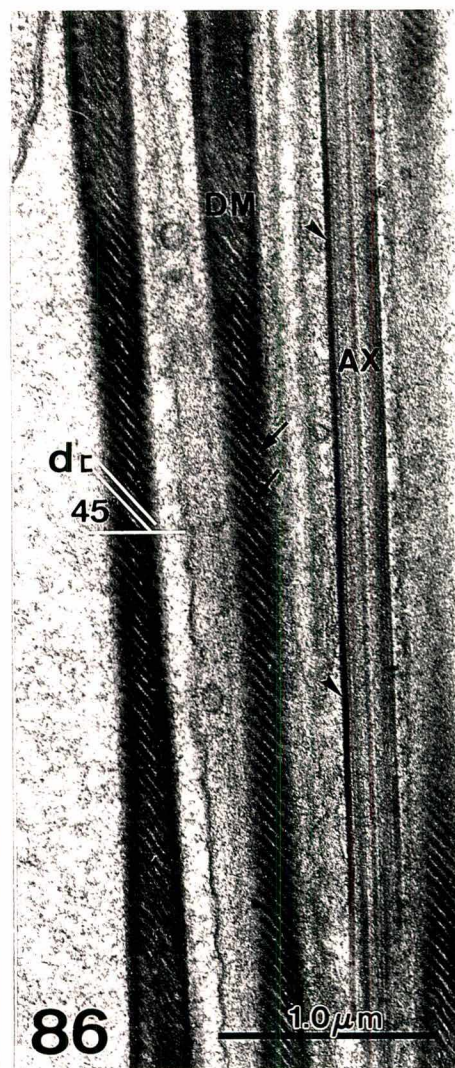
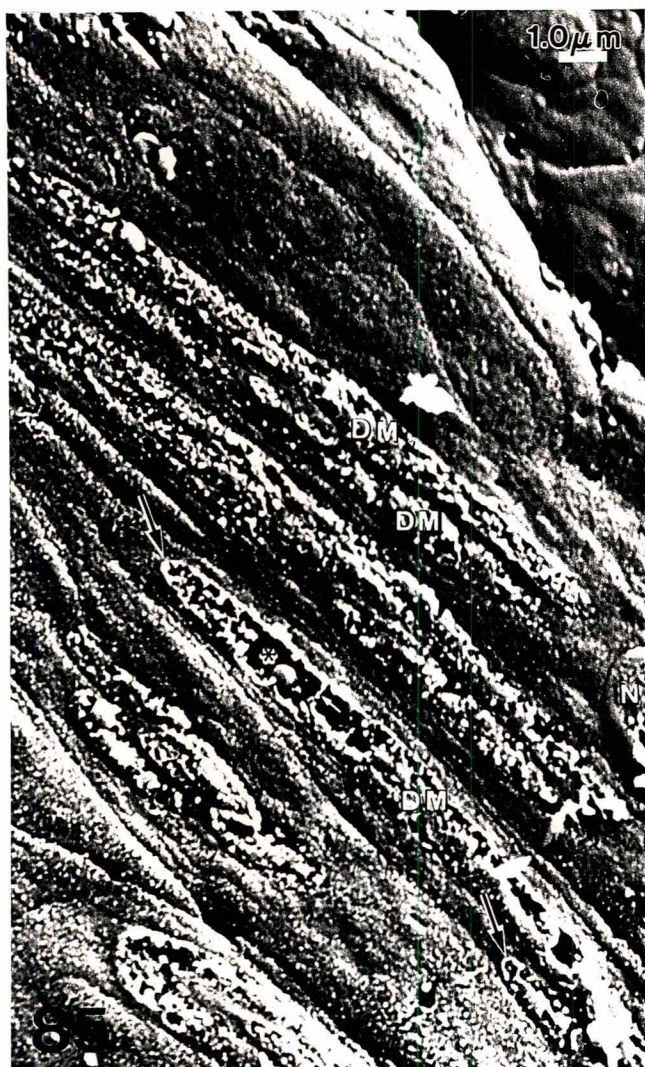


Fig. 88 - Secção transversal de flagelos de espermatozóides eupirenes ao nível de sua região mediana. Nota-se a regularidade na disposição espacial dos flagelos orientados em uma única direção e ordenados em fileiras paralelas justapostas entre si. Em cada flagelo, nesta altura de corte, observa-se somente o derivado mitocondrial maior (DM), cujo "eixo cortical" apresenta-se elétron-transparente (ponta de seta maior). No axonema (AX), é possível observar a sub-estrutura da parede dos microtúbulos acessórios (pontas duplas de setas) delimitando o lúmen "vazio". Notam-se, também, duas pontes densas (setas menores) ligando o axonema à membrana flagelar (ponta simples de setas). Esta se apresenta em contraste "negativo" (pontas simples de setas) assim como as membranas do envelope do derivado (seta maior). O apêndice reticular (AR) está deslocado de sua posição usual. Fixação de acordo com Dallai & Afzelius (1990). 110.000 x.

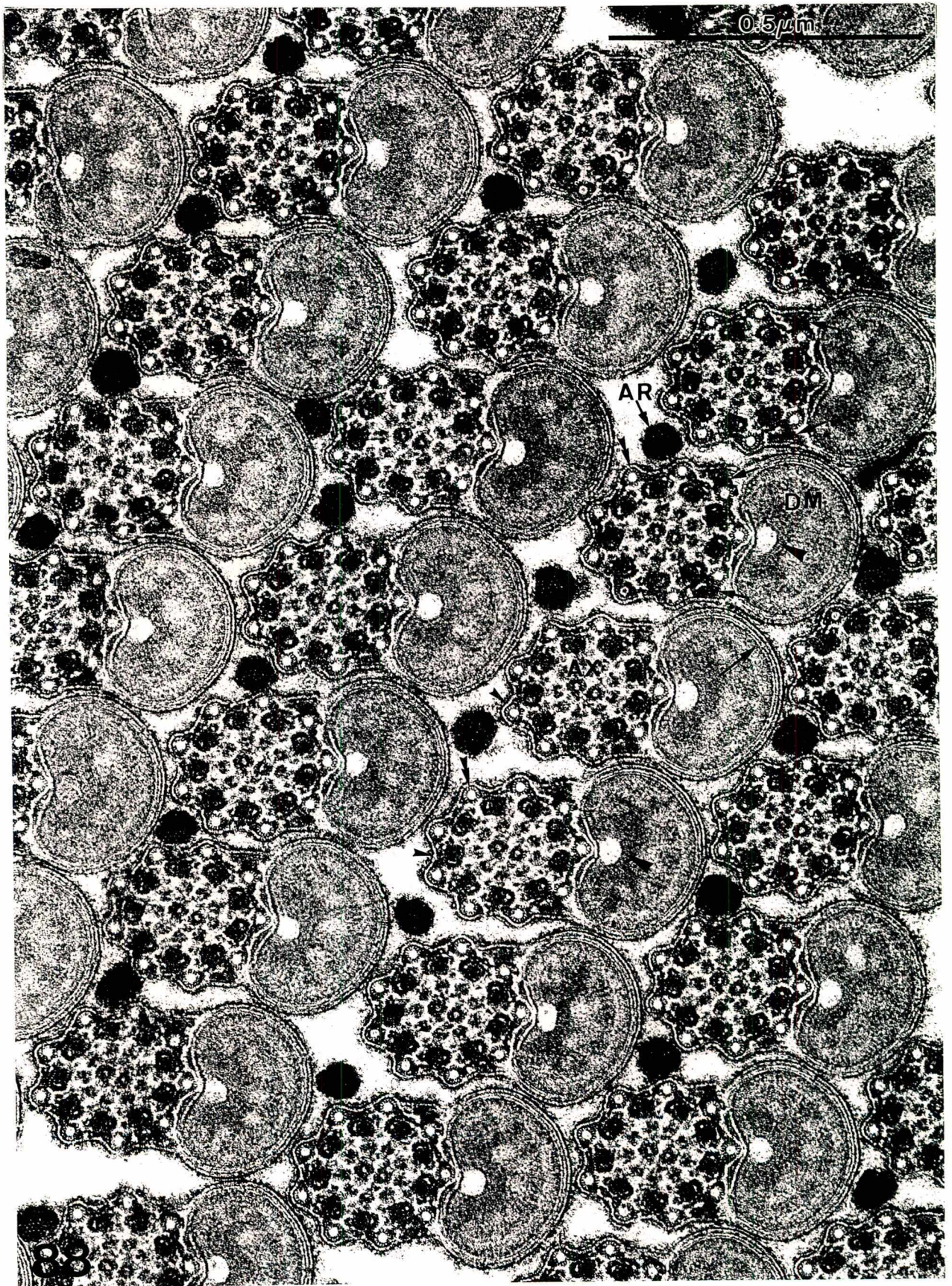
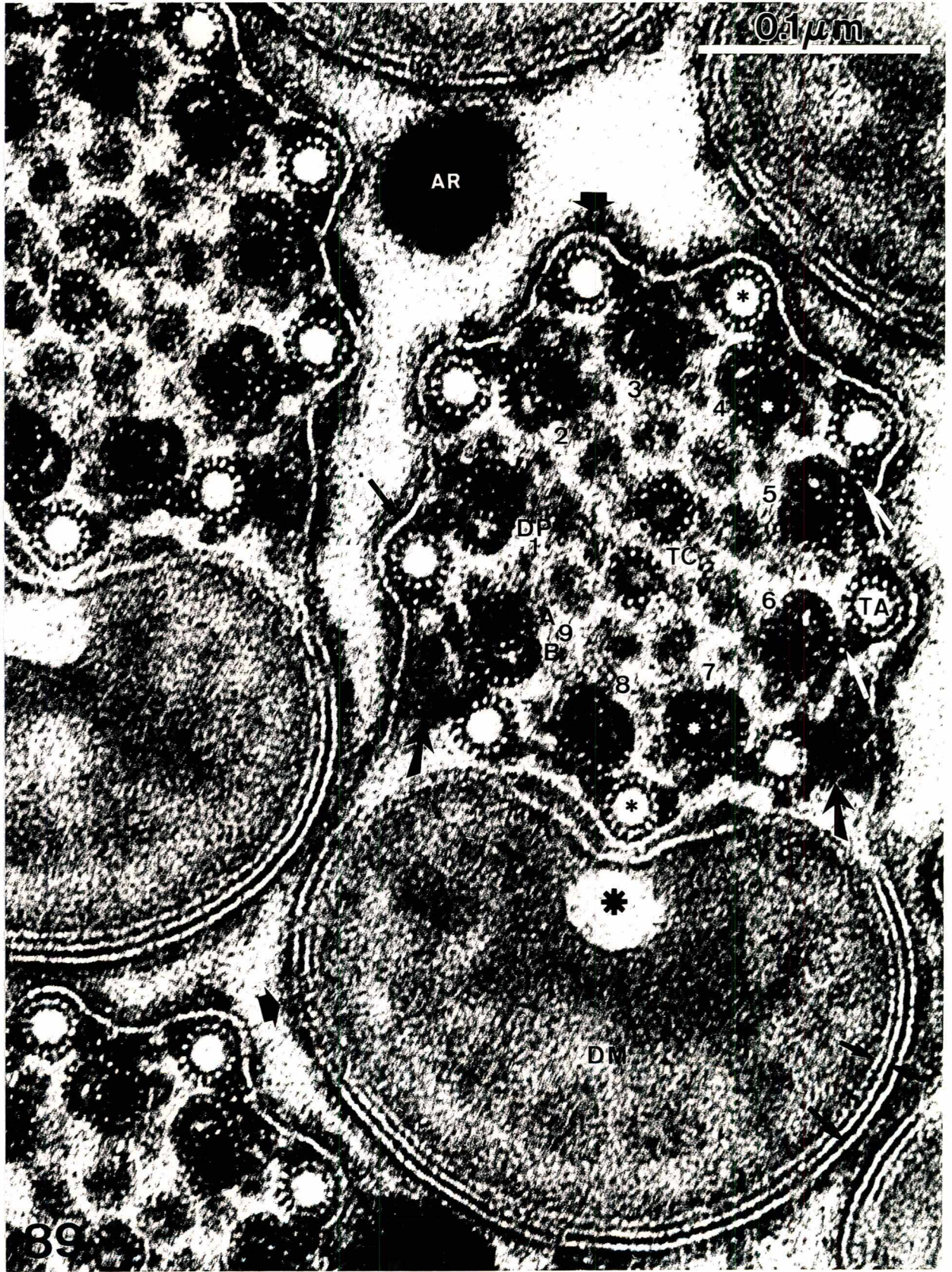


Fig. 89 - Vista ampliada de um dos flagelos da figura anterior. No axonema, observam-se 16 protofilamentos na parede dos túbulos acessórios (TA); 13 e 10-11 protofilamentos na parede dos subtúbulos A e B dos pares periféricos, respectivamente, e 13 na dos dois túbulos centrais. O lúmen dos túbulos acessórios apresenta-se elétron-transparente, ao contrário dos lúmenes dos subtúbulos A e B e dos túbulos centrais, que são elétron-densos. As pontes de ligação entre os túbulos acessórios apresentam uma área mais fina e uma mais espessa (setas brancas) próxima ao sub-túbulo B. As pontes densas e largas (setas mais largas) ligam os microtúbulos acessórios próximos aos pares periféricos nº 7 e nº 9 com a membrana flagelar. No derivado mitocondrial maior (DM), destacam-se o eixo cortical (asterisco maior) elétron-transparente nesta fixação, e as membranas do derivado coradas "negativamente" (setas grossas e curtas). As setas finas indicam duas áreas estreitas e densas próximas ao túbulo acessório nº 8 e compreendidas entre as membranas do envelope do derivado mitocondrial. Glicocálix (seta larga e curta) bem desenvolvido na periferia da membrana flagelar (setas pretas) em contraste "negativo". AR - apêndice reticular. Fixação de Dallai & Afzelius (1990). 396.000 x.

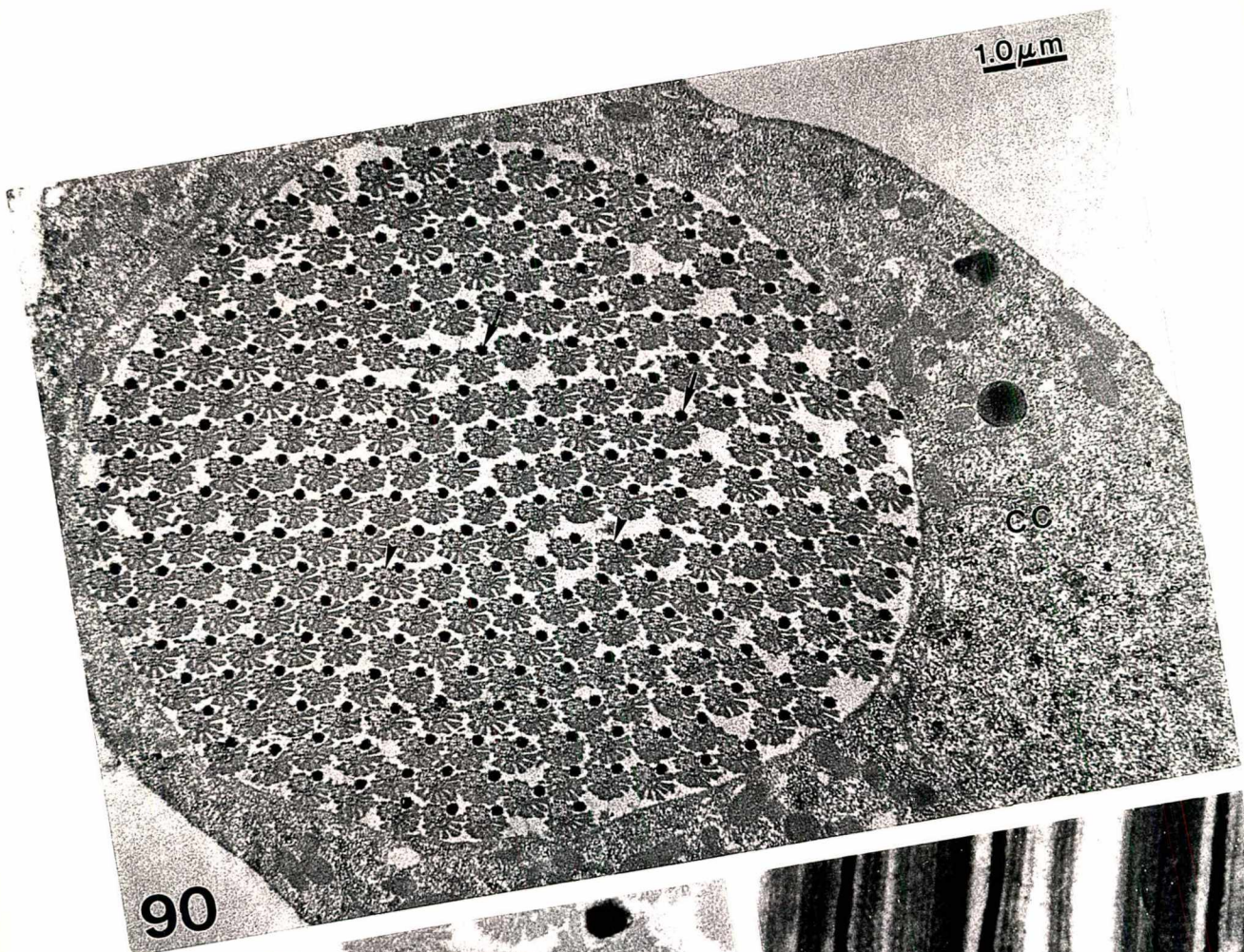


As figuras 90 a 92 indicam espermatozóides eupirenes fixados de acordo com o método de Bloom & Aghajanian (1968) modificado.

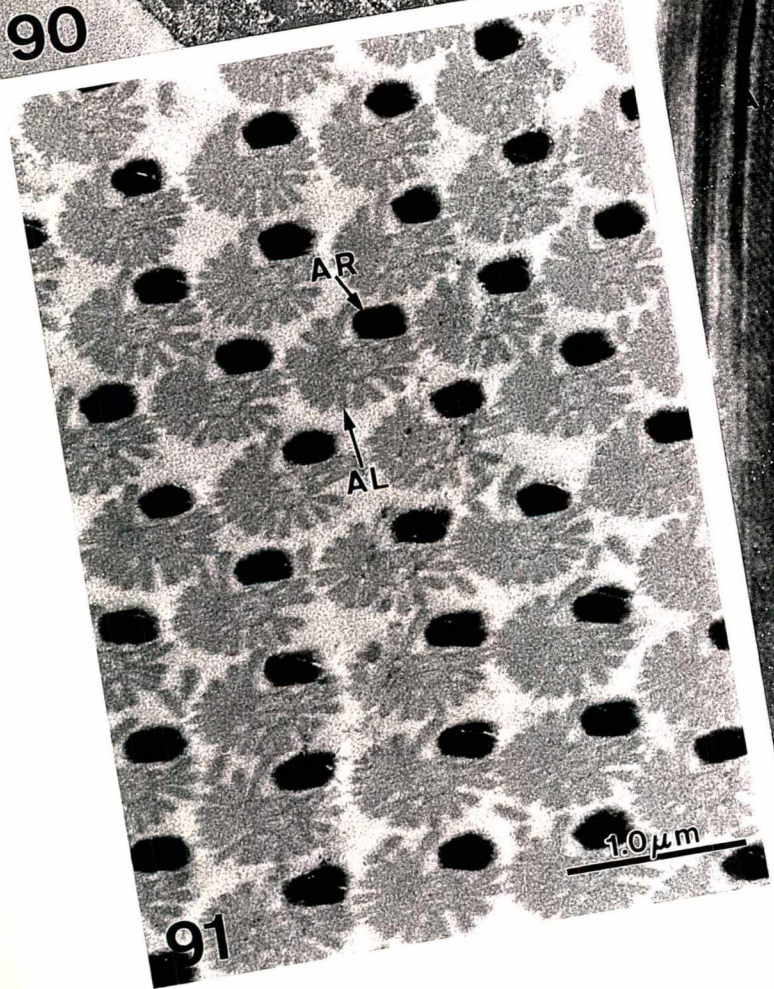
Fig. 90 - Corte transversal de um cisto eupirene contendo 256 flagelos. Nota-se forte reação positiva ao E-PTA nos apêndices reticulares (setas) e uma discreta reação nos microtúbulos acessórios (pontas de setas) do axonemas. CC - célula cística. 11.000 x.

Fig. 91 - Grupo de flagelos em secção transversal ao nível de suas regiões anteriores. Em destaque, os apêndices reticulares (AR) que apresentam forte reação positiva ao E-PTA, ao contrário dos laciniados (AL). 23.000 x.

Fig. 92 - Flagelos seccionados longitudinalmente. Apêndices reticulares (AR) apresentando reação positiva ao E-PTA. AX - axonema; DM - derivado mitocondrial. 24.000 x.



90



91



92

Fig. 93 - Porção criofraturada de testículo de imago jovem. Observam-se vários cistos contendo, na maioria, flagelos de espermatozóides eupirenes (EUP). As regiões mais anteriores dos flagelos eupirenes apresentam-se bem compactadas. A seta larga, à esquerda, indica o feixe eupirene ampliado na figura 94. Vizinho a este feixe, observam-se espermatozóides presumivelmente apirenes (AP). Traquéias de vários calibres (círculo e setas finas) são freqüentemente observadas nos septos que separam os folículos testiculares. **MEV - 1.600 x.**

Fig. 94 - Ampliação do cisto de espermatozóides eupirenes indicado pela seta vazia e larga na figura anterior. Em alguns flagelos, observam-se com certa nitidez os axonemas (setas) e os derivados mitocondriais (ponta dupla de seta). As pontas de setas maiores indicam saliências correspondentes aos microtúbulos axonemáticos da coroa mais externa. Na superfície dos espermatozóides, observam-se, também, finas saliências longitudinais (pontas de setas), que correspondem, presumivelmente, aos apêndices laciniados extra-celulares. **MEV - 11.000 x.**

Fig. 95 - Um cisto eupirene criofraturado contendo flagelos bem coesos e paralelos, dispostos em uma configuração hexagonal típica destes cistos nas regiões anteriores dos flagelos. Os axonemas estão evidentes (setas). **MEV - 13.000 x.**

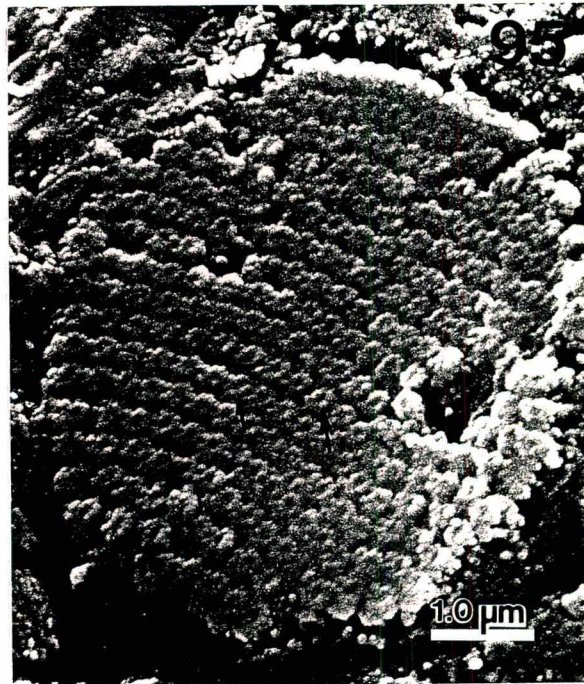
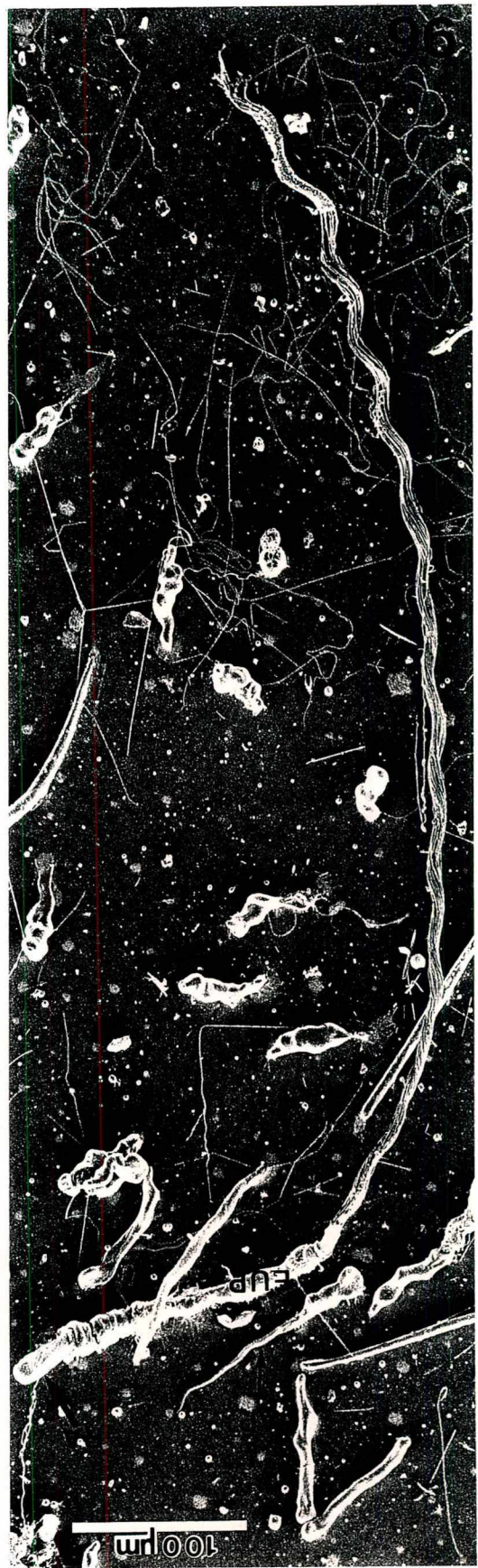
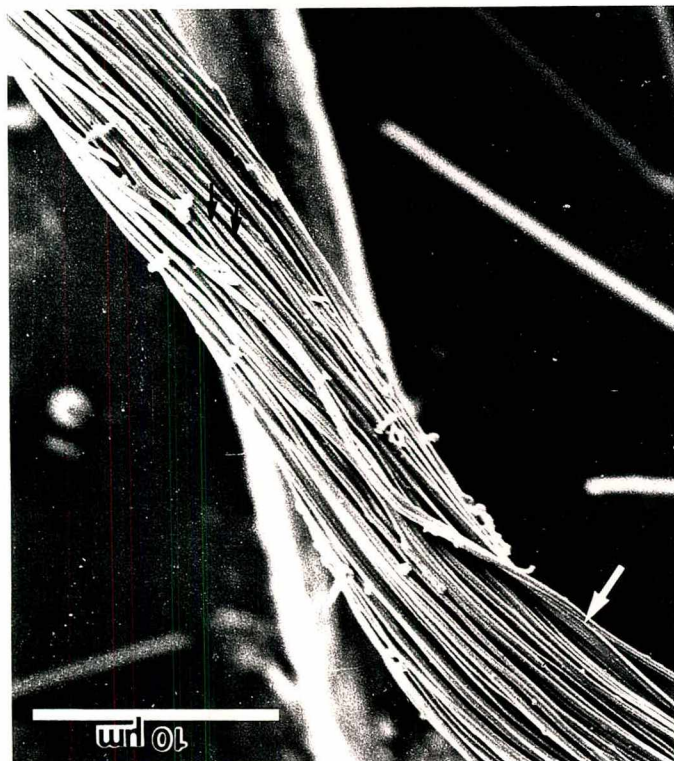


Fig. 96 - Imagem de um longo feixe de espermatozoides eupirenes (EUP) e de pequenos feixes apirenes (AP). A região anterior (RA) do feixe eupirene corresponde ao conjunto das cabeças dos espermatozoides ainda recobertas por fragmentos das células císticas (CC). Os flagelos (F) da longa cauda encontram-se bem unidos entre si, apresentando uma disposição helicoidal em toda sua extensão, com exceção da região mais posterior (RT) e mais afilada. Diversos feixes apirenes (AP) bem mais curtos e espermatozoides (ESP) apirenes isolados são visualizados também. **MEV - 250 x.**

Fig. 97 - Ampliação da região "F" do feixe eupirene, na qual se evidencia a torção helicoidal do feixe, bem como a íntima justaposição dos espermatozoides. A seta branca mostra uma região dissociada de um espermatozoide e as setas pretas indicam uma fina estriação na periferia dos espermatozoides, provavelmente, correspondente aos apêndices laciniados superficiais. **MEV - 3.200 x.**

Fig. 98 - Ampliação da região terminal do mesmo feixe, mostrando os espermatozoides finalizando em diferentes alturas (setas brancas pequenas) à medida que a cauda vai se afilando (seta branca maior). Resquícios das células císticas (seta branca larga) envolvem parcialmente o feixe terminal. **MEV - 3.200 x.**



4. ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRENES NA VESÍCULA SEMINAL E NO DUCTO EJACULADOR DUPLO

Tanto na vesícula seminal (Figs. 99 e 100), quanto no ducto ejaculador duplo (Figs. 111 - 114), os espermatozóides eupirenes mantêm-se bem unidos em longos feixes helicoidais, enquanto que os apirenes encontram-se dispersos entre esses feixes e ao redor dos mesmos, concentrando-se mais junto à parede interna dos ductos espermáticos. Em imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas a partir de criofatura em etanol, observa-se, também, que os feixes eupirenes se localizam na região central da vesícula seminal, circundados por grandes massas de espermatozóides apirenes (Figs. 99 e 100). Às vezes, o lúmen da vesícula e do duplex mostra-se praticamente ocupados pelos feixes eupirenes, restringindo o espaço ocupado pelos espermatozóides apirenes livres a uma estreita faixa periférica (Figs. 106 e 111). Em outras imagens de criofatura ao nível da região próxima à desembocadura do ducto deferente no duplex, pode-se notar somente a presença de um tufo de espermatozóides apirenes ocupando o centro do ducto ejaculador duplo (Fig. 109). Tanto na vesícula quanto no duplex, corpos densos de vários tamanhos e formas (desde esférulas a grandes massas densas) são freqüentemente observados entre os feixes eupirenes e entre os espermatozóides apirenes (Figs. 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108 e 110). Associada aos corpos densos, há uma matriz extracelular finamente granular, que forma uma rede ao redor dos feixes eupirenes e entre os espermatozóides apirenes (Figs. 101, 103, 104, 105, 115 e 116). Os feixes de flagelos eupirenes localizados no duplex, por sua vez, são mantidos unidos por uma matriz extracelular mais densa (Figs. 113, 114, 115 e 116). As cabeças dos espermatozóides eupirenes, no duplex, além de manter sua orientação espacial nos feixes, como nos flagelos, permanecem unidas entre si por este tipo de matriz, que se espraia de modo mais ou menos uniforme entre as células espermáticas (Figs. 114 - 117).

Secções transversais de flagelos apirenes localizados na vesícula seminal mostram que cada um deles está envolto por capas estriadas concêntricas adjacentes à membrana plasmática, cujo número de capas varia com o nível de corte, sendo maior nas regiões terminais (Figs. 101, 104 e 105). Cortes longitudinais e tangenciais evidenciam a estriação transversal das capas (Fig. 103). Nos cortes tangenciais e transversais de regiões medianas da peça principal dos flagelos, nota-se, também, a presença de projeções filiformes na periferia dos flagelos apirenes (Figs. 103 e 104). Imagens de criofatura para M.E.V. de flagelos apirenes também mostram a presença dessas capas estriadas (Fig. 102). Quanto à ultra-estrutura do filamento axial e dos derivados mitocondriais dos flagelos apirenes na vesícula seminal, não se observa nenhuma diferença notável em relação aos flagelos apirenes intratesticulares, a não ser pela presença de dois pequenos “corpos acessórios” ligados às regiões mais afiladas dos derivados mitocondriais por meio de pontes finas, em corte transversal (Fig. 104). Às vezes, estes “corpos” parecem estar ligados também ao axonema, posicionando-se lateralmente entre este e os derivados mitocondriais (Fig. 104).

Em cortes transversais ao nível da cabeça (Figs. 115 a 117) dos espermatozoides eupirenes localizados no duplex, percebe-se a total ausência dos apêndices laciniados, porém há persistência do apêndice reticular, inserido em uma depressão da capa estriada por meio de um pedúnculo (Fig. 117). A subestrutura do apêndice reticular somente foi bem evidenciada com o uso de uma mistura fixadora á base de ácido tânico (Método IV). A maior parte do espaço interno limitado pela capa estriada, ao nível das cabeças, é ocupada por uma massa densa de aspecto granular, que se limita com o núcleo de posição excêntrica (Figs. 116 a 117). Em cortes transversais, obtidos do material fixado de acordo com métodos I e II, esta massa densa interna apresenta-se com aspecto mais ou menos uniforme (Fig. 115). Porém, com o uso do método de Dallai & Afzelius (1990), percebe-se que essa matriz densa mostra uma

subestrutura granular muito evidente, apresentando uma fileira contínua de grânulos regulares na sua periferia (Fig. 117). A membrana plasmática e o envelope nuclear intimamente justapostos mostram contraste "negativo", bem como as paredes aparentemente colapsadas do acrosoma tubular que flanqueia o núcleo ao longo de sua face plana (Fig. 117). Os flagelos eupirenes, em corte transversal (Fig. 118), também não mais apresentam a manta radial de apêndices na sua periferia. O apêndice reticular persiste, situado em uma depressão da capa estriada fina que recobre os flagelos (Fig. 118). A massa densa interna, igualmente, está presente nos flagelos, ocupando um espaço bem menor, se comparado com o volume da mesma nas cabeças dos espermatozóides. Em imagem de criofratura para M.E.V., pode-se perceber que cada flagelo do feixe eupirene se encontra individualizado por uma capa envoltória e separado dos demais por meio de uma substância inter-celular densa (Fig. 116).

FIGURAS

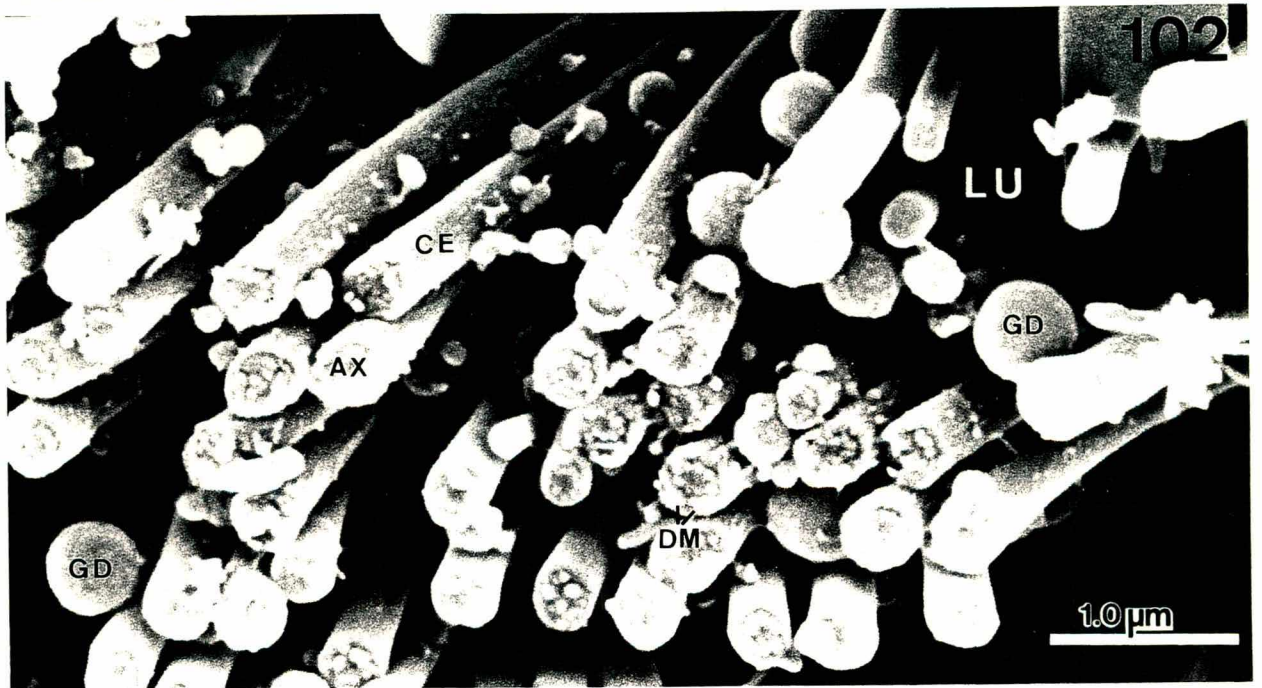
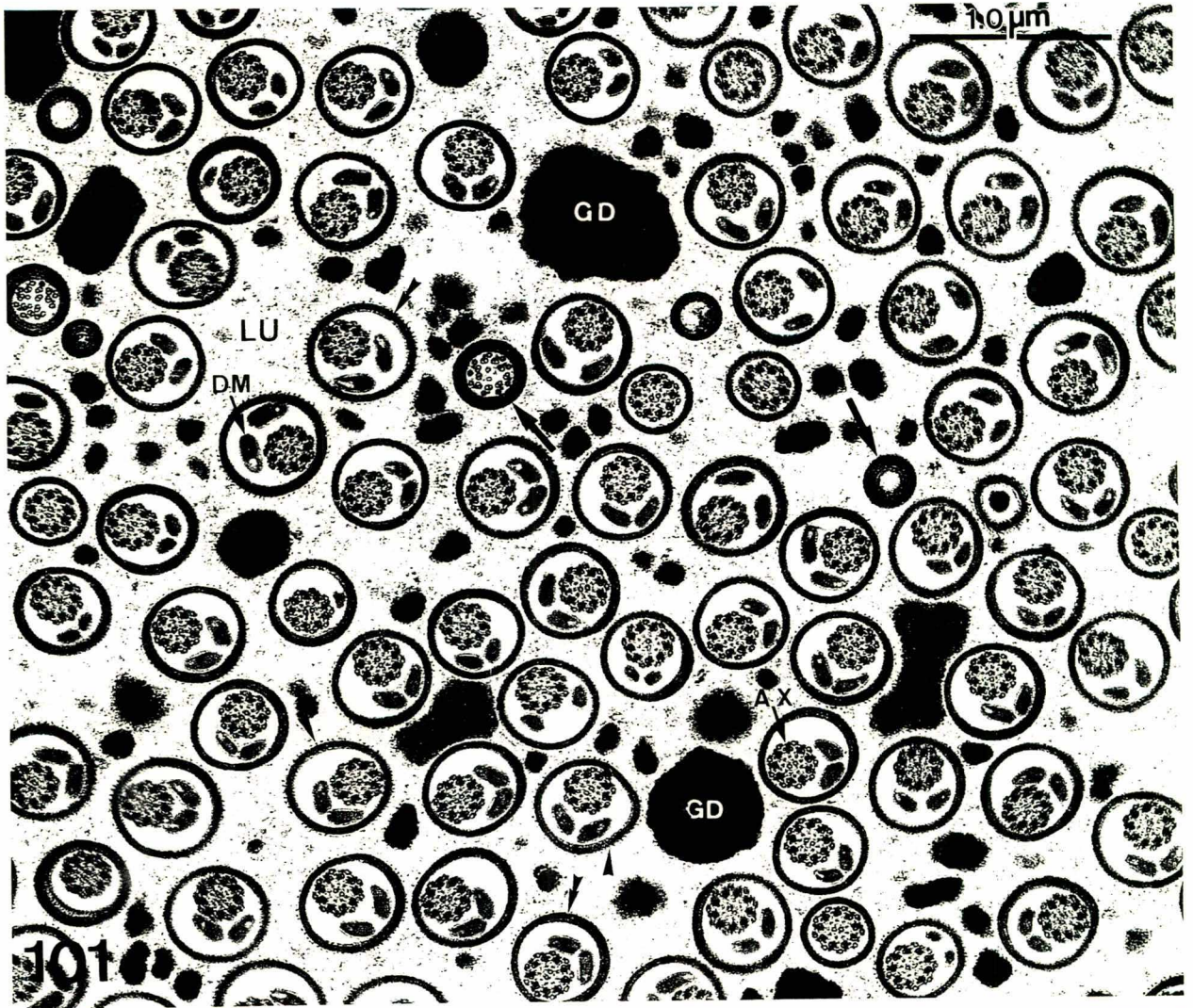
Fig. 99 - Vesícula seminal (VS) de imago submetida à criofatura em etanol. A região central do lúmen encontra-se praticamente preenchida por longos feixes compactos de espermatozóides eupirenes (EUP) em uma disposição helicoidal. Os espermatozóides apirenes (AP) encontram-se dispersos entre os feixes eupirenes, concentrando-se em maior número nas regiões mais periféricas da cavidade. As pontas de setas indicam os núcleos basais das células colunares do epitélio secretor da parede da vesícula seminal. **MEV - 350 x.**

Fig. 100 - Ampliação da área contida no retângulo da figura anterior. Grupo de feixes de espermatozóides eupirenes (EUP) criofaturados em diferentes alturas dos flagelos e envoltos por grande número de espermatozóides apirenes (AP), que também se encontram dispersos entre os feixes. **MEV - 1.400 x.**



Fig. 101- Cortes transversais de flagelos de espermatozóides apirenes dispersos no lúmen (LU) da vesícula seminal, juntamente com grânulos densos (GD) de diversas formas e tamanhos. A maioria das células foi seccionada ao nível das regiões medianas das peças principais dos flagelos. Observa-se, em cada flagelo, um axonema (AX) completo e dois derivados mitocondriais (DM). Ao redor de cada flagelo, nota-se uma capa estriada (pontas duplas de setas) formada por camadas concêntricas e dotada de pequenas projeções periféricas (pontas de setas). Observa-se, também, que o número de camadas das capas é maior nas regiões subterminais e terminais dos flagelos (setas). **28.000 x.**

Fig. 102 - Criofratura em etanol da vesícula seminal. Os espermatozóides apirenes encontram-se dispersos no lúmen (LU) da vesícula seminal, onde, também, são observados grânulos densos (GD) de diversos tamanhos. Nas células espermáticas, destacam-se as capas estriadas (CE) que envolvem os flagelos. AX - axonemas; DM - derivados mitocondriais. **MEV - 24.000 x.**



As figuras 103 a 105 indicam flagelos apirenes contidos na vesícula seminal e fixados de acordo com o método de Dallai & Afzelius (1990).

Fig. 103 - Flagelos de espermatozóides apirenes contidos no lúmen (LU) da vesícula seminal. Na célula 'A', em corte longitudinal, destacam-se o axonema (AX), um dos derivados mitocondriais (DM) e a capa estriada (CE), que mostra bem a sub-estrutura (pontas de setas). A estriação transversal da capa é, também, evidenciada (pontas de setas), em corte tangencial, nos flagelos 'B' e 'C'. Na periferia da capa estriada do flagelo 'B', observam-se filamentos longitudinais (setas) que parecem estar ligados com a rede de material fibrilar (MF) que preenche os espaços intercelulares. GD - grânulos densos. 60.000 x.

Fig. 104 - Corte transversal de flagelos de espermatozóides apirenes contidos na vesícula seminal. Neste corte de regiões medianas dos flagelos, as capas estriadas apresentam, geralmente, três camadas (setas) e na sua periferia, notam-se pequenas projeções filamentosas (pontas de setas). A sub-estrutura dos axonemas (AX) está bem evidente e, nos derivados mitocondriais (DM), notam-se regiões elétron-densas típicas (*). Próximo à porção acuminada de cada derivado, observa-se uma pequena vesícula (ponta dupla de seta). Entre os flagelos, há diversos grânulos densos (GD) interligados com a fina rede de material filamentososo (MF) do lúmen. 80.000 x.

Fig. 105 - Dois flagelos apirenes seccionados transversalmente ao nível das regiões subterminal e terminal. Nestas regiões, o número de camadas concêntricas das capas estriadas (CE) é maior (pontas de setas). Na região subterminal, o axonema flagelar ainda apresenta sua estrutura típica "9 + 9 + 2" com nove microtúbulos acessórios (MA), nove duplas periféricas (DP) e dois microtúbulos centrais (MC), além das demais estruturas axonemáticas. Ausência dos derivados mitocondriais. Na região terminal do axonema, que está se desorganizando, notam-se algumas pontes (pontas duplas de setas) interligando os microtúbulos acessórios aos pares periféricos. 120.000 x.

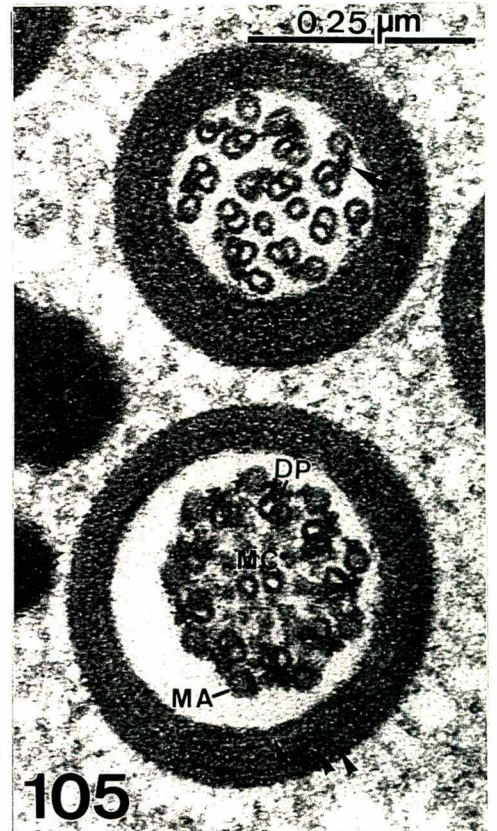
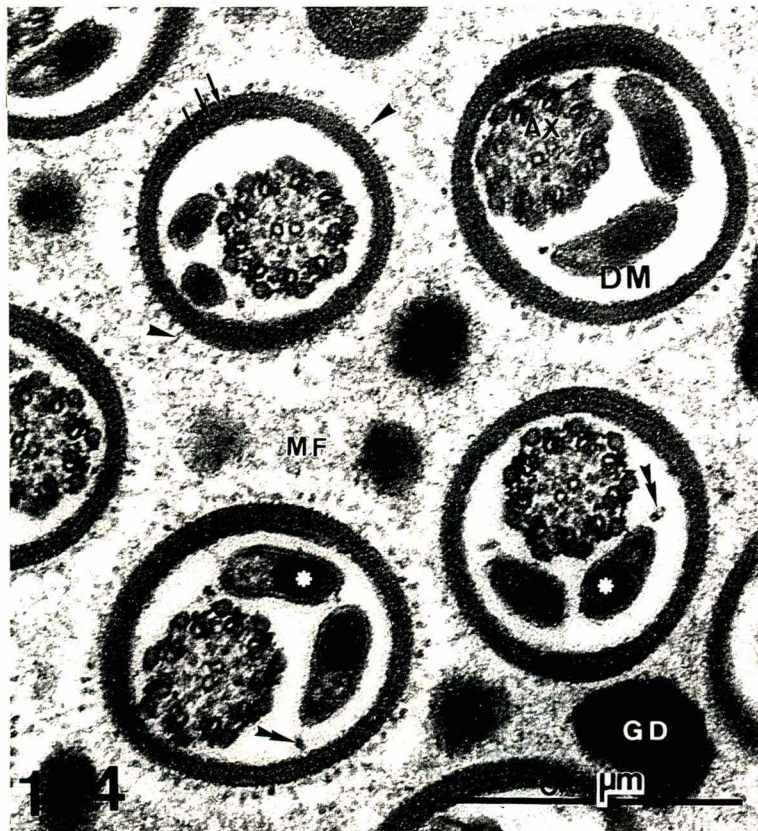
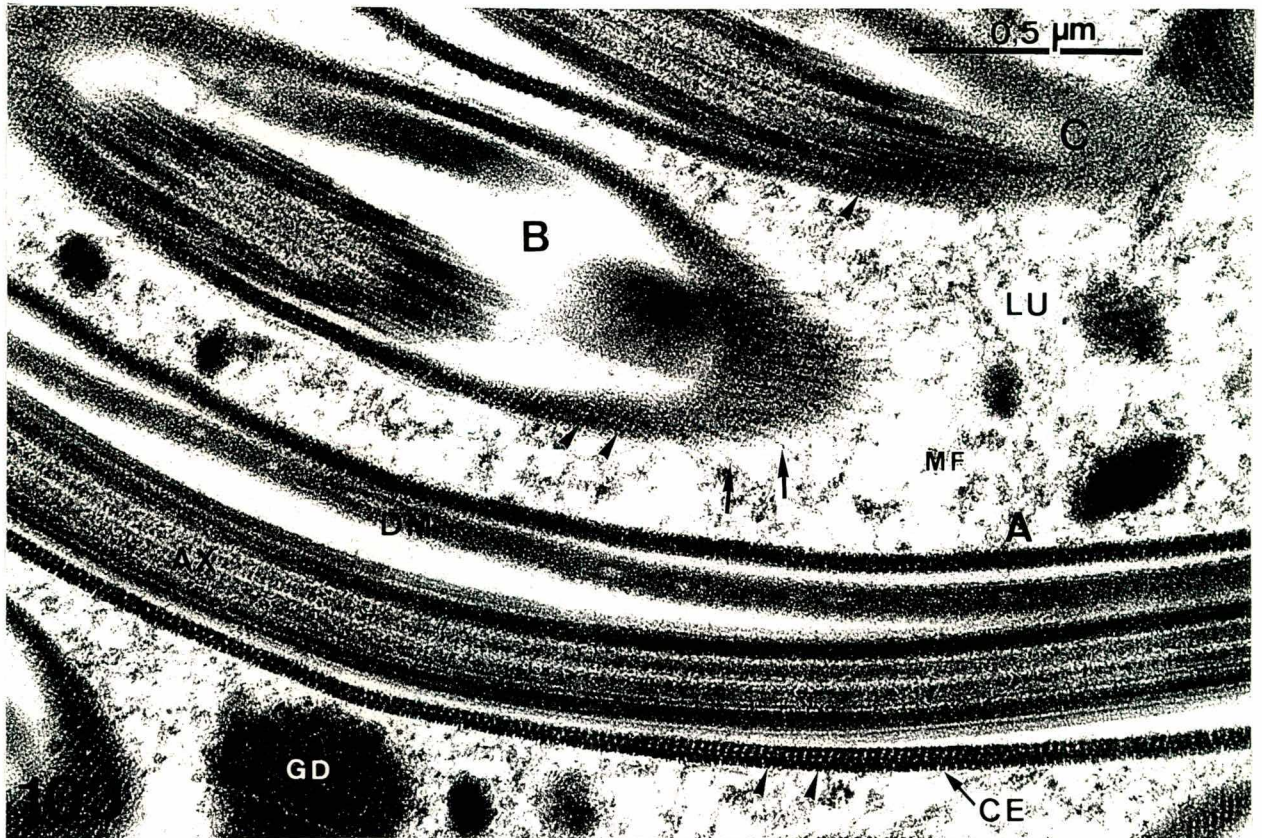


Fig. 106 - Cavidade da vesícula seminal ocupada, principalmente, por feixes compactos de espermatozoides eupirenes (EUP), formando grupos helicoidais entremeados por massas de material de secreção (*). Entre os feixes eupirenes, observam-se poucos espermatozoides apirenes (AP), que formam grupos de células dispersas na periferia do lúmen. MEV - 480 x.

Fig. 107 - Ampliação da região indicada à esquerda (seta larga vazia) na figura anterior. Destaca-se uma massa compacta de material de secreção (*) com formato irregular e superfície sinuosa, que se assemelha a um "queijo suíço", devido à presença de vários orifícios (setas) distribuídos na superfície da área fraturada. As pontas de setas indicam pequenos grânulos aderidos à superfície externa da massa de secreção ou de espermatozoides apirenes (AP). EUP - feixe eupirene. MEV - 2.200 x.

Fig. 108 - Ampliação da região enquadrada no retângulo à direita da fig. 106, na qual se destaca parte de uma massa compacta de material de secreção (*) rodeada por feixes de espermatozoides eupirenes (EUP). As setas indicam os orifícios no interior desta massa. Espermatozoide apirene atravessando o material de secreção ou parcialmente mergulhado nele (ponta dupla de seta). MEV - 2.200 x.

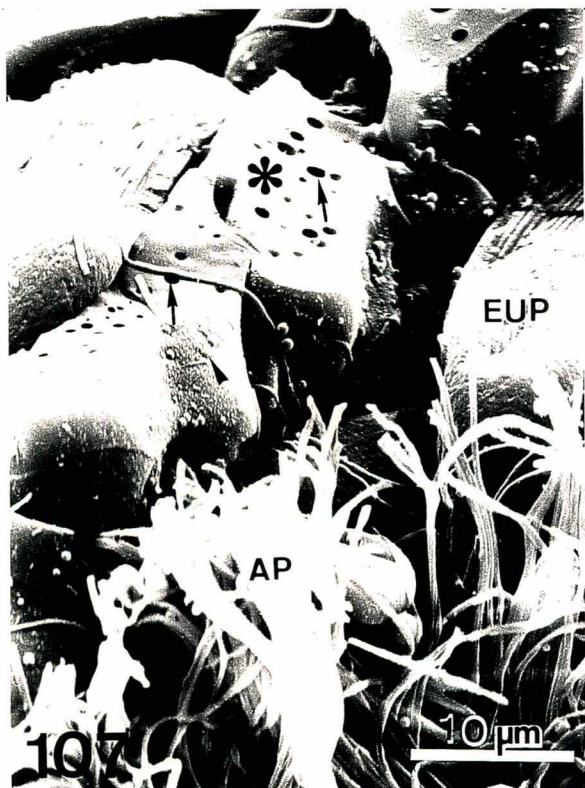


Fig. 109 - Porção criofraturada de um dos dois condutos do "duplex" (DU), no qual desemboca um vaso deferente (VD). Do lúmen do "duplex", projeta-se um tufo de espermatozóides apirenes (AP). Ausência de feixes de espermatozóides eupirenes. MEV - 190 x.

Fig. 110 - Imagem ampliada de um tufo denso de espermatozóides apirenes (AP) localizados no "duplex", entre os quais se observam grânulos de secreção (setas) esféricos de vários tamanhos. Os grânulos maiores (*), provavelmente, resultam da coalescência dos grânulos menores. MEV - 4.200 x.

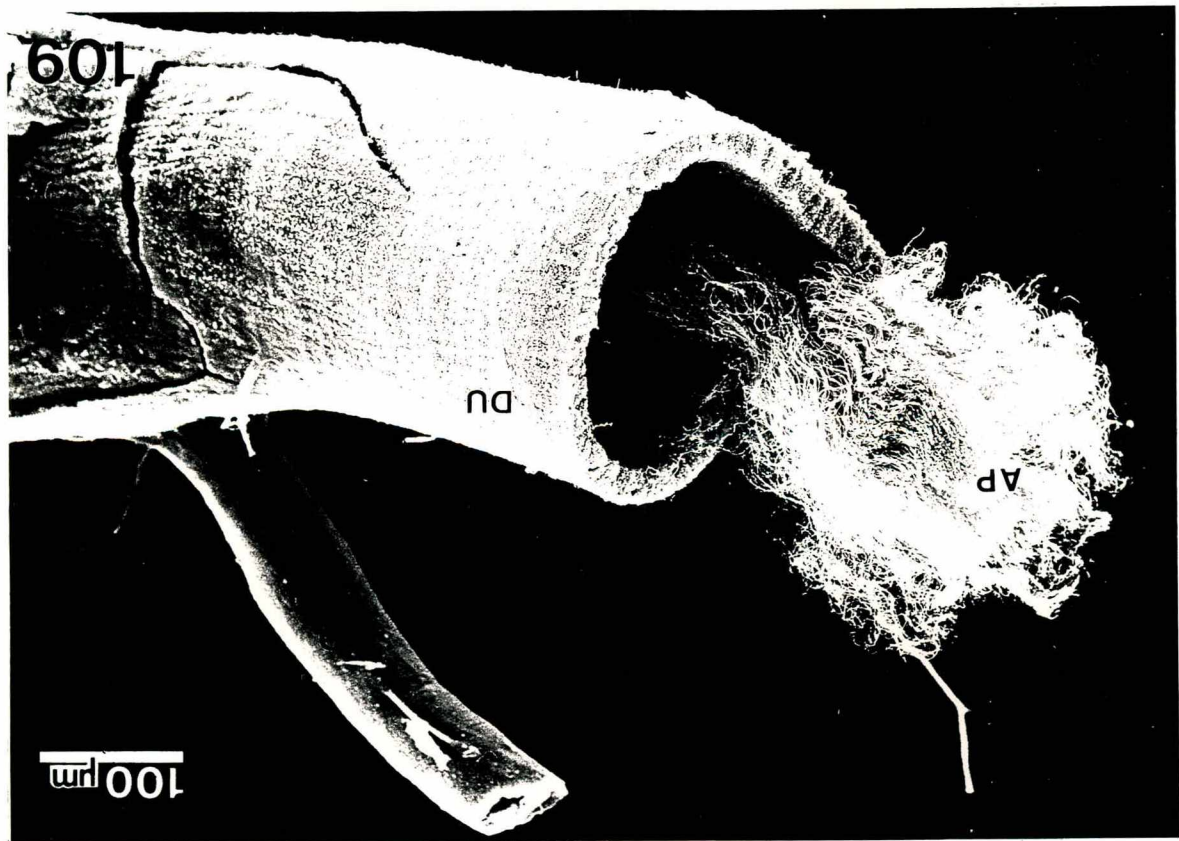


Fig. 111- Porção criofraturada do "duplex" (DU) com espalhamento dos feixes de espermatozóides eupirenes (EUP) que ocupavam a maior parte do lúmen do ducto. Observa-se que os feixes eupirenes apresentam-se enrolados entre si e que os espermatozóides apirenes (AP) encontram-se esparsamente distribuídos entre os feixes eupirenes ou adjacentes à face interna da parede do ducto ejaculador. MEV - 120 x.

Fig. 112- Um grupo de três feixes de espermatozóides eupirenes (EUP) enrolados, procedentes do mesmo ducto visto na figura 111. Em destaque, as regiões proximais dilatadas dos feixes (*) correspondentes às cabeças dos espermatozóides. Cada feixe se encontra envolto por uma espécie de capa de material de secreção, que mantém os espermatozóides bem coesos. Dispersos entre os três feixes, são observados vários espermatozóides apirenes (setas). G - grânulo de secreção. MEV - 700 x.

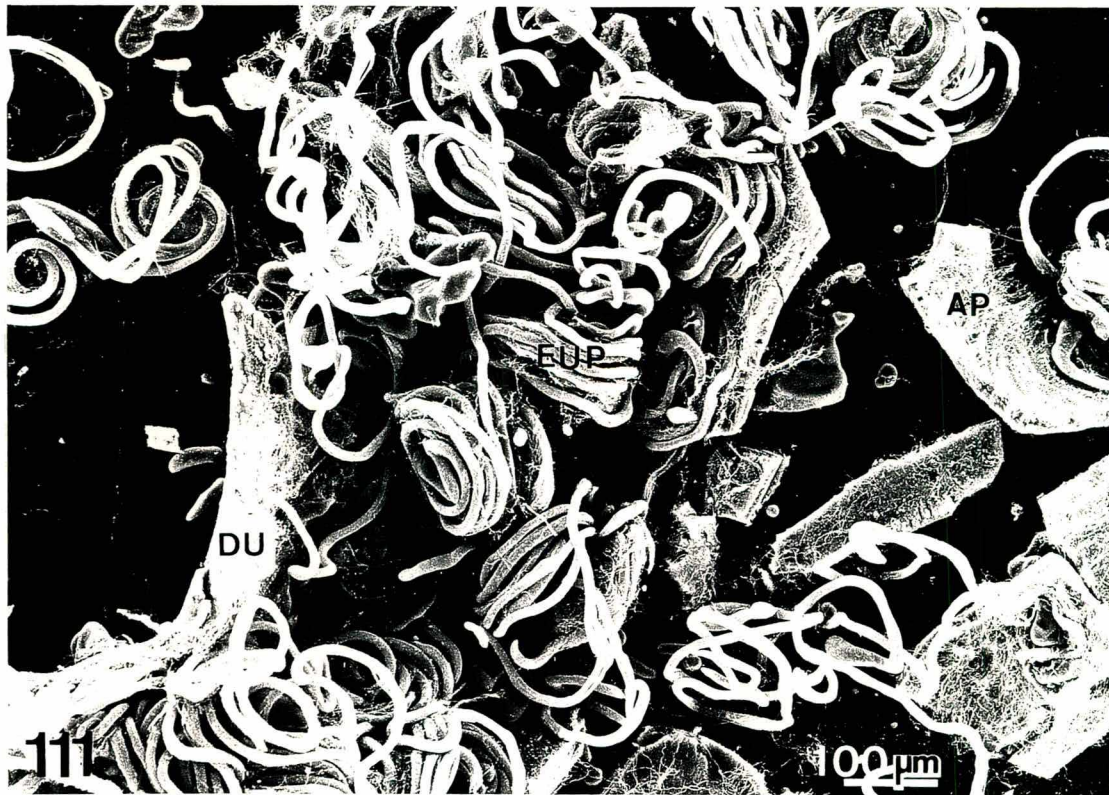


Fig. 113 - Feixes de espermatozóides eupirenes (EUP) criofaturados no "duplex" e rodeados por massas densas de espermatozóides apirenes (AP). Notam-se, também, espermatozóides apirenes dispersos (AP). No feixe eupirene quase intacto situado na região superior da figura, uma ruptura do envoltório (seta) permite verificar a ordenação linear dos flagelos internamente. **MEV - 2.000 x.**

Fig. 114 - Conjunto de feixes eupirenes (EUP) justapostos e situados na região mais central do lúmen do "duplex", nos quais se percebe uma íntima associação dos espermatozóides mantida pelo envoltório (setas). À direita, observa-se um conjunto denso de espermatozóides apirenes (AP). **MEV - 4.200 x.**

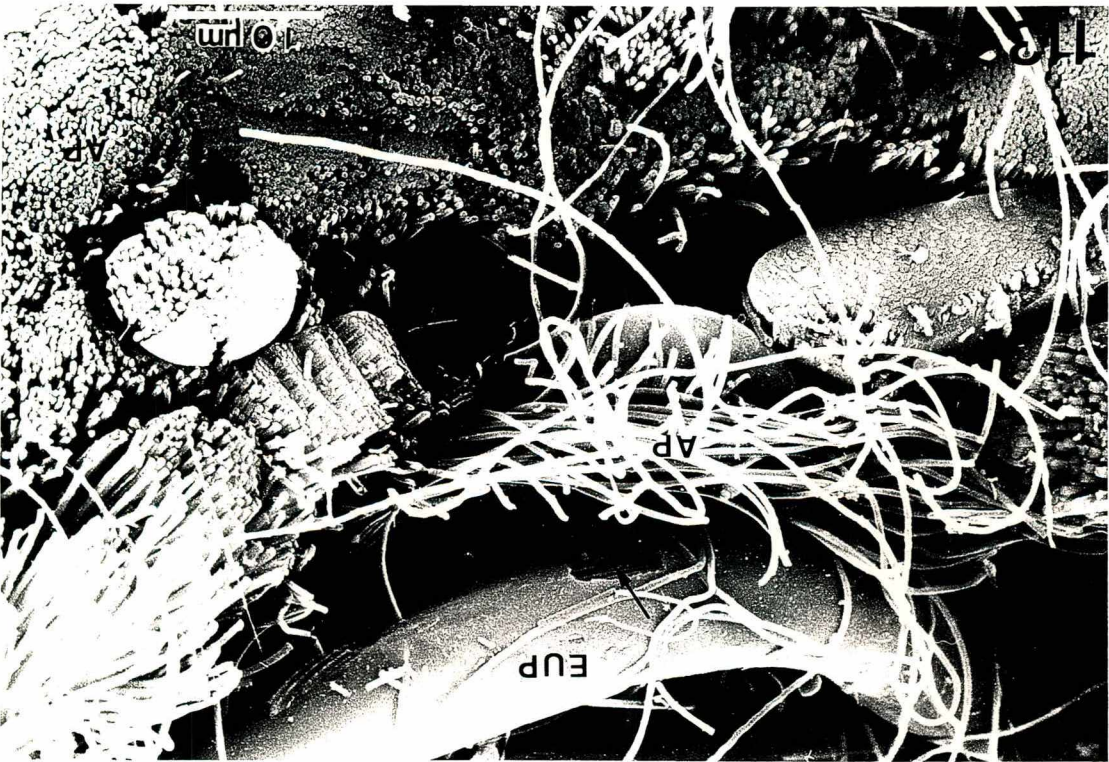
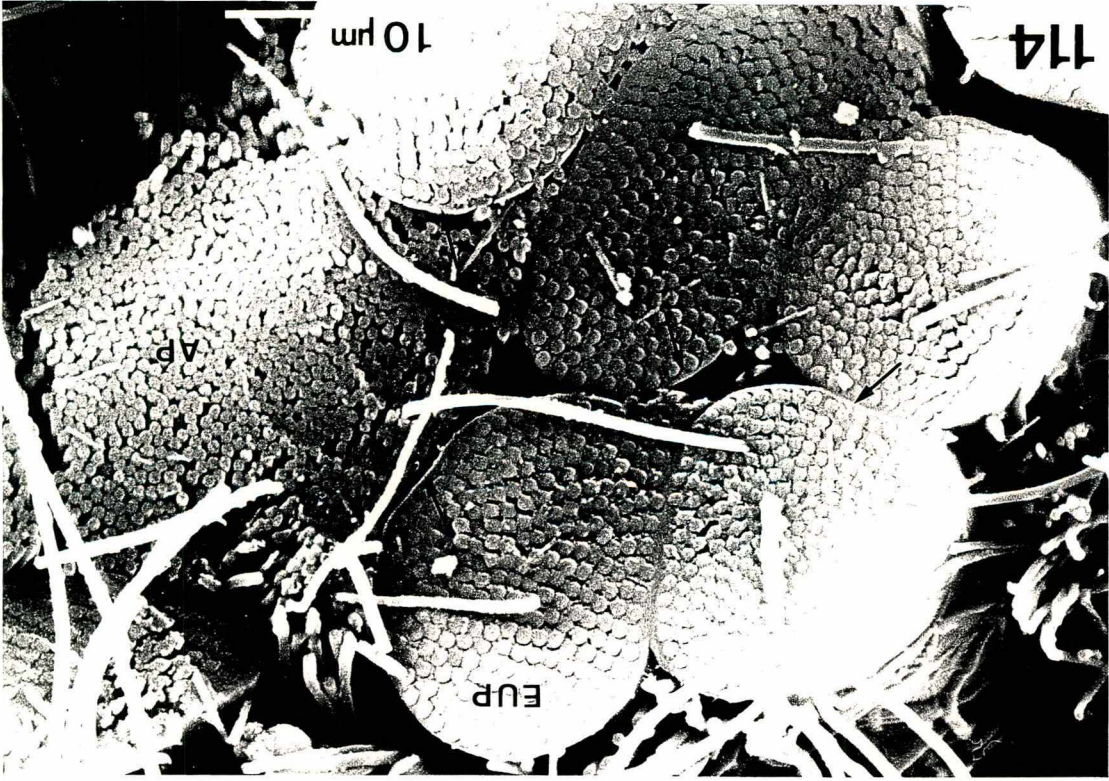


Fig. 115 - Secção transversal de cabeças de espermatozóides de um feixe eupirene localizado no "duplex". Os espermatozóides são mantidos unidos em feixe por material extra-celular que forma uma faixa reticulada (MR) na periferia, projetando-se para os espaços intercelulares. À medida que avança para a região central do feixe, esse material torna-se mais esperso. Observa-se que os espermatozóides se mantêm na mesma direção, como indica a posição dos apêndices reticulares (AR), geralmente oposta aos núcleos (N) e próxima do material denso interno (*). **15.000 x.**

Fig. 116 - Secção transversal de uma porção de um feixe eupirene localizado no "duplex", em um nível de corte semelhante ao da figura anterior, porém tratados com uma mistura fixadora à base de ácido tânico (Dallai & Afzelius, 1990) que evidencia, principalmente, a sub-estrutura do material denso interno (asterisco menor) e do apêndice reticular (setas menores). Eventualmente, observam-se dois espermatozóides unidos entre si (seta maior), compartilhando o mesmo material denso interno (asterisco maior) e a mesma capa estriada (ponta de seta), porém com dois apêndices reticulares (setas menores) distintos. ME - material extracelular. **12.600 x.**

Fig. 117 - Ampliação da área assinalada pelo retângulo na figura 116, na qual se destaca a sub-estrutura do apêndice reticular (AR) e do material denso granular (asterisco branco) que ocupa o maior volume na cabeça dos espermatozóides eupirenes. O apêndice reticular (AR), que se assemelha a um "ninho de marimbondos", está situado numa depressão da capa estriada (CE) do espermatozóide, ao qual se liga por meio de um pedúnculo (seta branca fina). O material denso granular apresenta duas camadas distintas: uma periférica e fina formada por grânulos ordenados de modo linear (setas brancas largas) e uma interna mais volumosa (asterisco branco). Ao redor do núcleo (N), observa-se a membrana nuclear (ponta de seta simples) justaposta à membrana plasmática (ponta de seta dupla), ambas evidenciadas "negativamente" pela fixação especial (Dallai & Afzelius, 1990). A estrutura membranosa (seta preta) adjacente à face plana do núcleo corresponde à vesícula acrosomal. MI - material intercelular. **96.000 x.**

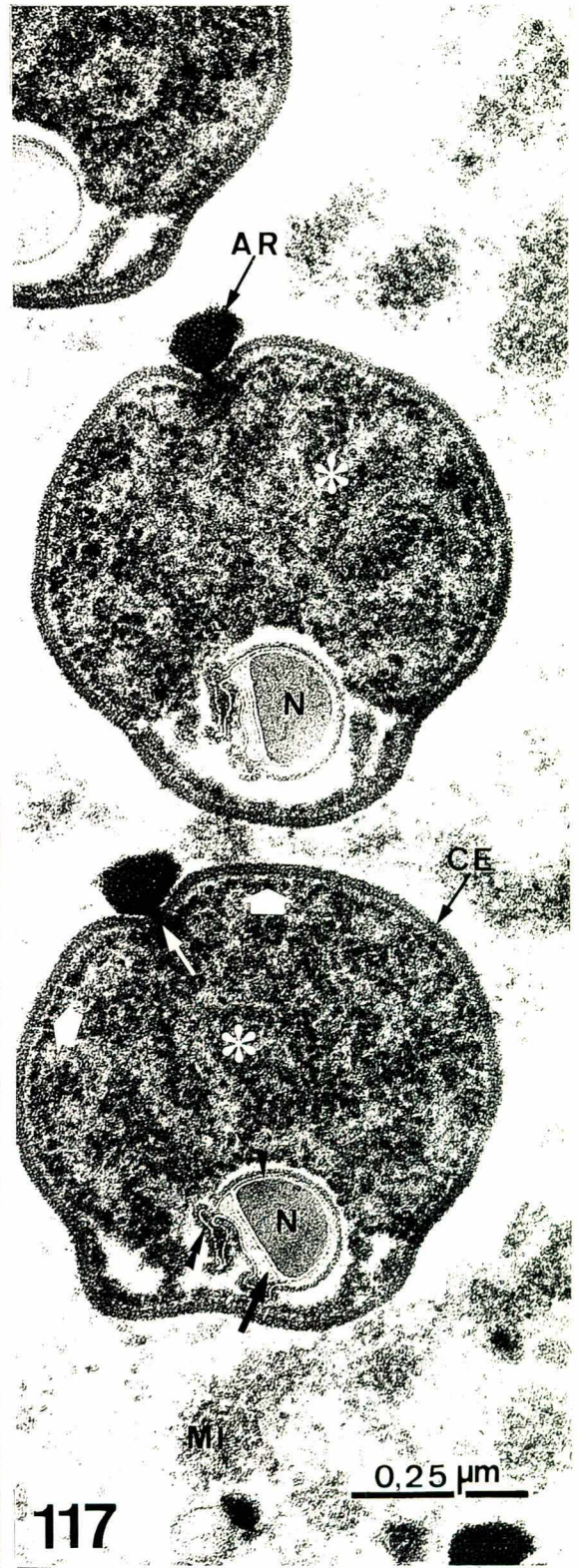
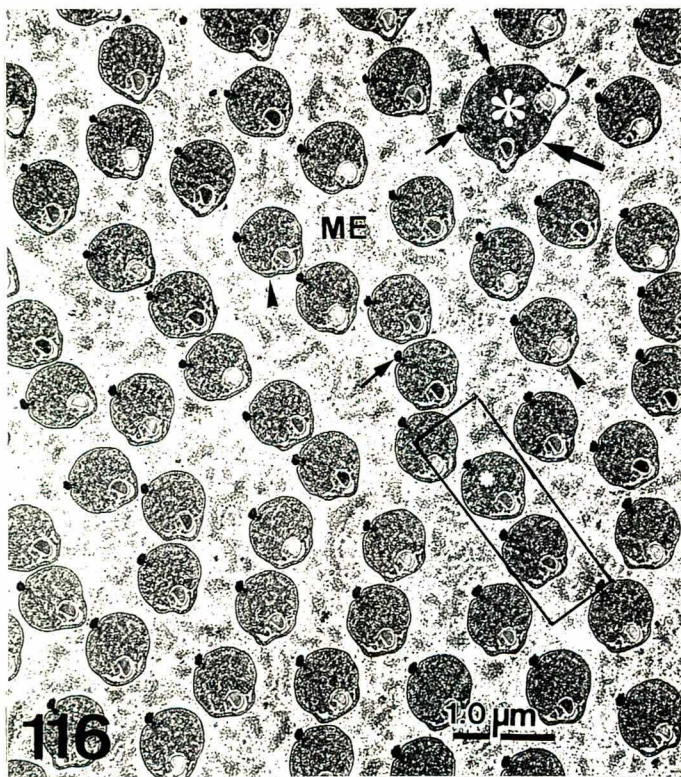
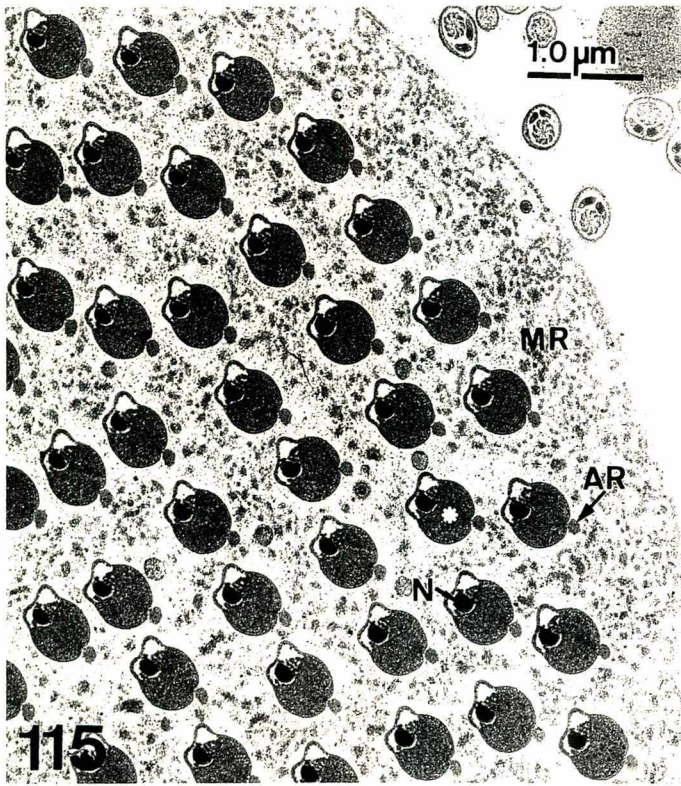
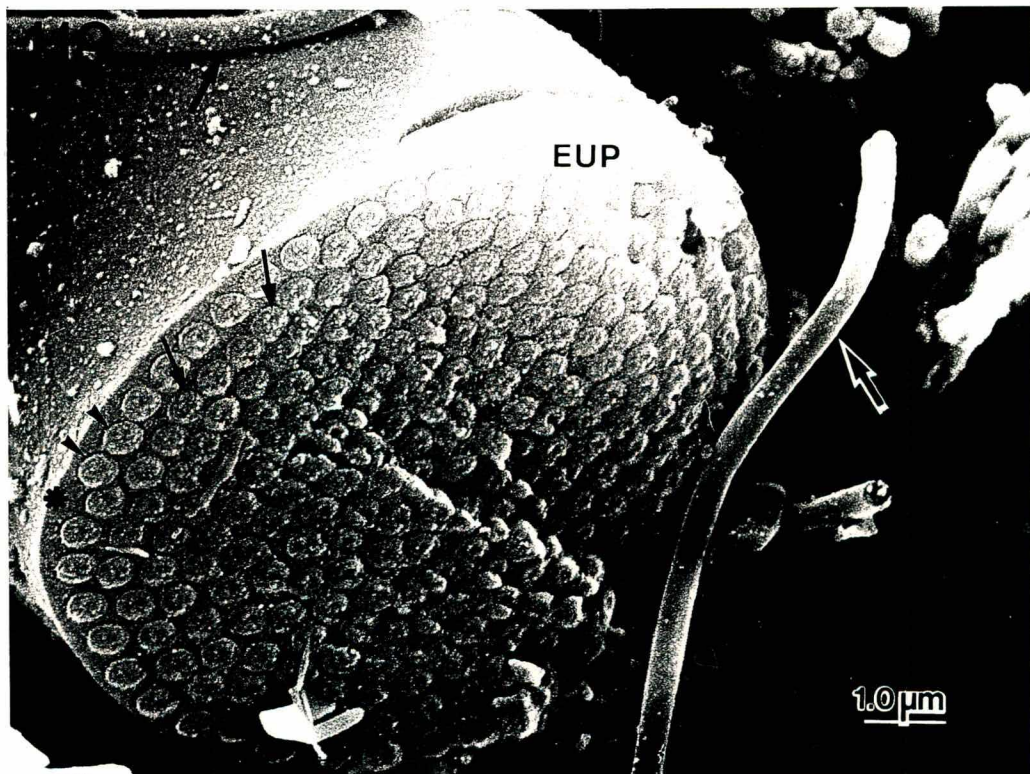
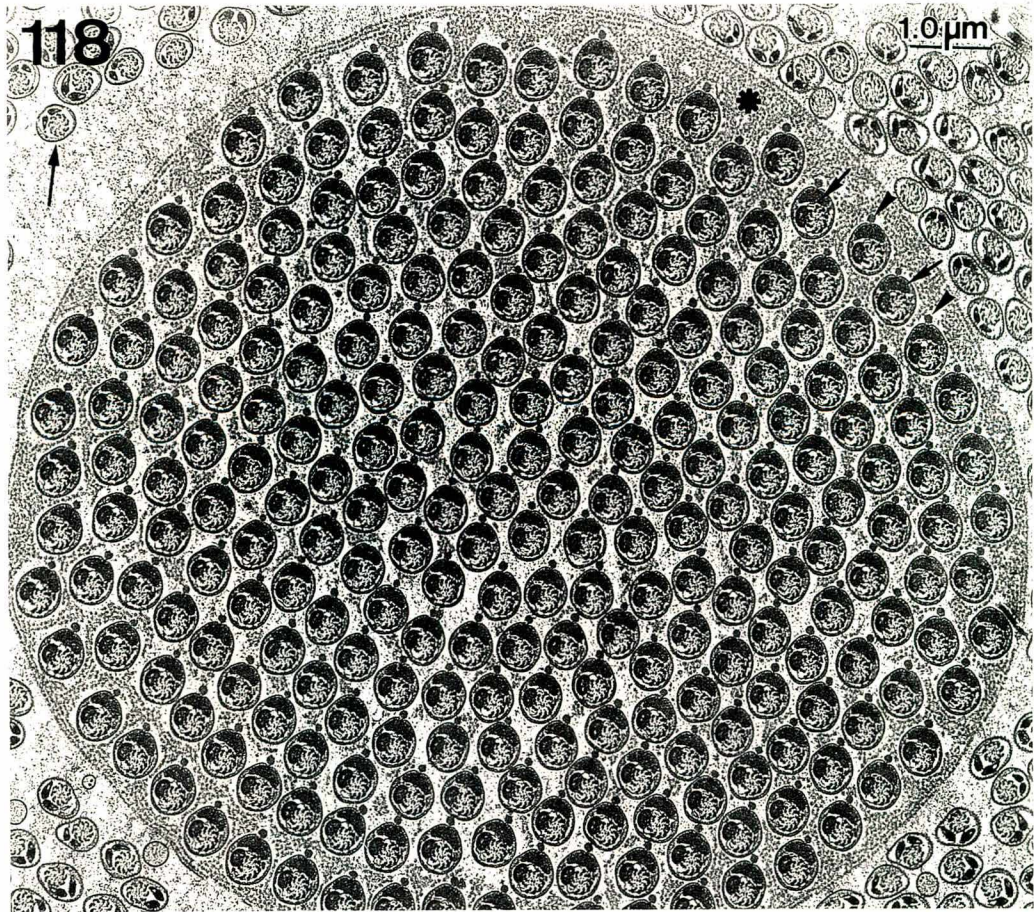


Fig. 118 - Secção transversal de um feixe de flagelos de espermatozóides eupirenes com a mesma orientação, como indicam a posição do apêndice reticular (pontas de setas) e do material denso interno (setas menores), que é adjacente ao axonema e ao derivado mitocondrial em cada célula espermática. Na camada mais externa do feixe, observa-se material denso granular (*) que ocupa os espaços intercelulares, auxiliando na manutenção do feixe. Este material é mais esparso entre os espermatozóides localizados mais no centro do feixe. Na periferia do feixe eupirene, observam-se vários flagelos de espermatozóides apirenes (seta maior) em diferentes alturas de corte, envoltos por finas capas. 10.500 x.

Fig. 119 - Criofratura em etanol de um feixe de flagelos eupirenes, no qual se destacam: o material intercelular (*), as capas (pontas de setas) dos espermatozóides e seus axonemas salientes (setas finas). Vários espermatozóides apirenes (setas grossas) encontram-se dispersos no lúmen do "duplex", próximos aos eupirenes. MEV - 10.000x.



DISCUSSÃO

1. ESPERMIOGÊNESE APIRENE

1.1. Micronúcleos e Enucleação

A presença de micronúcleos é observada nos pólos dos espermátocitos ao final da telófase II da meiose atípica de várias espécies de lepidópteros, como se percebe em cortes finos de testículo de *A. argillacea* (observação pessoal), de *Ephestia cautella* (Friedländer & Miesel, 1977), de *Orgyia thyellina* (Wolf, Baumgart & Traut, 1987) e de *Dione juno* (Corsatto-Alvarenga, 1989).

Nas espermátides apirenes iniciais de *Alabama*, vários micronúcleos esféricos se encontram distribuídos ao redor do "centríolo" ou corpúsculo basal atípico, como já havia sido também observado em cortes finos de espermátides apirenes de outra espécie de mariposa, *Ephestia cautella*, no início do processo de enucleação (Friedländer & Miesel, 1977). Contudo, em espermátides apirenes iniciais de *Bombyx mori* (Friedländer & Wahrman, 1971) e de *Pieris brassicae* (Zylberberg, 1969), somente foi detectado um núcleo atípico, posicionado posteriormente ao centríolo e próximo do "Nebenkern", na região anterior de cada célula. Entretanto, Friedländer & Wahrman (1971) registraram vários micronúcleos ao longo dos flagelos de espermátides mais avançadas de *B. mori* (Fig. 14 - Friedländer & Wahrman, 1971), o que poderia indicar a fragmentação do núcleo inicial em micronúcleos durante o transcorrer da espermiogênese.

Os micronúcleos de dois tamanhos distintos e com conteúdos cromatínicos de aspectos diferentes, observados ao longo de flagelos de espermátides apirenes mais avançadas de *Alabama*, são semelhantes àqueles observados em espermátides atípicas do lepidóptero *E. cautella* (Friedländer & Miesel, 1977). Análises citoquímicas demonstraram a presença de DNAase II no tipo de

micronúcleo que apresenta cromatina mais difusa em espermátides apirenes iniciais de *E. cautella*, indicando que a degradação dos micronúcleos começaria muito precocemente na espermiogênese apirene, bem como continuaria após a enucleação por ação de lisosomas contendo DNAase e localizados entre os flagelos (Friedländer & Miesel, 1977). No citoplasma de espermátides apirenes iniciais de *A. argillacea*, nós encontramos freqüentes corpos residuais próximos de corpos multivesiculados e de micronúcleos do tipo acima descrito, o que também poderia indicar a degradação precoce intracitoplasmática dos micronúcleos, como também foi observado em *Calpodes ethlius* (Lai-Fook, 1982b). Contudo, não notamos a presença de micronúcleos extrusionados no interior de corpos residuais na parede dos cistos com espermatozóides maduros de *A. argillacea*, como foi observado em testículo de *E. cautella* (Friedländer & Miesel, 1977).

Durante o período de alongamento dos flagelos de espermátides apirenes mais avançadas de *Alabama*, o encapsulamento dos micronúcleos em vesículas envoltas por envelopes membranosos lisos é semelhante ao observado ao longo dos flagelos de espermátides atípicas dos lepidópteros *E. cautella* (Friedländer & Miesel, 1977), *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b) e *E. kuehniella* (Wolf, Baumgart & Traut, 1988). Ao contrário da conseqüente extrusão dos micronúcleos 'envelopados', observada em corte finos de flagelos de espermátides apirenes avançadas de *E. cautella* (Friedländer & Miesel, 1977), em espermátides atípicas de *A. argillacea* parece haver fusão do material cromatínico com o citoplasma. Estas massas cromatínicas tendem a se acumular no citoplasma das extremidades distais dos flagelos, provavelmente sendo eliminadas junto com o resto do citoplasma no final da espermiogênese. Para validação dos nossos dados ultra-estruturais, seria necessária a comprovação citoquímica.

1.2. O Capuz Denso Apical

A formação e o desenvolvimento do capuz denso extracelular, que recobre as extremidades apicais de espermátides apirenes de *Alabama* em alongamento, se assemelham, em parte, ao ocorrido durante a invaginação das espermátides de *B. mori* (Friedländer & Miesel, 1977) e de *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b). No entanto, em espermátides atípicas mais jovens de *A. argillacea*, não observamos o tampão denso nem a estrutura periódica em formato de “escova de tubo de ensaio” encontrados, respectivamente, na extremidade anterior e ao redor do corpúsculo basal de espermátides apirenes de *Pieris brassicae* (Zylberberg, 1969). A estrutura periódica também é encontrada ao redor do centríolo de espermátide inicial de *B. mori* (Friedländer & Miesel, 1977). O desenvolvimento do capuz denso de *Alabama* parece seguir o padrão encontrado em espermátides apirenes nos lepidópteros: *Tricoplusia ni*, também da família dos noctuídeos, (Riemann, 1970), *B. mori* (Friedländer & Wahrman, 1971) e *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b). Em cortes finos longitudinais e transversais, as regiões anteriores de espermatozóides apirenes de *Alabama* são muito semelhantes àsquelas dos chamados 'para-espermatozóides' de outro noctuídeo, *Heliothis punctigera* (Jamieson, 1987a). Contudo, somente obtivemos maiores informações sobre detalhes ultra-estruturais do capuz denso e da região centriolar atípica de *A. argillacea* com o uso de uma mistura fixadora à base de ácido tânico (Método IV), que permitiu a observação em grandes aumentos (Medeiros & Silveira, 1996).

Quanto à natureza química do capuz denso apical, somente Riemann (1970) sugeriu a presença de pequena quantidade de material nuclear ao redor daquele, mesmo considerando a inexistência de envelope nuclear e o fato de as 'cabeças' dos espermatozóides apirenes de *Tricoplusia ni* ser Feulgen-negativas. Os espermatozóides apirenes de *Alabama*, quando tratadas com E-PTA, mostram forte reação positiva nos capuzes apicais, indicando a presença de proteínas de caráter básico nestas regiões.

A origem do capuz denso extracelular permanece desconhecida, porém nós aventamos a hipótese de que o mesmo seja um tipo de secreção celular de natureza protéica, provavelmente produzida pela célula cística apical durante a invaginação gradual das espermátides apirenes, pois a formação do capuz denso apical somente se processa durante este período. Além disso, no citoplasma apical das espermátides apirenes em alongamento e que estão se aprofundando na célula cística, não são observados complexos de Golgi nem retículo endoplasmático granular, apenas polisomas livres.

1.3. A Extremidade Anterior do Flagelo

Informações obtidas a partir de cortes transversais, em diferentes alturas, de regiões anteriores - correspondentes aos corpúsculos basais - de flagelos de espermatozóides apirenes somente foram publicadas para as seguintes espécies de lepidópteros: o hesperídeo *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b) e os noctuídeos *H. virescens* (Jamieson, 1987a) e *A. argillacea* (Medeiros & Silveira, 1996). Phillips (1970) também mostrou um corte transversal de regiões anteriores da mariposa *Crambus* (Fig. 15), porém as confundiu com “regiões nucleares”, pois neste trabalho não distinguia entre os dois tipos de espermatozóides produzidos pelos Lepidoptera. Este equívoco foi constatado por outros autores, que também estudaram outras espécies de lepidópteros (Friedländer & Wahrman, 1971; Lai-Fook, 1982b; Medeiros, 1986; Medeiros & Silveira, 1996). Nós somente conseguimos detalhar minuciosamente a organização ultra-estrutural da região centriolar e da porção inicial dos axonemas flagelares de espermatozóides apirenes de *Alabama* com a utilização de uma mistura fixadora à base de ácido tânico (Método IV). Quanto à presença de um “centríolo” (ou corpúsculo basal) nas extremidades apicais de espermátides e espermatozóides apirenes, nossos dados são concordantes com os observados em outras espécies de Lepidoptera (Friedländer & Wahrman, 1971; Friedländer & Gitay, 1972; Lai-Fook, 1982b; Jamieson, 1987a). Podemos, então, fazer uma

generalização: "as espermátides e espermatozóides apirenes das espécies de lepidópteros considerados mais evoluídos apresentam apenas um 'centríolo' em suas 'cabeças' e a estrutura deste corpúsculo basal é 'atípica', quando comparada com a estrutura usual dos chamados 'centríolos típicos' ou seja, formados por nove conjuntos de microtúbulos triplos".

1.4. O Desenvolvimento do Flagelo: o Axonema e os Derivados Mitocondrais

Até o presente, apenas Friedländer & Miesel (1977) e Lai-Fook (1982b), estudando a espermiogênese apirene dos lepidópteros *E. cautella* e *C. ethlius*, respectivamente, publicaram algumas poucas informações sobre a organização ultra-estrutural de flagelos de espermátides avançadas. No trabalho pioneiro a respeito da organização flagelar e do desenvolvimento do 'condrioma' em espermátides de Lepidoptera, *Pieris brassicae* e *Macroglossum stellatarum*, André (1962), não diferenciou os dois tipos distintos de células espermáticas produzidas, englobando diferentes estágios na mesma seqüência de desenvolvimento flagelar e mitocondrial.

Também faltam na literatura, informações sobre estágios intermediários do alongamento de flagelos de espermátides apirenes de Lepidoptera. Quanto ao desenvolvimento do axonema flagelar, o que se observa em espermátides apirenes de *Alabama* é bastante semelhante àquele descrito para a grande maioria das ordens de insetos (Baccetti, 1972; Szöllösi, 1975; entre muitos outros) e a outras espécies de lepidópteros já estudadas (Rieman, 1970; Phillips, 1971; Lai-Fook, 1982b; Jamieson, 1987a). O detalhamento ultra-estrutural, aqui descrito, dos axonemas de espermátides apirenes de *Alabama* (Medeiros & Silveira, 1996) foi especialmente evidenciado com o uso da técnica de Dallai & Afzelius (1990).

Em *Alabama*, percebemos pequenas diferenças na evolução do complexo mitocondrial apirene e eupirene, porém os derivados mitocondriais são

totalmente distintos tanto em relação à ultra-estrutura final quanto às modificações sofridas na posição espacial, na forma, no volume, no envelope e na matriz durante a segunda etapa do alongamento flagelar, como mostram os resultados do presente trabalho. Em relação ao desenvolvimento do complexo mitocondrial em espermátides de lepidópteros, a mais extensa descrição ultra-estrutural já feita foi a de André (1962), ao discorrer sobre a evolução do 'condrioma' durante a espermiogênese das borboletas *P. brassicae* e *M. stellatarum*. Contudo, como o autor não diferenciou as etapas do desenvolvimento do complexo mitocondrial e dos derivados mitocondriais eupirenes e apirenes, há uma certa mistura de etapas de um tipo de processo com as do outro, apesar de afirmar que o processo de evolução do 'condrioma' eupirene é bem diferente do apirene. Informações mais atuais, além das apresentadas por nós, sobre as modificações sofridas pelos derivados mitocondriais durante a espermiogênese apirene em outra espécie de Lepidoptera são escassas (Lai-Fook, 1982b).

A natureza paracristalina da parte densa da matriz dos derivados mitocondriais de espermatozóides apirenes de *Alabama* já foi anteriormente demonstrada por nós através da técnica de "contrastação negativa" (Medeiros, 1986). No presente trabalho, pudemos confirmar o arranjo hexagonal dessa estrutura paracristalina através da fixação com ácido tânico (Dallai & Afzelius, 1990). É provável que este método, aplicado a outras espécies de lepidópteros, permita identificar a mesma sub-estrutura, ainda não descrita.

A resposta positiva desses nucleóides paracristalinos de *Alabama* ao tratamento com E-PTA indica, em adendo, que eles contêm proteínas de caráter básico; é interessante que essa reação não se manifesta em derivados mitocondriais de flagelos de espermatozóides do díptero *Culex quinquefasciatus* (Báo *et al.*, 1992), nos quais apenas a região amorfa reage positivamente ao E-PTA. Há 20 anos, Baccetti *et al.* (1977) identificou um tipo de proteína muito rica em prolina, denominada "cristalomitina", nas regiões cristalinas de derivados

mitocondriais de espermatozóides do hemíptero *Notonecta glauca*. Sua presença em *Alabama* depende ainda de outros estudos bioquímicos.

Nos axonemas de flagelos de espermatozóides apirenes de *Alabama*, apenas o lúmen dos microtúbulos acessórios reagiu positivamente ao E-PTA, indicando a presença de proteínas básicas. Provavelmente, são estas moléculas que são visualizadas sob a forma de “esférulas” ou “protofilamentos”, quando se usa o fixador de Dallai & Afzelius (1990). Nestas preparações, o aspecto é muito semelhante aos “microcilindros” observados no lúmen dos microtúbulos axonemáticos de flagelos de espermatozóides de várias espécies de ortópteros (Kaye, 1964, 1970).

Enquanto em *A. argillacea*, todos os microtúbulos acessórios mostram reação positiva ao E-PTA, nos axonemas de espermatozóides do coleóptero crisomelídeo *Coelomera lanio* (Báo, 1991), apenas os subtúbulos-A dos pares periféricos assim reagem.

No final da espermiogênese apirene de *A. argillacea*, geralmente se encontram cerca de 256 espermatozóides em cada cisto intra-testicular, contados tanto em cortes finos transversais quanto em criofraturas para M.E.V. Este número de células espermáticas por feixe é o padrão mais freqüente para os lepidópteros em geral (Virkki, 1969, 1973). Entretanto, em estudos anteriores, também constatamos a presença de cistos apirenes gigantes, contendo de ca. 500 a mais de 700 células por feixe (Medeiros, 1986). Cistos gigantes contendo espermátocitos I apirenes também foram observados por Wolf, Baumgart & Traut (1988), em testículo de pupas de *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). Das três hipóteses aventadas por estes autores sobre possíveis origens destes cistos gigantes, duas delas são coincidentes com as que havíamos apresentado anteriormente (Medeiros, 1986).

A ultra-estrutura dos espermatozóides apirenes intra-testiculares de *A. argillacea*, bem como um desenho esquemático baseado em micrografias

eletrônicas, também foi apresentada, anteriormente, por nós naquele mesmo trabalho.

2. ESPERMIOGÊNESE EUPIRENE

2.1. A Cabeça do Espermatozóide: o Acrosoma, as transformações Nucleares e as Estruturas Associadas

Encontramos apenas duas descrições sobre o desenvolvimento do acrosoma durante a espermiogênese eupirene de Lepidoptera: *Pieris brassicae* (Zylberberg, 1969) e *Calpodus ethlius* (Lai-Fook, 1982b). Zylberberg identifica o acrosoma como uma “estrutura tubular”, enquanto Lai-Fook o denomina “acrosoma tubular”. Outros autores também descreveram estruturas equivalentes em *B. mori*, mas há muita controvérsia quanto à nomenclatura usada (Yazusumi & Oura, 1964a,b, 1965a; Friedländer & Wahrman, 1971; Friedländer & Gitay, 1972). Jamieson (1987a) chama o acrosoma tubular de espermátides e espermatozóides da mariposa noctúdea *Heliothis punctigera* de “acrosome tube” e o associa a uma vesícula apical de conteúdo denso, denominando-a de “complexo apical”. Phillips (1971), porém, não identificou nenhum acrosoma do tipo tubular em espermatozóides eupirenes em 18 espécies de Lepidoptera. Descreve os acrosomas dos lepidópteros como capuzes muito pequenos com formato de taça invertida, recobrando a extremidade apical do espermatozóide eupirene, contudo na única figura apresentada, que mostra cortes transversais de cabeças de espermatozóides típicos do geometrídeo *Hydriomena* sp., os acrosomas semi-circulares e densos são adjacentes aos núcleos. A descrição apresentada por Phillips diverge daquelas propostas por outros autores (Yazusumi & Oura, 1964a,b, 1965a; Zylberberg, 1969; Friedländer & Wahrman, 1971, Friedländer & Gitay, 1972;

Friedländer & Miesel, 1977; Lai-Fook, 1982b; Jamieson, 1987a) e por nós (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988).

As etapas iniciais do desenvolvimento acrossômico de espermátides eupirenes de *Alabama* se assemelham muito mais às de *Pieris* (Zylberberg, 1969) do que às de *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b). O acrosoma tubular, que descrevemos para *Alabama*, confere, em termos gerais, com a 'estrutura tubular' observada em outros insetos: *Bombyx* (Yazusumi & Oura, 1964a, 1964b, 1965a; Friedländer & Wahrman, 1971; Friedländer & Gitay, 1972); *Pieris* (Zylberberg, 1969); *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b) e *H. punctigera* (Jamieson, 1987a). Não observamos em espermátides e/ou espermatozóides de *Alabama*, em nenhum momento, alguma estrutura similar ao chamado "complexo apical" acrossômico, descrito em "eu-espermatozóides" do noctuídeo *H. punctigera* (Jamieson, 1987a). Em *Alabama*, *Pieris* e *Calpodes*, o acrosoma tubular das espermátides avançadas e dos espermatozóides, se localiza ao longo do núcleo, terminalizando em um bulbo dilatado situado junto à região basal estreitada do núcleo, e contendo uma espécie de 'rolha' de material denso no seu lúmen. Em *H. punctigera*, o 'acrosoma tubo' não se estende até a parte posterior do núcleo do eu-espermatozóide (Jamieson, 1987a).

Nos estágios iniciais do desenvolvimento acrosomal em *Alabama*, como em *Pieris* (Zylberberg, 1969), não se nota a formação de nenhuma 'membrana intersticial' entre o acrosoma e o envelope nuclear. Em *Alabama*, acontece um espessamento nas áreas de contato com o envelope nuclear e com a membrana plasmática, enquanto que em *Pieris*, ocorre um espessamento ao redor de toda a membrana acrosomal. Lai-Fook (1982b) não faz nenhuma menção quanto à presença ou não de uma "membrana intersticial" em acrosoma de *Calpodes*. Não pudemos comparar o desenvolvimento geral e o aspecto final do acrosoma de *Alabama* com o de outro lepidóptero noctuídeo, *Heliothis virescens* (LaChance & Olstad, 1988), cuja espermiogênese eupirene foi descrita em nível ultra-estrutural, pois os autores apenas apresentaram uma única figura de um

“acrosoma em desenvolvimento” de espermátide muito jovem. O acrosoma tubular de *Alabama*, *Pieris* e *Calpodes* adquire seu aspecto definitivo quando começa a se formar a rede cromatínica nuclear. Jamieson (1987a) considera o “acrosome tube” como reminescente, sob o ponto de vista filogenético, do tubo acrossômico de anelídeo clitelado. A “vesícula apical”, observada na extremidade anterior do “acrosome tube” de *H. punctigera* (Jamieson, 1987a) não foi observada nas outras espécies de lepidópteros estudados, incluindo *Alabama*.

A estreita associação entre o acrosoma tubular e o apêndice reticular, observada durante a espermiogênese eupirene de *Alabama*, já foi previamente descrita em espermátides de *Bombyx* (Yazusumi & Oura, 1964a,b, 1965), *Pieris* (Zylberberg, 1969) e *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b). Yazusumi & Oura (1964a,b, 1965a) não utilizaram o termo “apêndice reticular”, que já havia sido previamente descrito em espermatozóides dos lepidópteros *P. brassicae* e *M. stellatarum* por André (1962), denominando-o de “banda densa”.

Estudos ultra-estruturais citoquímicos de acrosomas tubulares de Lepidoptera se restringem a dados muito genéricos sobre a composição química do acrosoma de *Pieris* (Zylberberg, 1969). Porém, já é bastante conhecido que o complexo de Golgi contribui, durante fases precoces da espermiogênese em insetos, com substâncias específicas (hidrolases e outras) para a formação e o desenvolvimento do acrosoma (revisões - Phillips, 1970 e Baccetti, 1972).

Concluindo, podemos afirmar que as informações ultra-estruturais sobre o desenvolvimento do acrosoma tubular de *Alabama*, apresentadas neste trabalho, constituem, até o presente, a descrição morfológica mais detalhada em relação à numerosa Família Noctuidae, considerando os escassos dados disponíveis sobre o acrosoma de espermatozóides eupirenes deste grupo e de outras famílias de lepidópteros.

As transformações nucleares ocorridas durante a espermiogênese eupirene de *Alabama* assemelham-se em vários aspectos com as modificações

apresentadas nos núcleos de espermátides eupirenes de *Pieris* (Zylberberg, 1969) e de *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b). O aspecto do núcleo de espermátides muito jovens de *Alabama* (pequeno e com grumos de heterocromatina acolados ao envelope nuclear) é muito similar àquele de espermátides iniciais dos lepidópteros *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b), de *Ephestia kueniella* (Wolf & Kyburg, 1989) e de *Inachis io* (Wolf, 1992). Difere, porém, daquele arranjo encontrado em células consideradas como espermátides iniciais no noctuídeo *Heliothis virescens* (LaChance & Olstad, 1988a). Analisando as duas figuras, de 'espermátide jovens' apresentadas por estes autores, e com base na observação de outros pesquisadores (Wolf & Kyburg, 1989; Wolf, 1990), percebemos que as características nucleares e citoplasmáticas são mais compatíveis com a morfologia de espermatócitos do que com as de espermátides de Lepidoptera.

Em espermátides de *Alabama*, *Pieris* e *Calpodes*, à medida que progride o desenvolvimento do complexo mitocondrial e do acrosoma, poucas modificações aparentes acontecem no núcleo. Em *Calpodes*, a cromatina vai se concentrando no centro do núcleo, onde forma um bloco denso, bem diferente do observado em *Alabama* e em *Pieris*. Em *Inachis io* (Wolf & Kyburg, 1989), a heterocromatina se concentra em uma faixa periférica polarizada, quando o chamado 'acrosoma precursor putativo' (nomenclatura de acordo com os autores) já está localizado junto ao núcleo. Em *Alabama*, a cromatina mais densa se dispersa para formar uma rede filamentosa fina, que se torna fibrilo-granular gradualmente. Este aspecto granular da cromatina também foi observado em estágios um pouco mais avançados de *Calpodes*. Tanto em *Alabama* como em *Pieris* e *Calpodes*, as fibrilas da rede cromatínica vão se tornando mais espessas e se organizando em filamentos espessos mais ou menos paralelos em estágios mais avançados. Estágio intermediário do desenvolvimento desta rede cromatínica (filamentos espessos separados por espaços claros mais ou menos poligonais e a coalescência daqueles em uma

rede cada vez mais espessa), como aquele visto em núcleos de *Alabama*, ainda não foram relatados em outras espécies de lepidópteros.

Durante o alongamento das espermátides, o núcleo é circundado por um arranjo de microtúbulos citoplasmáticos (Phillips, 1974- revisão). Nos insetos, é fato conhecido há mais de 30 anos que as cabeças de espermátides em alongamento mostram um anel perinuclear de microtúbulos citoplasmáticos, como, por exemplo, foi registrado em várias ordens: Thysanura (Bawa, 1964); Diptera (Stanley *et al.*, 1972; Tokuyasu, 1974; Wilkinson, Stanley & Bowman, 1975; Quagio-Grassiotto, 1983, 1993); Odonata (Kessel, 1966; Gama *et al.*, 1976); Orthoptera (Kessel, 1967; Szöllösi, 1975; Cruz-Landim, 1979b); Hymenoptera (Hoage & Kessel, 1968; Hogge & King, 1975; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980); Megaloptera (Afzelius, 1988); Coleoptera (Lino-Neto, 1993; Báó & Hamú, 1993); e Lepidoptera (Yasuzumi & Oura, 1964a,b; Zylberberg, 1969; Friedländer, 1976; Friedländer & Gershon, 1978; Lai-Fook, 1982b). Ao redor dos núcleos de espermátides eupirenes de *Alabama*, durante o período de condensação e alongamento, foi observada uma fileira única de microtúbulos associados a cisternas lisas, semelhantes às estruturas perinucleares descritas nas outras espécies de Lepidoptera.

Em estágios bem avançados da condensação cromatínica em espermátides eupirenes de *Pieris* (Zylberberg, 1969) e de *Ephestia cautella* (Friedländer, 1976), foram observadas fileiras paralelas de microtúbulos interligados e associados ao envoltório nuclear, não identificadas tanto em *Alabama* quanto em *Calpodes*, mesmo em estágios bem adiantados. Friedländer (1976) aventou a hipótese de que esta coroa múltipla de microtúbulos, bem ordenados, seria a provável origem da manta radial representada pelos apêndices laciniados, que decoram a superfície dos espermatozóides eupirenes dos Lepidoptera. Esta idéia recebeu um suporte adicional, quando Friedländer & Gershon (1978) trataram *in vivo* testículo da mariposa *E. cautella* com um agente anti-mitótico, a vinblastina, e verificaram que os apêndices laciniados eram desorganizados

por ação desta droga, como ocorre em estruturas microtubulares citoplasmáticas. A idéia de Friedländer (1976) sobre a origem dos apêndices laciniados, corroborada pelo experimento de Friedländer & Gershon (1978), é muito convincente e amplia a provável ação múltipla dos microtúbulos citoplasmáticos. Zylberberg (1969) observou, em cortes longitudinais de regiões anteriores de espermátides eupirenes de *Pieris* em maturação, a presença de uma 'bainha paracristalina' (nomenclatura segundo a autora), que poderia representar uma etapa da transformação da coroa múltipla de microtúbulos ao redor dos núcleos em condensação, nos apêndices laciniados.

Como somente encontramos ao redor dos núcleos em alongamento e em condensação de espermátides eupirenes de *Alabama*, uma coroa única de microtúbulos, detectada também em cabeças de espermátides de outras espécies de lepidópteros (Zylberberg, 1969; Lai-Fook, 1982b), é muito sugestivo que esta coroa única exerça um papel morfogenético sobre o núcleo. Em estágios bem avançados da condensação nuclear de espermátides de *Alabama*, quando a cromatina já se apresenta com aspecto homogêneo, notamos que os microtúbulos perinucleares apresentam-se unidos entre si e ligados com o envelope nuclear por meio de finos septos. Estas ligações filamentosas também foram observados em espermátides de outras espécies de insetos. Quagio-Grassiotto (1993) atribuiu papel morfogenético a estas pontes filamentosas, enquanto que Yazusumi *et al.* (1971) e Stanley *et al.* (1972) também aventaram a possibilidade de os septos atuarem na reestruturação cromatínica, agindo sobre o envoltório nuclear. Em suma, nós também concordamos com outros autores que estudaram a espermiogênese de outras ordens de insetos: Diptera (Quagio-Grassiotto, 1983) e Coleoptera (Lino-Neto, 1993), os quais acreditam que as estruturas extranucleares (microtúbulos + membranas), que interagem com o núcleo durante o período de condensação cromatínica, e o padrão específico de organização da cromatina podem ser, em conjunto, responsáveis pela morfologia final dos núcleos dos espermatozóides.

2.2. A peça intermediária: o Centríolo e o Adjunto do Centríolo

Em nenhum estágio do desenvolvimento das espermátides eupirenes de *Alabama* identificamos, na porção inicial do flagelo, algum "centríolo típico" com nove grupos periféricos de microtúbulos. Considerando a definição de 'centríolo' proposta por Friedländer & Wahrman (1970): 'os centríolos verdadeiros são organelas citoplasmáticas compostas basicamente de microtúbulos paralelos que atuam, real ou potencialmente, como corpúsculos basais para cílios, flagelos e suas modificações', nós podemos afirmar que existe apenas um 'centríolo' (corpúsculo basal) em espermátides eupirenes de *Alabama*, desde estágios bem iniciais do seu desenvolvimento. A ultra-estrutura deste 'centríolo' é semelhante à dos centríolos únicos, reconhecidos em espermátides jovens de outros lepidópteros: *B. mori* (Friedländer & Wahrman, 1970, 1971), *E. cautella* (Friedländer & Miesel, 1977), *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b) e *E. kuehniella* (Wolf & Kyburg, 1989). Zylberberg (1969) afirma que identificou a presença de dois centríolos apenas em espermátides jovens de *Pieris* e que somente um deles persiste nas espermátides mais maduras. A autora mostra três cortes transversais de espermátides jovens de *Pieris*, e, apenas no primeiro, notam-se dois centríolos alojados em duas distintas depressões nucleares. Como nas três figuras, a situação cromatínica é praticamente a mesma, nós acreditamos que a presença de dois centríolos não seja a situação usual, uma vez que os lepidópteros, como em *Alabama*, também podem produzir espermatozóides com dois flagelos.

Por extensão, concordamos com a generalização de Friedländer & Wahrman (1966), confirmada para *Alabama* e outras espécies de Lepidoptera, sobre a presença de apenas um centríolo em espermátides de insetos. Friedländer & Wahrman (1971) contestam de modo convincente as micrografias apresentadas por Breland *et al.* (1968), afirmando que as 'espermátides' de uma espécie de cada um dos seguintes grupos, Coleoptera,

Diptera, Neuroptera e Blattaria, contendo dois centríolos cada, na verdade são espermatócitos. Alegam que as afirmações de Phillips (1970) sobre as espermatídes de insetos conterem dois centríolos não estão baseadas em observações originais e apresentam correções inequívocas, fundamentando sua assertiva sobre a presença de apenas um centríolo em espermatídes de insetos. Além disso, contestaram as afirmações de Phillips (1970) sobre a total ausência de centríolo nos espermatozóides maduros de insetos, afirmando que observaram a presença de centríolos em espermatozóides maduros de diferentes espécies de Lepidoptera, Neuroptera, Orthoptera e Mantodea. Jamieson (1987a) contesta, afirmando que, como Phillips (195 espécies de insetos de 15 diferentes ordens analisadas), também não encontrou nenhum centríolo em “eu-espermatozóides” maduros da mariposa noctuídea, *Heliothis punctigera*. Em espermatozóides eupirenes de *Alabama* (Medeiros, 1986), nós encontramos estruturas centriolares semelhantes àquelas descritas em espermatídes no presente trabalho, porém entremeadas por material denso.

Quando analisamos e descrevemos os espermatozóides eupirenes de *Alabama* (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988), constatamos que estes não apresentam adjunto do centríolo ou qualquer outra estrutura similar. Até o presente, somente há um registro ultra-estrutural sobre a presença de uma estrutura que poderia ser interpretada como um possível “adjunto do centríolo” em espermatídes eupirenes do Lepidoptera, *P. brassicae* (Zylbergberg, 1969). Esta autora descreve a presença de uma “massa de estrutura periódica” que se apresenta como uma “formação helicoidal que envolve o núcleo e o centríolo” de espermatídes típicas. Esta estrutura exigiria maior investigação posterior para poder vir a ser interpretada ou não como um “adjunto do centríolo”, como também propõe Jamieson (1987a). No presente trabalho, mostramos a presença de um adjunto do centríolo com morfologia totalmente distinta daquele descrito em espermatídes de outros insetos (Phillips, 1970, Baccetti, 1972 - revisões). Verificamos que o adjunto do centríolo se torna gradualmente mais denso, não

persistindo nas espermátides em estágios avançados de maturação. Em *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera), o adjunto do centríolo desaparece mais precocemente, antes mesmo de o núcleo alongar-se (Lino-Neto, 1993). Phillips (1970) também afirmou que 'em algumas espécies de Lepidoptera e em alguns Trichoptera, o adjunto do centríolo desaparece totalmente durante a espermiogênese'. No entanto, a única figura que apresentou para ilustrar sua assertiva, corresponde, de fato, a diferentes alturas de cortes transversais de regiões anteriores de espermatozóides apirenes da mariposa *Crambus* sp.

Quanto à sua natureza química, não há dúvida de que o adjunto do centríolo de insetos é composto principalmente por ribonucleoproteínas (Baccetti, 1972 - revisão). Mais recentemente, utilizando-se o método do E-PTA, foram também detectadas proteínas básicas ricas em lisina no adjunto centriolar de duas Famílias de Orthoptera (Guerra, Carballada & Esponda, 1990).

Quanto à sua origem, admite-se que seja procedente do núcleo (Werner, 1965 - apud Lino-Neto, 1993). Quanto ao papel exercido pelo adjunto do centríolo, admite-se que sirva para fixar o flagelo à cabeça da espermátide (Breland *et al.*, 1966). Já Baccetti (1972) propõe outra função mecânica para o adjunto do centríolo, considerando que o corpúsculo basal de flagelos de espermatozóides de insetos em geral está incluso no mesmo, e que, aparentemente, este segmento seja responsável pelo início do movimento do axonema (Baccetti *et al.*, 1977). Considerando que em espermátides eupirenes de *Alabama*, o adjunto do centríolo já aparece no início do período de alongamento nuclear e somente desaparece em fases muito avançadas da maturação das espermátides, a função mecânica de fixação do axonema flagelar na base nuclear, durante as drásticas transformações sofridas pelo núcleo, é bastante plausível. Ao contrário do observado em espermatozóides do coleóptero *C. sordidus* (Lino-Neto, 1993), nas regiões iniciais dos flagelos de espermatozóides eupirenes de *Alabama*, adjacentes à região posterior do

núcleo, não é encontrado nenhum dos dois derivados mitocondriais (Medeiros, 1986).

2.3. A evolução do Complexo Mitocondrial e os Derivados Mitocondriais

A seqüência de etapas do desenvolvimento do complexo mitocondrial de *Alabama* durante a espermiogênese eupirene, desde sua organização inicial até a sua individualização em dois derivados mitocondriais, assemelha-se àquela descrita detalhadamente por André (1962) para *P. brassicae* e *M. stellatarum*, bem como à de *Murgantia histrionica* (Hemiptera), descrita por Pratt (1968). Entretanto, André (1962) não apresentou nenhuma diferença ultra-estrutural entre a evolução dos “Nebenkernen” eupirene e apirene, afirmando apenas que 'a evolução mitocondrial é totalmente diferente na espermatogênese apirene'. Apesar de extensa e detalhada, a descrição de André é apresentada sobretudo em desenhos esquemáticos; na literatura, somente dois outros trabalhos ultra-estruturais mostram micrografias sobre o “Nebenkern” e seus derivados em Lepidoptera: *Calpodes ethlius* (Lai-Fook, 1982b) e *Heliothis virescens* (LaChance & Olstad, 1988a). O primeiro autor mostrou três fases iniciais do desenvolvimento do “Nebenkern” de *Calpodes*, incluindo o estágio do chamado “Nebenkern-cebola” (André, 1962; Tokuyasu, 1975). Os segundos, que estudaram também a espermiogênese eupirene de uma mariposa da Família Noctuidae, mostraram um único estágio precoce do complexo mitocondrial, que poderia ser interpretado como a fase do “Nebenkern-cebola”, intermediário entre dois estágios muito próximos da evolução do “Nebenkern” de *Alabama*. A formação e o desenvolvimento do complexo mitocondrial em espermátides eupirenes de *Alabama*, aqui relatados, contêm várias fases ainda não descritas para as mariposas noctuídeas, bem como para outras espécies de lepidópteros. Ao que nos consta, estas estruturas também não foram estudadas por criofratura até o momento.

As várias transformações dos derivados mitocondriais durante a espermio gênese eupirene de *Alabama* podem ser comparadas, em termos gerais, àquelas descritas para *H. virescens* (LaChance & Olstad, 1988a). Há similaridades também com as modificações que se passam em *Pieris* e *Macroglossum* (André, 1962) e no hesperídeo *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b). Nós acrescentamos informações ultra-estruturais sobre algumas etapas intermediárias, e os aumentos maiores utilizados nos permitiram descrever com mais detalhes em espermátides eupirenes de *Alabama*, a metamorfose dos derivados mitocondriais e das estruturas microtubulares e membranosas associadas.

Os dois derivados mitocondriais de espermatozóides eupirenes de *Alabama* já foram detalhadamente descritos por nós (Medeiros, 1986). No presente estudo, pudemos acrescentar mais informações a respeito da ultra-estrutura e da metamorfose destas organelas. Verificamos que nenhum dos dois derivados eupirenes desenvolve estrutura de natureza paracristalina na sua matriz; já o derivado maior apresenta evidentes modificações das cristas na sua camada cortical, semelhante ao descrito André (1962).

2.4. O Axonema e as Estruturas Associadas

As fases do desenvolvimento do axonema flagelar eupirene de *Alabama* (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988) são muito similares àquelas descritas para espermátides de *H. virescens* (LaChance & Olstad, 1988a) e seguem, nos seus aspectos globais, o padrão geral de organização axonemático dos flagelos de espermátides da maioria dos insetos, cujos filamentos axiais também apresentam o padrão microtubular do tipo "9 + 9 + 2" (Phillips, 1970; Baccetti, 1972), incluindo a mariposa noctuídea, *Heliothis punctigera* (Jamieson, 1987a). No citoplasma das regiões medianas dos flagelos de espermátides eupirenes de *Alabama*, que se encontram em estágios mais avançados de maturação, notamos a presença de duas pequenas cisternas

laterais, associadas a duas áreas densas na sua superfície próxima do axonema. O mesmo tipo de estrutura foi observada no citoplasma flagelar de espermátides típicas avançadas do hesperídeo *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b) e do noctuídeo e *H. virescens* (LaChance & Olstad, 1988a). Estes últimos autores não mostram a morfologia ultra-estrutural do flagelo de espermatozóides eupirenes de *H. virescens*, e no citoplasma de flagelos de espermatozóides típicos de *Calpodes* (Lai-Fook, 1982b), não pudemos verificar com certeza se esta estrutura é persistente, devido ao aumento utilizado. Esta estrutura persiste no citoplasma flagelar de “eu-espermatozóide” de *H. punctigera* (Jamieson, 1987a), sendo chamada de “corpo acessório” pelo autor, apesar de sua morfologia diferir muito dos chamados “corpos acessórios” típicos de citoplasma flagelar de espermatozóides de outra ordens de insetos, como, por exemplo, Coleoptera (Báo, 1991; Lino-Neto, 1993). Nós verificamos que, em flagelos eupirenes de *Alabama*, as cisternas desaparecem totalmente e, aparentemente, as áreas densas persistem, possivelmente originando as pontes elétron-densas que ligam o axonema á membrana plasmática. Estas pontes densas já haviam sido recentemente observadas em flagelos de espermatozóides eupirenes da borboleta *Pieris brassicae* (Dallai & Afzelius, 1990). Pontes elétron-densas de aspecto similar foram observadas entre o axonema e os derivados mitocondriais de flagelos de espermatozóides de Hemiptera (Dolder, 1988; Báo & De Souza, 1994) e de outras ordens de insetos (Afzelius & Dallai, 1989).

Quando fixamos testículo de imago de *Alabama* com a mistura à base de ácido tânico (Dallai & Afzelius, 1990), observamos que a subestrutura dos microtúbulos axonemáticos de flagelos dos espermatozóides eupirenes é praticamente idêntica àquela mostrada em flagelos eupirenes de *Pieris* pelos mesmos autores.

2.5. Os Apêndices da Superfície Celular

O apêndice reticular de espermatozóides típicos de *Alabama* desenvolve-se na fase do alongamento flagelar, quando o lúmen dos microtúbulos acessórios já está em início de condensação. O mesmo desenvolvimento ocorre também na superfície de flagelos de espermátides eupirenes de *C. ethlius* (Lai-Fook, 1982b) e de *H. virescens* (LaChance & Olstad, 1988a). O surgimento precoce do apêndice reticular torna-se um indicador seguro para a diferenciação entre flagelos de espermátides eupirenes e apirenes, que em fases anteriores são facilmente confundidas. Quando fixamos testículo de imago de *Alabama* em E-PTA e observamos cortes finos sem pós-contratação, verificamos que somente os apêndices reticulares mostram reação positiva, indicando a presença de proteínas básicas, provavelmente ricas em lisina. A variação de forma, volume e posição do apêndice reticular ao longo da superfície dos espermatozóides eupirenes de *Alabama* já foi descrita (Medeiros, 1986).

Os apêndices laciniados da manta radial, que recobre a membrana dos espermatozóides eupirenes de *Alabama* em quase toda sua extensão, somente aparecem em fases quase finais da espermiogênese, como foi observado também em *Calpodes* e em *H. virescens*. A variação de forma, volume, número e disposição destes apêndices ao longo da superfície dos espermatozóides eupirenes também já foi descrita por nós (Medeiros, 1986). Estes apêndices não apresentam reação positiva ao E-PTA. Trabalhos citoquímicos posteriores serão necessários para elucidar sua natureza química.

O papel destes apêndices, reticular e laciniados, permanece desconhecido, mas nós acreditamos que eles participem da organização espacial extremamente regular (Medeiros, 1986), apresentada pelos feixes eupirenes, principalmente nas regiões anteriores dos flagelos.

3. JUNÇÕES INTERCELULARES E BARRREIRA HEMATO-TESTICULAR

Junções semelhantes às do tipo "septada" só foram encontradas entre as espermatídes apirenes de *Alabama* no início da espermiogênese, e nunca nas espermatídes eupirenes em nenhuma fase. Este tipo de junção difere das junções septadas pregueadas ou lisas muito freqüentes entre as células somáticas do envelope cístico de testículo dos insetos em geral, incluindo os Lepidoptera (Szöllösi & Marcaillou, 1977; Jones, 1978; Toshimori, Ivashita & Oura, 1979; Szöllösi, Riemann & Marcaillou, 1980; Szöllösi, 1982; Baldwin, Loeb & Riemann, 1987; Lane *et al.*, 1994 - revisão). Este tipo de junção é mais semelhante às "linker junctions" existentes em células gliais do SNC de *Limulus* (Lane, 1989), e que também foram identificadas em tecidos epiteliais de insetos (Lane *et al.*, 1994). Estas chamadas "linker junctions" não ocluem o espaço intercelular, mas apenas o reduzem (Lane, 1989). Não encontramos registro na literatura da existência de junções semelhantes entre espermatídes apirenes e/ou eupirenes de outros lepidópteros. Admitimos, ainda de modo especulativo, que estas junções sirvam basicamente para manter as espermatídes unidas entre si, sem estabelecer uma barreira entre elas, pois seu desenvolvimento é geralmente sincronizado.

As junções do tipo "desmosoma" observadas entre espermatídes de *Dermatobia hominis* (Quagio-Grassiotto, 1993; Quagio-Grassiotto & Lello, 1996) não foram detectadas entre espermatídes apirenes, nem eupirenes de *Alabama* em nenhuma fase da espermiogênese.

Por outro lado, as extensas junções septadas, associadas a junções do tipo *zonulae adherentes* e junções do tipo "desmosoma pontual" nas células epiteliais dos envelopes císticos, tanto eupirenes quanto apirenes, do testículo de *Alabama* correspondem, em conjunto, à chamada "barreira hemato-testicular". Esta barreira impede a passagem intercelular de moléculas

exógenas, mantendo um ambiente especializado necessário para o desenvolvimento dos clones de células germinativas nos cistos de testículos de insetos. Foi, pela primeira vez, identificada através de MET - cortes finos e uso de marcadores elétron-densos - no testículo do ortóptero *Locusta migratoria* (Szöllösi & Marcaillou, 1977). O termo "barreira hemato-testicular" (BHT), apesar de ser mais apropriado vertebrados, é mantido para explicar o papel funcional básico das junções oclusivas em testículo de insetos, embora Jones (1978) e Szöllösi (1982) prefiram o termo "barreira hemato-célula germinativa". Diversos tipos de junções, que participam da chamada BHT, já foram estudadas em nível ultra-estrutural e por meio de diferentes técnicas (cortes finos, citoquímica, marcadores elétron-densos, criofratura) em outros lepidópteros: *Bombyx mori* (Toshimori, Iwashita & Oura, 1979); *Anagasta* (= *Ephestia*) *küeniella* (Szöllösi, Riemann & Marcaillou, 1980), *Heliothis virescens* (Baldwin, Loeb & Riemann, 1987) e *Mamestra brassicae* (Schweich & Leloup, 1988).

Não conseguimos identificar junções do tipo "tight" (ou oclusivas) em cortes finos de testículo de *Alabama*, como foi observado por Toshimori, Iwashita & Oura (1979) em *B. mori*, mesmo usando solução fixadora de glutaraldeído e ácido tânico (Dallai & Afzelius, 1990). Este fixador permitiu, no entanto, evidenciar outros diversos tipos de junções (tipo "gap", septadas, "zonulae adherentes") no envelope cístico de testículo de *Alabama*. Outros autores também reconheceram a utilidade do ácido tânico para detalhar junções do tipo "gap" (Miranda & Cavicchia, 1986).

Junções do tipo "gap" heterocelulares foram observadas no testículo da mariposa *Anagasta* (= *Ephestia*) *küeniella* (Szöllösi & Marcaillou, 1980) e correspondem ao único tipo de junção encontrada entre espermátides e as células do envelope do cisto naquela espécie., como ocorre também em testículo de *Alabama*. Inclusive, observamos um tipo de "vesícula gap" de perfil anular no citoplasma de espermátides eupirenes em alongamento muito

semelhante àquela identificada no citoplasma do envelope cístico de *Anagasta* (Szöllösi & Marcaillou, 1980).

Resumindo, em *Alabama*, como nos demais Lepidoptera, a "barreira hemato-testicular" situa-se somente no envelope cístico e sua base morfológica é representada principalmente pelas junções septadas. Apesar de não termos detectado, em cortes finos, a presença de junções oclusivas do tipo "tight" no envelope cístico de testículo de *Alabama*, este tipo de união intercelular coexiste com as junções septadas, atuando no isolamento das células germinativas em desenvolvimento nos cistos (Szöllösi, 1982).

4. ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRENES NA VESÍCULA SEMINAL E NO DUCTO EJACULADOR DUPLO

Em estudos anteriores (Medeiros, 1986; Medeiros & Dolder, 1988), havíamos descrito, em cortes ultra-finos, várias modificações dos espermatozóides eupirenes e apirenes de *A. argillacea* que ocorrem em etapas posteriores à sua liberação testicular: (a) durante seu trajeto ao longo do trato genital da imago macho; (b) no espermatóforo, contido na bolsa copuladora; e (c) na espermoteca da imago fêmea. Usando recursos mais recentes de preparação do material e, ainda, de microscopia de varredura, foi possível complementar e estender aqueles dados.

O número de publicações disponíveis sobre os espermatozóides eupirenes e apirenes armazenados na vesícula seminal e no ducto ejaculador duplo do trato genital de imagos de Lepidoptera é reduzido (Riemann, 1970; Riemann & Thorson, 1971; Phillips, 1971; Riemann & Gassner, 1973; Richard, LaChance & Proshold, 1975; LaChance, 1984). Com exceção de Phillips, foram utilizados aumentos baixos a médios na maioria destas publicações. Assim também desconhecemos outros trabalhos em M.E.V. sobre espermatozóides eupirenes e apirenes de Lepidoptera, observados tanto na vesícula seminal quanto no

duplex. A única exceção parece ser a publicação de LaChance (1984) sobre feixes de espermatozoides eupirenes isolados do ducto ejaculador duplo da mariposa noctuïdea *H. virescens*.

Mesmo na revisão de Jamieson (1987a) sobre os espermatozoides de insetos e sua importãncia filogenética, são poucas as suas observações sobre cortes finos de "eu-espermatozoides" e "para-espermatozoides" da mariposa noctuïdea, *Heliothis punctigera*. Não há, também, nenhuma descrição sobre as modificações sofridas pelos dois tipos de espermatozoides desta espécie em ductos genitais de imagos machos; é mostrado apenas um desenho esquemático da ultra-estrutura de um flagelo eupirene na spermateca da imago fêmea de *Heliothis virescens*, outra mariposa noctuïdea (Riemann & Thorson, 1973 - em Jamieson, 1987a).

Usando criofraturas em etanol, observadas através de MEV, foi possível, pela primeira vez, descrever aqui ductos genitais (vesícula seminal e duplex) de imagos de *Alabama*. Através desta técnica, também conseguimos observar alguns feixes eupirenes isolados no duplex, comparando-os com aqueles de *H. virescens* (LaChance, 1984). Há semelhança em relação à região das cabeças, que também são curtas em comparação com a grande extensão flagelar, e quanto ao enrolamento helicoidal das caudas bem justapostas. Porém, os feixes eupirenes de *Alabama* são bem maiores que os de *H. virescens*, além de apresentarem superfície lisa em toda a sua extensão. Quando criofraturados, os feixes eupirenes e os espermatozoides apirenes livres de *Alabama*, tanto na vesícula seminal quanto no duplex, são facilmente identificáveis, acrescentando informações tridimensionais valiosas. Foi possível verificar a disposição espacial (alinhamento) e a concentração dos feixes eupirenes e dos espermatozoides apirenes livres no lúmen, bem como identificar uma certa diversidade do material de secreção intercalado entre os espermatozoides. Por conseguinte, a microscopia de varredura permitiu complementar as observações obtidas por cortes finos, que já são mais bem conhecidas.

RESUMO

A mariposa noctuídea *Alabama argillacea*, praga de algodoeiros, foi criada em laboratório por cinco meses consecutivos. Durante este período, foi possível acompanhar os estágios do seu ciclo biológico por várias gerações sucessivas. Testículo de lagartas de último estágio e de indivíduos dos estágios subsequentes, bem como ductos genitais (vesícula seminal e duplex) de imago macho foram preparados para MET e MEV.

No presente trabalho, descrevemos a ultra-estrutura da espermiogênese dicotômica de *A. argillacea*, bem como as modificações sofridas pelos espermatozoides na vesícula seminal e no ducto ejaculador duplo. São também descritos os tipos de junções que ocorrem entre as células do envelope cístico, entre estas e as espermátides, e entre as espermátides.

Para melhor compreensão da seqüência de eventos característicos da espermiogênese apirene e eupirene de *Alabama*, nós as dividimos em 6 e 10 estágios, respectivamente. Os seis estágios da espermiogênese apirene estão relacionados com os seguintes eventos básicos: a) o deslocamento dos micronúcleos ao longo do flagelo; b) a fusão do material nuclear com o citoplasma e sua eliminação parcial na extremidade posterior dos flagelos; c) a formação e a diferenciação de um capuz denso na extremidade anterior da espermátide, que é ocupada pelo corpúsculo basal; d) a invaginação gradual da extremidade anterior das espermátides no citoplasma da célula cística apical; e) a formação de um complexo mitocondrial ("Nebenkern") e sua diferenciação, no flagelo, em dois longos derivados mitocondriais justapostos, tendo forma, volume, extensão e estrutura muito similares; f) a cristalização de parte da matriz mitocondrial nos dois derivados; g) a modificação do padrão dos túbulos do axonema do flagelo de "9 + 2" para "9 + 9 + 2"; durante esta fase, ocorre

gradual deposição de material denso no lúmen dos microtúbulos acessórios, dos subtúbulos B das duplas periféricas e dos túbulos centrais.

Tratamento com E-PTA mostrou que o lúmen dos microtúbulos acessórios e as regiões paracristalinas da matriz dos derivados mitocondriais de espermatozóides apirenes contêm proteínas básicas e no capuz denso também.

A morfologia do espermatozóide apirene foi analisada através de cortes ultra-finos e de criofraturas para microscopia eletrônica de varredura. Tanto a subestrutura do axonema de espermatozóides apirenes, quanto a dos eupirenes, somente pode ser detalhadamente analisada e descrita com a aplicação do método de Dallai & Afzelius (1990).

A descrição dos eventos morfológicos característicos da espermiogênese eupirene levou em consideração os seguintes aspectos: a) a formação do acrosoma tubular, as transformações nucleares e o alongamento da cabeça das espermátides; b) a formação do complexo mitocondrial ("Nebenkern") e sua diferenciação em dois derivados mitocondriais com forma, volume, extensão e estrutura bem diferentes; c) a transformação do axonema durante o alongamento flagelar; d) o aparecimento, em tempos diferentes, do apêndice reticular e dos apêndices laciniados na periferia das espermátides. A fixação com E-PTA mostrou que, nos flagelos, somente o apêndice reticular reage positivamente, indicando sua natureza protéica de caráter básico. Cortes ultra-finos contrastados de acordo com Afzelius (1992) mostraram a presença de polissacarídeo (glicogênio) no lúmen dos microtúbulos acessórios.

Os feixes eupirenes intratesticulares são ca. de 4 a 5 vezes maiores que os apirenes. As cabeças dos espermatozóides eupirenes são curtas e retas, em comparação com suas longas caudas helicoidais. As imagens de criofratura de testículo de imago para MEV confirmaram os resultados obtidos em cortes finos sobre o número de espermatozóides por cisto (ca. de 256) e a disposição dos flagelos nos cistos eupirenes e nos apirenes.

Também são descritas, em cortes finos e criofraturas para MEV, as modificações ultra-estruturais ocorridas na superfície dos espermatozoides eupirenes e apirenes durante seu trajeto na vesícula seminal e no duplex. Cortes finos destes órgãos, fixados de acordo com o método de Dallai & Afzelius (1990), mostraram com mais detalhes a subestrutura das capas estriadas dos dois tipos de espermatozoides, bem como a subestrutura da massa densa interna e do apêndice reticular remanescente dos espermatozoides eupirenes.

Vários tipos de junções (“desmosoma”, “zonula adherens”, junção septada e do tipo “gap”) foram observados entre as células do envelope de cistos apirenes e eupirenes. Notaram-se, também, uniões semelhantes às septadas existentes nos envelopes císticos entre espermátides apirenes muito jovens. As junções do tipo “gap” são menos frequentes, mas igualmente são vistas entre espermátides e células císticas. Discute-se a participação dos diversos tipos de junções na formação da chamada “barreira hemato-testicular”.

ABSTRACT

The noctuid moth, *Alabama argillacea* is a well known pest of cotton crops, its dissemination representing a menace to the agriculture. Therefore, a thorough knowledge of its reproductive behavior is needed. Developmental stages of the moth were followed in laboratory cultures, for over a period of five months. Testes from late caterpillars and from individuals of more advanced stages, as well as genital ducts of adult males, were excised and prepared for transmission and scanning electron microscopic studies.

The ultrastructure of the dicotomic spermiogenesis of *Alabama argillacea* was described, including the transformations undergone by sperm cells within the seminal vesicle and the ejaculatory duct.

For descriptive purpose, apyrene and eupyrene spermiogenesis have been separated into six and ten stages each, respectively, considering their most characteristic morphologies.

Stages of apyrene spermiogenesis relate to the following events: a) displacement of micronuclei along the flagellum; b) fusioning of nuclear material with the cytoplasm and partial shedding of both together, at the posterior end of the flagellum; c) formation and differentiation of a dense cap at the anterior end of the spermatid, occupied by the basal body; d) gradual invagination of the spermatids' anterior ends in the cystic cells cytoplasm; e) assembly of a mitochondrial complex ("Nebenkern") and its gradual differentiation into two very alike, mitochondrial derivatives within the flagellum; f) partial crystallisation of the matrix within both mitochondrial derivatives; g) gradual assembly of the axonemal complex to form the "9+9+2" arrangement. During this stage, the outermost, accessory microtubules, as well as the B subtubules and the central singlets become dense.

Both the accessory microtubules and the paracrystalline portion of the mitochondrial derivatives contain a basic protein, stainable by ethanolic-phosphotungstic acid.

As regards the eupyrene spermatogenesis, the following events were described: a) formation of a tubular acrosome and elongation of the head of the spermatid, at a time the nucleus undergoes differentiation; b) formation of two mitochondrial derivatives from a "Nebenkern", possessing very unequal characteristics; c) the axoneme also differentiates into the "9+9+2" complex; d) outer laciniate appendages, and a reticular appendage develop at this stage.

Eupyrene sperm bundles are about 4 to 5 times greater than the apyrene ones, as seen in whole mounts (SEM). The heads of eupyrene spermatozoa are short and straight as compared to the long helical tails. The number (circa 256) and the relative arrangement of apyrene and eupyrene sperm cells in a cyst, was clearly demonstrated both in sectioned material and in scanning images of cryo-fractured material.

Delicate ultrastructural details occur along the surfaces of sperm cells during its displacement towards the seminal vesicle and the duplex. Both kinds of cells develop a prominent striation on the outer membrane, well noted following fixation in presence of tannin (Dallai & Afzelius, 1990). This is also true for the reticular appendage of eupyrene sperm.

Several kinds of cell junctions have been described among the wall cells of the eupyrene and apyrene cysts, namely, desmosomes, "zonula adherens", septate junction and a peculiar kind of gap junction. Also a kind of junction that bears some similarity to the septate type of junction was found between young apyrene spermatids. Gap junctions are less frequent, but also occur among spermatids and cystic cells. The various types of junctions are discussed in terms of a so-called "blood-testis barrier".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AFZELIUS, B. A. Microtubules in the spermatids of stick insects. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, v. 98, n. 1, p. 94-102, 1988.

AFZELIUS, B. A. Section staining for electron microscopy using tannic acid as a mordant: a simple method for visualization of glycogen and collagen. *Microsc. Res. Techn.*, v. 21, p. 65-72, 1992.

AFZELIUS, B. A.; DALLAI, R. Connecting bridges between axoneme and other components in the sperm tail of some insects. *J. Morphol.*, v. 202, p. 173-177, 1989.

ANDRÉ, J. Contribution à la connaissance du chondriome. Étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 6, n. 3, p. 1-185, 1962. Supplement 3.

ANDRÉ, J.; THIÉRY, J.P. The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: BACCETTI, B., ed. *Comparative spermatology*. Roma, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, p. 169-181, 1970.

BACCETTI, B. Insect sperm cells. *Adv. Insect Physiol.*, v. 9, p. 315-397, 1972.

* De acordo com a Norma NBR - 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (1989), adaptada pelo Grupo de Estudo de Referências Bibliográficas do DT/SIBI da Universidade de São Paulo.

- BACCETTI, B. Ultrastructure of sperm and its bearing on Arthropod phylogeny. In: *Proc. XV Int. Congr. Entomol.*, p. 609-641, 1977.
- BACCETTI, B. Evolution of the sperm cell. In: METZ, C. B. & MONROY, A., eds. *Biology of fertilization: biology of the sperm*. 1985. v. 2, p. 3-58.
- BACCETTI, B. The spermatozoon of Strepsiptera (Insecta) and its value in the systematic position of the group. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 21, n. 2, p. 397-398, 1989.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. The biology of the sperm cell. *Monogr. Dev. Biol.*, v. 10, p. 1-254, 1976.
- BACCETTI, B.; DACCORDI, M. Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: JOLIVET, P., PETITPIERRE, E. & HSIAO, T. H., eds. *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic, 1988. p. 357-378.
- BACCETTI, B. *et al.* Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J. Cell Biol.*, v. 73, p. 594-600, 1977.
- BALDWIN, K.; LOEB, M. J.; RIEMANN, J. G. A novel occluding function which lacks membrane fusion in insects testis. *Tissue & Cell*, v. 19, n. 3, p. 413-422, 1987.
- BÁO, S. N. Morphogenesis of the flagellum in the spermatids of *Coelomera lanio* (Coleoptera, Chrysomelidae): ultrastructural and cytochemical studies. *Cytobios*, v. 66, p. 157-167, 1991.

- BÁO, S. N.; DE SOUZA, W. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue & Cell*, v. 26, n. 3, p. 299-308, 1994.
- BÁO, S. N.; HAMÚ, C. Nuclear changes during spermiogenesis in two chrysomelidae beetles. *Tissue & Cell*, v. 25, n. 3, p. 439-445, 1993.
- BÁO, S. N. *et al.* Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon: some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. *J. Struct. Biol.*, v. 109, n. 1, p. 46-51, 1992.
- BAWA, S. R. Electron microscope study of spermiogenesis in firebrat insect, *Thermobia domestica* Pack. I. Mature spermatozoon. *J. Cell Biol.*, v. 23, pp. 431-446, 1964.
- BLOOM, F. E.; AGHAJANIAN, G. K. Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 22, p. 361-375, 1968.
- BOURGOGNE, J. Ordre de lépidoptères. In: GRASSÉ, P. P. *Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie*. Paris, Masson, 1951. v. X, p. 174 - 448.
- BRELAND, O. P. *et al.* Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis and the mature sperm of insects. *Can. J. Genet. Cytol.*, v. 8, p. 759-773, 1966.
- BRELAND, O. P. *et al.* Centrioles in the spermatids of insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 61, n. 4, p. 1037-1039, 1968.

- CARLSON, J. G.; HANDEL, M. A. Intercellular bridges and factors determining their patterns in the grasshopper testis. *J. Morphol.*, v. 196, n. 2, p. 173-186, 1988.
- CHASE, J. A.; GILLILAND, F. R. Testicular development in the tobacco budworm. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 65, p. 901-906, 1972.
- CHAUDHURY, M. F. B.; RAUN, E. S. Spermatogenesis and testicular development of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyraustidae). *Ann. Ent. Soc. Am.*, v. 59, n. 6, p. 1157-1159, 1966.
- CHEN, G. T.; GRAVES, J. B. Spermatogenesis of the tobacco budworm. *Ann. Ent. Soc. Am.*, v. 63, n. 4, p. 1095-1104, 1970.
- CORSATTO-ALVARENGA, L. B. F. Estudos sobre a espermatogênese nos Lepidoptera *Dione juno* (Cramer, 1779) e *Methona themisto* (Hübner, 1818). São Paulo, 1989. 122 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
- CORSATTO-ALVARENGA, L. B. F.; CESTARI, A. N.; RIBEIRO, A. F. Eupyrene and apyrene spermatogenesis in *Methona themisto* (Lepidoptera: Ithomidae). *Rev. Bras. Genet.*, v. 10, n. 4, p. 655-672, 1987.
- CRUZ-LANDIM, C. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Myogrillus* sp. (Orthoptera, Grillidae). *Rev. Brasil. Biol.*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1979b.

- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, v. 27, p. 167-175, 1980.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J. Struct. Biol.*, v. 103, p. 164-179, 1990.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Axonemal structure and insect phylogeny. *Boll. Zool.*, v. 60, p. 423-429, 1993a.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Development of the accessory tubules of insect sperm flagella. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 25, n. 4, p. 499-504, 1993b.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: JAMIESON, B. G. M.; AUSIÓ, J.; JUSTINE, J.-L. (eds.) Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, v. 166, p. 301-310, 1995.
- DALLAI, R. *et al.* The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetic considerations. *Zool. Scripta*, v. 22, p. 193-202, 1993.
- DOLDER, H. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, v. 101, n. 2/3, p. 159-164, 1988.

- FAIN-MAUREL, M. A. Acquisitions récentes sur les spermatogénèses atypiques. *Ann. Biol.*, v. 5, n. 11/12, p. 513-564, 1966.
- FRIEDLÄNDER, M. The role of transient perinuclear microtubules during spermiogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. *J. Submicrosc. Cytol.*, v. 8, p. 319-326, 1976.
- FRIEDLÄNDER, M. Phylogenetic branching of Trichoptera and Lepidoptera: an ultrastructural analysis on comparative spermatology. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 83, n. 2, p. 141-147, 1983.
- FRIEDLÄNDER, M.; GERSHON, J. Reaction of surface lamella of moth spermatozoa to vinblastine. *J. Cell Sci.*, v. 30, p. 353-361, 1978.
- FRIEDLÄNDER, M.; GITAY, H. The fate of the normal-anucleated spermatozoa in inseminated females of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Morphol.*, v. 138, n. 1, p. 121-130, 1972.
- FRIEDLÄNDER, M.; MIESEL, S. Spermatid anucleation during the normal atypical spermatogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. *J. Submicrosc. Cytol.*, v. 9, p. 173-185, 1977.
- FRIEDLÄNDER, M.; WAHRMAN, J. Giant centrioles in neuropteran meiosis. *J. Cell Sci.*, v. 1, p. 129-144, 1966.
- FRIEDLÄNDER, M.; WAHRMAN, J. The spindle as a basal body distributor. A study in the meiosis of the male silkworm moth, *Bombyx mori*. *J. Cell Sci.*, v. 7, p. 65-89, 1970.

FRIEDLÄNDER, M.; WAHRMAN, J. The number of centrioles in insect sperm. A study in two kinds of differentiating silkworm spermatids. *J. Morphol.*, v. 134, p. 383-387, 1971.

GAMA, V. *et al.* Ultraestrutura da espermiogênese e do espermatozóide de *Enallagma cheliferum* Selys, 1875 (Coenagrionidae: Odonata). *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, v. 48, n. 2, p 313-324, 1976.

GARBINI, C. D.; IMBERSKI, R. B. Spermatogenesis in *Ephestia kühniella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, v. 96, p. 189-203, 1977.

GELBIC, I.; METWALLY, M. M. Changes in the development of male germinal cells in *Spodoptera littoralis* caused by the effects of juvenoids (Lepidoptera, Noctuidae). *Acta Ent. Bohemoslov.*, v. 78, n. 1, p. 10-17, 1981.

GUERRA, R.; CARBALLADA, R.; ESPONDA, P. Comparative analysis of the neck region in spermatids and spermatozoa of some orthopteran insects. *J. Morphol.*, v. 204, p. 313-321, 1990.

HABIB, M. E. M. Estudos biológicos e anatômicos sobre *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). Campinas, 1976. 117p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

HABIB, M. E. M. Contribution to the biology of the american cotton leafworm *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepid. Noctuidae) *Z. Ang. Ent.*, v. 84, p. 412-418, 1977.

- HANNAH-ALAVA, A. The premeiotic stages of spermatogenesis. *Adv. Genet.*, v. 13, p. 157-226, 1965.
- HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 24, p. 6-32, 1968.
- HOGGE, M. A. F.; KING, P. E. The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Submicrosc. Cytol.*, v. 7, p. 81-96, 1975.
- HOLT, G. G.; NORTH, D. T. Spermatogenesis in the cabbage looper *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae). *Ann. Ent. Soc. Am.*, v. 63, p. 501-507, 1970.
- HUMPHREYS, W. J.; SPURLOCK, B.O.; JOHNSON, J. S. Critical point drying of ethanol infiltrated, cryofractured biological specimens for scanning electron microscopy. SEM/1974, Part I, ITT Res. Inst., Chicago, p. 275-282, 1974.
- JAMIESON, B. G. M. *The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. Cambridge, Cambridge University, 1987a. 320 p.
- JAMIESON, B. G. M. A biological classification of sperm types, with special reference to annelids and molluscs, and an example of spermiocladistics. In: *New horizons in sperm cell research*. MOHRI, H., ed. Tokyo, Japan Sci. Soc., New York, Breach, 1987b. p. 311-332.

- JAMIESON, B. G. M.; AUSIÓ, J.; JUSTINE, J.-L. Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, v. 166, 1995. 564 pp.
- JONES, R. T. The blood/germ cell barrier in male *Schistocerca gregaria*: the time of its establishment and factors affecting its formation. *J. Cell Sci.*, v. 31, p. 145-163, 1978.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, v. 27, p. 137a-138b, 1965.
- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) I. The intratesticular behavior of the spermatozoa at various stages from the 5th-instar to the adult. *Appl. Ent. Zool.*, v. 12, n. 2, p. 142-153, 1977a.
- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) III. The post-testicular behavior of the spermatozoa at various stages from pupa to the adult. *Appl. Ent. Zool.*, v. 12, n.3, p. 241-247, 1977b.
- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae) V. The factor related to the separation of eupyrene sperm bundles. *Appl. Ent. Zool.*, v. 12, n. 4, p. 370-371, 1977c.

- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) VII. The motility of sperm bundles and spermatozoa in the reproductive organs of males and females. *Appl. Ent. Zool.*, v. 13, n. 2, p. 91-96, 1978a.
- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) VIII. The length of spermatozoa. *Appl. Ent. Zool.*, v. 13, n. 2, p. 127-129, 1978b.
- KATSUNO, S. Time of differentiation and determination of eupyrene and apyrene spermatozoa and resulting spermatogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, v. 22, n. 1, p. 13-18, 1987.
- KAYE, J. S. The fine structure of flagella in spermatids of the house cricket. *J. Cell Sci.*, v. 22, n. 3, p. 710-714, 1964.
- KAYE, J. S. The fine structure and arrangement of microcylinders in the lumina of flagellar fibers in cricket spermatids. *J. Cell Biol.*, v. 45, p. 416-430, 1970.
- KESSEL, R. G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 16, p. 293-304, 1966.
- KESSEL, R. G. An electron microscope study of spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of microtubular systems during differentiation. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 18, pp. 677-694, 1967.

- KING, R. C.; AKAI, H. Spermatogenesis in *Bombyx mori*. I. The canal system joining sister spermatocytes. *J. Morphol.*, v. 134, p. 47-56, 1971.
- KING, R. C.; CASSIDY, J. D.; ROUSSET, A. The formation of clones of interconnected cells during gametogenesis in insects. In: KING R. C. & AKAI H. eds. *Insect ultrastructure*, v. 1, New York, Plenum, p. 3 - 31, 1982.
- KRISHAN, A.; BUCK, R. C. Ultrastructure of cell division in insect spermatogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 13, p. 444 - 458, 1965.
- LACHANCE, L. E. Hybrid sterility: eupyrene sperm production and abnormalities in the backcross generations of interspecific hybrids between *Heliothis subflexa* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 77, p. 93 - 101, 1984.
- LACHANCE, L. E.; OLSTAD, G. Spermiogenesis of eupyrene sperm in prepupae, pupae, and adults of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): an ultrastructural study. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 81, n. 2, p. 292 - 300, 1988a.
- LACHANCE, L. E.; OLSTAD, G. Spermiogenesis of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae): an ultrastructural study of eupyrene sperm in sterile backcross males. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1988b.
- LAI-FOOK, J. Testicular development and spermatogenesis in *Calpodetes ethlius* Stoll (Hesperiidae, Lepidoptera). *Can. J. Zool.*, v. 60, p. 1171 - 1171, 1982a.

- LAI-FOOK, J. Structural comparison between eupyrene and apyrene spermiogenesis in *Calpodex ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). *Can. J. Zool.*, v. 60, p. 1216 - 1230, 1982b.
- LANE, N. J. Insect intercellular junctions: their structure and development. In: KING, R. C. & AKAI, H. eds. *Insect ultrastructure*. v. 1, New York, Plenum Press, 1982. p. 401 - 433.
- LANE, N. J. Novel arthropod cell junctions with restrictive intercellular 'linkers'. *J. Neurocytol.*, v. 18, p. 661 - 669, 1989.
- LANE, N. J. *et al.* Electron microscopic structure and evolution of epithelial junctions. In: CITI, S. ed.. *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: from development to disease*. R. G. Landes, Biomedical Publishing, 1994. Cap. 2, p. 23 - 43.
- LEVIATAN, R.; FRIEDLÄNDER, M. The eupyrene-apyrene dichotomous spermatogenesis of Lepidoptera. I. The relationship with postembryonic development and the role of the decline in juvenile hormone titer toward pupation. *Develop. Biol.*, v. 68, p. 515-524, 1979.
- LINO NETO, J. Estudo ultraestrutural da espermiogênese e dos espermatozoides de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Campinas, 1993. 62 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- MANDELBAUM, I. Intercellular bridges and the fusome in the germ cells of the Cecropia moth. *J. Morphol.*, v. 166, p. 37-50, 1980.

- MARCAILLOU, C.; SZÖLLÖSI, A. Variation du permeabilité du follicule testiculaire chez le criquet *Locusta migratoria* au cours du dernier stade larvaire. *C. R. Acad. Sc. Paris*, v. 281, p. 2001-2004, 1975.
- MARCHANT, H. J.; THOMAS, D. P. Polylysine as an adhesive for the attachment of nanoplankton to substrates for electron microscopy. *J. Microsc.*, v. 131, p. 127-129, 1983.
- MAREC, F. *et al.* Visualization of polyfusomes in gonads of a moth, *Ephestia kueniella* Z. (Lepidoptera: Pyralidae), by microspreading technique and electron microscopy. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 22, n. 5, p. 487-496, 1993.
- MEDEIROS, M. Caracterização ultra-estrutural de espermatozóides eupirenes e apirenes de *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) ao nível do testículo e das vias genitais das imagos macho e fêmea até a espermateca. Campinas, 1986. 12 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- MEDEIROS, M.; DOLDER, H. Ultrastructural characterization of eupyrene and apyrene spermatozoa of *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), from testis to the genital ducts of male and female moths. *Biotemas*, v. 1, n. 1, p. 99-102, 1988.
- MEDEIROS, M.; SILVEIRA, M. Análise citoquímica ultra-estrutural de espermatozóides de imagos de *Alabama argillacea*, tratados com ácido fosfotúngstico etanólico. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 7., Curitiba, 1993. *Anais*, p.110.

- MEDEIROS, M.; SILVEIRA, M. Ultrastructural study of apyrene spermatozoa of *Alabama argillacea* (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae) with tannic acid containing fixative. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v.28, n.1, p. 133 - 140, 1996.
- MEDEIROS, M.; SILVEIRA, M. Transmission and scanning ultrastructural study of the two normal extratesticular sperm types from the noctuid moth *Alabama argillacea*. *Acta Microscopica*, v. 6, p. 258-259, 1997. Supplement B.
- MEDEIROS, M.; SILVEIRA, M.; DOLDER, H. Ultrastructure of eupyrene spermatids in young moths of *Alabama argillacea*. In: Congreso Atlántico de Microscopía Electrónica, 1., Venezuela, 1992. *Proceedings*, Universidad de Los Andes, 1992. p. 94-95.
- MIRANDA, J. C.; CAVICCHIA, J.C. A permeability barrier in the testis of an insect *Triatoma*: a freeze-fracture and lanthanum tracer study. *Tissue & Cell*, v. 18, n. 3, p. 461-468, 1986.
- NOIROT-TIMOTHÉE C.; NOIROT, C. Jonctions et contacts intercellulaires chez les insectes I. Les jonctions septées. *J. Microscopie*, v. 17, p. 169-184, 1973.
- OSANAI, M.; KASUGA, H.; AIGAKI, T. Physiological role of apyrene spermatozoa of *Bombyx mori*. *Experientia* (Basel), v. 43, n. 6, p. 593-596, 1987.
- PARRA, J. R. P. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. Piracicaba, FEALQ, 1992. 161 p.

- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, v. 44, p. 243-277, 1970.
- PHILLIPS, D. M. Morphogenesis of the laciniate appendages of lepidopteran spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 34, p. 567-585, 1971.
- PHILLIPS, D. M. *Spermiogenesis*. New York, Academic Press, 1974. 68p.
- PRATT, S. A. An electron microscope study of nebenkern formation and differentiation in spermatids of *Murgantia histrionica* (Hemiptera, Pentatomidae). *J. Morphol.*, v. 126, p. 31-66, 1968.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Citodiferenciação ultra-estrutural durante a espermiogênese normal de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Campinas, 1983. 93p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Espermatogênese em *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). Aspectos ultra-estruturais. Botucatu, 1993. 135 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; LELLO, E. Cytoplasmic bridges, intercellular junctions, and individualization of germ cells during spermatogenesis in *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). *J. Morphol.*, v. 227, p. 145-154, 1996.
- RETNAKARAN, A. The male reproductive system of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). I. Spermatogenesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 63, n. 3, p. 851-859, 1970.

- RICHARD, R. D.; LACHANCE, L. E.; PROSHOLD, F. I. An structural study of sperm in sterile hybrids from crosses of *Heliothis virescens* and *Heliothis subflexa*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 68, n. 1, p. 35-39, 1975.
- RIEMANN, J. G. Metamorphosis of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during passage from the testes to the female spermatheca. In: BACCETTI B., ed. *Comparative spermatology*. Roma, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970. p. 321-331.
- RIEMANN, J. G.; GASSNER, G. Ultrastructure of lepidopteran sperm within spermathecae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 66, n. 1, p. 154-159, 1973.
- RIEMANN, J. G.; THORSON, B.J. Sperm maturation in the male and female genital tracts of *Anagasta kuhniella* (Lepidoptera: Pyralididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 1, pp. 11-19, 1971.
- SCHWEICH, P.; LELOUP, A. M. Barrières de perméabilité testiculaires chez *Mamestra brassicae* (Lépidoptère Noctuidé). *Annls. Soc. R. Zool. Belg.*, v. 118, n. 1, p. 29-40, 1988.
- SHEN, S. K.; BERRYMAN, A. A. The male reproductive system and spermatogenesis of the european pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Lepidoptera: Olethreutidae), with observations on the effects of gamma irradiation. *Ann. Ent. Soc. Am.*, v. 60, n. 4, p. 767-774, 1967.
- SILBERGLIED, R. E.; SHEPHERD, J. G.; DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Nat.*, v. 123, p. 255-265, 1984.

- SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, v. 70, p. 608-621, 1976.
- SONNENSCHNEIN, M.; HÄUSER, C. L. Presence of only eupyrene spermatozoa in adult males of the genus *Micropterix* Hübner and its phylogenetic significance (Lepidoptera: Zeugloptera, Micropterigidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, v. 19, n. 5/6, p. 269-276, 1990.
- SRIDEVI, R.; DUTTA-GUPTA, A.; RAMAMURTY, P. S. Spermatogenesis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomon.*, v. 14, n. 1/2, p. 1-10, 1989.
- STANLEY, H. P. *et al.* Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 41, p. 433-466, 1972.
- SZÖLLÖSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera). *J. Ultrastruct. Res.*, v. 50, p. 322-346, 1975.
- SZÖLLÖSI, A. Relationships between germ and somatic cells in the testis of locusts and moths. In: KING R. C. & AKAI H., eds. *Insect ultrastructure*. New York, Plenum, v. 1, p. 32-60, 1982.
- SZÖLLÖSI, A.; MARCAILLOU, C. Electron microscope study of the blood-testis barrier in an insect: *Locusta migratoria*. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 59, n. 2, p. 158-172, 1977.

- SZÖLLÖSI, A.; MARCAILLOU, C. Gap junctions between germ and somatic cells in the testis of the moth, *Anagasta kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Cell Tissue Res.*, v. 213, p. 137-147, 1980.
- SZÖLLÖSI, A.; RIEMANN, J.; MARCAILLOU, C. Localization of the blood-testis barrier in the testis of the moth, *Anagasta kuehniella*. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 72, p. 189-199, 1980.
- TANAKA, K. High resolution scanning electron microscopy of the cell. *Biol. Cell*, v. 65, p. 89-98, 1989.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 48, p. 284-303, 1974.
- TOKUYASU, K. T. Dynamics of *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of "onion" nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 53, p. 93-112, 1975.
- TOSHIMORI, D.; IWASHITA, T.; OURA, C. Cell junctions in the cyst envelope in the silkworm testis, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res.*, v. 202, p. 63-74, 1979.
- TSCHUDI-REIN, K.; BENZ, G. Mechanisms of sperm transfer in female *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 83, n. 6, p. 1158-1164, 1990.
- VIRKKI, N. Gametogenesis in the sugarcane borer moth *Diatrea saccharalis* (F.) (Crambidae). *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, v. 47, p. 102-137, 1963.

- VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. *Z. Zellforsch.*, v. 101, p. 13-27, 1969.
- VIRKKI, N. Evolution of sperm cell number per bundle in insects. *An. Escuela Nac. Cien. Biol.*, v. 20, n. 1-4, p.23-34, 1973.
- WILKINSON, R. F.; STANLEY, H. P.; BOWMAN, J. The effect of vinblastine on spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: evidence for two functional classes of cytoplasmic microtubules. *J. Ultrastruct. Res.*, v. 53, p. 354-365, 1975.
- WITMAN, G. B.; CARLSON, K.; ROSENBAUM, T. L. *Chlamydomonas* flagella. II. The distribution of tubulins 1 and 2 in the outer doublet microtubules. *J. Cell Biol.*, v. 54, p. 540-555, 1972.
- WOLF, K. W. Sheated nuclear division in primary spermatocytes of *Orgyia antiqua* (Lepidoptera, Insecta). *ByoSystems*, v. 24, p. 5-15, 1990a.
- WOLF, K. W. Mitotic and meiotic spindles from two insect orders, lepidoptera and Diptera, differ in terms of microtubule and membrane content. *J. Cell Sci.*, v. 97, p. 91-100, 1990b.
- WOLF, K. W. Spindle membranes and microtubules are coordinately reduced in apyrene relative to eupyrene spermatocytes of *Inachis io* (Lepidoptera, Nymphalidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 24, n. 3, p. 381-394, 1992.
- WOLF, K. W. Centrosome structure is very similar in eupyrene and apyrene spermatocytes of *Ephestia kuehniella* (Pyrilidae, Lepidoptera, Insecta). *Invert. Reproduct. Develop.*, v. 31, n. 1-3, p. 39-46, 1997.

- WOLF, K. W.; BASTMEYER, M. Double spermatogenesis in Lepidoptera: strain-specific differences in the apyrene meiosis of *Ephestia kuehniella* Z. In: HOSHI, M. & YAMASHITA, O. eds. *Advances in invertebrate reproduction*, v. 5, 1990. p. 523-529.
- WOLF, K. W.; BASTMEYER, M. Citology of Lepidoptera. V. The microtubule cytoskeleton in eupyrene spermatocytes of *Ephestia kuehniella* (Pyralidae), *Inachis io* (Nymphalidae) and *Orgyia antiqua* (Lymantriidae). *Eur. J. Cell Biol.*, v. 55, p. 225-237, 1991a.
- WOLF, K. W.; BASTMEYER, M. Citology of Lepidoptera. VI. Immunolocalization of microtubules in detergent-extracted apyrene spermatocytes of *Ephestia kuehniella* Z. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 55, p. 238-247, 1991b.
- WOLF, K.W.; KYBURG, J. The restructuring of the flagellar base and the flagellar necklace during spermatogenesis of *Ephestia kuehniella* (Pyralidae, Lepidoptera). *Cell Tissue Res.*, v. 256, p. 77-86, 1989.
- WOLF, K. W.; TRAUT, W. Ultrastructure of distal flagellar swellings in spermatocytes and spermatids of *Ephestia kuehniella* Z. (Pyralidae, Lepidoptera). *Cell Tissue Res.*, v. 250, p. 421-424, 1987.
- WOLF, K. W.; TRAUT, W. Citology of Lepidoptera. VII. The restructuring of eupyrene prophase I spermatocytes and its relationship to meiotic chromosome and spindle organization in *Ephestia kuehniella* Z. *Protoplasma*, v. 165, p.51-63, 1991.

- WOLF, K. W.; BAUMGART, K.; TRAUT., W. Cytology of Lepidoptera. II. Fine structure of eupyrene and apyrene primary spermatocytes in *Orgyia thyellina*. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 44, p. 57-67, 1987.
- WOLF, K. W.; BAUMGART, K.; TRAUT, W. Cytology of Lepidoptera: III. Giant cysts: a morphological trait of apyrene spermatogenesis in an *Ephestia kuehniella* strain. *Gamete Res.*, v. 20, n .3, p. 353-364, 1988.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Differential analysis by various staining techniques of structures present in developing spermatids of the silkworm. *Nature*, v. 204, n. 4964, p.1197-1198, 1964a.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XIII. Formation of a tubular structure and two bands in the developing spermatid of the silkworm *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, v. 64, p. 210-226, 1964b.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XIV. The fine structure of the clear band and tubular structure in late stages of development of spermatids of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, v. 66, p. 182-196, 1965a.
- YASUZUMI, G.; OURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XV. The fine structure of the middle piece in the developing spermatid of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, v. 67, p. 502-520, 1965b.

YASUZUMI, G. *et al.* Spermiogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XX. Relationship between chromatoid bodies and centriole adjunct in spermatids of the grasshopper, *Acrida lata*. *Z. Zellforsch.*, v. 110, p. 231-242, 1970.

ZYLBERBERG, L. Contribution a l'étude de la double spermatogenèse chez un lépidoptère (*Pieris brassicae* L., Pieridae). *Ann. Sci. Nat. Zool.*, v. 11, p. 569-626, 1969.