

NAZARIO DE SOUZA MESSIAS JR.



ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DA ESPERMIOGÊNESE
DE *Chrysomya megacephala* FAB
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em Ciências na área de
Biologia Celular.

Ref 9120930

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Bolder

Campinas - 1990

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pelo candidato Nazário de Souza
Jr. e aprovada pela comissão julgadora
J. Bolder 24/10/90

M563a

13165/BC

UNICAMP

NAZARIO DE SOUZA MESSIAS JR.



ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DA ESPERMIOGÊNESE
DE *Chrysomya megacephala* FAB
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção do
título de Mestre em Ciências na área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Campinas - 1990

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pelo candidato Nazário de Souza
e Jr. e aprovada pela comissão julgadora.
H. Dolder 24/10/90

M563a

13165/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho a memoria
de minha mãe Carmen, a quem
devo tudo o que obtive ate
aqui.

Ofereço este trabalho aos amigos
Marco (Ski) Randi e Ana Paula M.
de Lima pela convivência e pela
saúde que fica.

"Mas foi bela nossa procura... mesmo com tanta ilusão
perdida. Quebrada. Mesmo com tanto caco de sonho,
onde até hoje a gente se corta"

Alex Polari, in A. Sirkis - "Os Carbonários"

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, orientadora do programa de mestrado, pela amizade;

Aos membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado, Prof. Dr. Angelo Luiz Cortellazo e Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano (UNESP - Rio Claro) pela "banca informal", extremamente útil;

A Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Hoffling, coordenadora do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP e respectivos funcionários pela cooperação indispensável;

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, do Depto. de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela cooperação fundamental no fornecimento dos espécimens utilizados. Igualmente agradeço o colega Odair Benedito Ribeiro e a funcionária Lilian Ziti, pela cooperação desinteressada no uso correto dos espécimens utilizados;

ANEXO

Agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a UNICAMP (Bolsa de Incentivo Acadêmico), pela concessão de Bolsas de manutenção.

Ao amigo Prof. Sebastião Roberto Taboa (Sebaka) pela
cooperação nas etapas finais do trabalho;

Ao Prof. Hernandes Faustino de Carvalho, pela
competente revisão e edição do texto;

Aos Professores do Depto. de Biologia Celular da
UNICAMP pelas informações transmitidas;

Aos funcionários do Depto. de Biologia Celular da
UNICAMP, especialmente às secretárias Lillian e Cidinha pela
cooperação fundamental e

A todos que contribuíram de alguma forma na consecussão
deste trabalho

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais.....	1
1.2. Problemática do trabalho.....	10
1.3. Objetivos.....	13

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Espécimens.....	14
2.2. Condições de manutenção dos espécimens no laboratório.....	14
2.3. Remoção dos testículos.....	15
2.4. Processamento do material e procedimento básico de fixação.....	15
2.5. Variantes no sistema de fixação.....	17
2.6. Corte e observação.....	18

3. RESULTADOS

3.1. Aspectos macroscópicos da gônada.....	19
3.2. Ultra-estrutura da parede da gônada.....	20
3.3. Ultra-estrutura dos cistos.....	21
3.4. Aspectos da maturação dos cistos.....	21
3.5. Ultra-estrutura dos espermatócitos.....	22
3.6. Estádios da diferenciação das espermátides.....	24
3.7. Eventos específicos da citodiferenciação.....	29
3.7.1. A formação do acrossomo.....	29
3.7.2. As transformações nucleares.....	30
3.7.2.1. A compactação cromatínica.....	30
3.7.2.2. Modificações do formato nuclear.....	31
3.7.3. A formação do flagelo.....	33
3.7.3.1. O complexo mitocondrial e os derivados mitocondriais.....	33

3.7.3.2. A formação do axonema.....	34
3.7.3.3. Membranas lisas do flagelo.....	36
3.8. Pontes citoplasmáticas.....	36
3.9. Espermiogênese atípica.....	36
3.10. Espermátides aberrantes.....	37
3.11. Figuras.....	38
 4. DISCUSSÃO.....	
4.1. A ultra-estrutura da parede da gônada.....	61
4.2. Os cistos.....	62
4.3. Dinâmica de maturação dos cistos.....	64
4.4. Os espermátócitos.....	64
4.5. Estádios da espermiogênese.....	68
4.6. Eventos específicos da citodiferenciação.....	69
4.6.1. A formação do acrossomo.....	69
4.6.2. As transformações nucleares.....	71
4.6.2.1. A compactação cromatínica.....	71
4.6.2.2. O nucléolo.....	73
4.6.2.3. Modificações do formato nuclear.....	74
4.7. A formação do flagelo.....	78
4.7.1. O complexo mitocondrial e os derivados mitocondriais.....	78
4.7.2. O adjunto do centríolo e a formação do axonema.....	80
4.7.3. Membranas lisas da cauda.....	83
4.8. Pontes citoplasmáticas.....	85
4.9. Espermiogênese atípica.....	86
4.10. Figuras aberrantes e de absorção.....	87
 5. CONCLUSÕES.....	89
 6. RESUMO.....	93
 7. ABSTRACT.....	94
 8. REFERÊNCIAS.....	95

INTRODUÇÃO

1. 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Espermatogênese é o fenômeno de transformação das células primordiais, as espermatogônias, em células altamente diferenciadas, os espermatozóides. Os espermatozóides são células haplóides, sendo necessária, portanto, a ocorrência de uma divisão meiótica durante a espermatogênese. A espermatogênese pode ser dividida em três grandes fases a saber: (1) a espermatocitogênese, onde as espermatogônias originam os espermatócitos primários por divisão mitótica; (2) a meiose, quando os espermatócitos primários dão origem aos espermatócitos secundários e subsequentemente às espermátides e (3) a espermiogênese, na qual as espermátides sofrerão

drásticas transformações até se tornarem células maduras.

A espermiogênese é, portanto, o fenômeno específico da diferenciação da espermatíde (BLOOM & FAWCETT, 1986).

Com efeito, sob abordagem ultra-estrutural, a espermiogênese é rica em modificações estruturais notáveis, muitas destas, inclusive, semelhantes às que ocorrem em outros exemplos de diferenciação celular.

O gameta masculino nas espécies animais, independentemente das diferenças inter-específicas, é uma célula altamente diferenciada e apta à fecundação. Possui estruturas celulares que lhes são exclusivas e é, na maioria das espécies, uma célula móvel (PHILLIPS, 1974a).

Nos vertebrados, os trabalhos abordando aspectos ultra-estruturais da espermatogênese e especificamente a estrutura do espermatozóide perfazem uma literatura vasta e sempre crescente. Atestam esta observação muitos trabalhos, entre os quais, em sequência filogenética o de SPRANDO & RUSSEL (1988), que investigaram aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Rana catesbeiana*, enfatizando a mudança de volume celular e eliminação citoplasmática; de TABOGA (1990), que investigou a organização da gônada e os aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Hyla hanky*; de BILLARD (1984), que abordou aspectos da ultra-estrutura de espermatogônias e espermatócitos do peixe "guppy"; de PHILLIPS et alii (1987), que relacionaram a compactação cromatínica com as

transformações nucleares em *Grus vipio* (uma espécie de grou); de XIA et alii (1986), que investigaram a evolução do retículo endoplasmático durante a espermiogênese do galo doméstico; de KONDO et alii (1988), que investigaram a aquisição de uma forma helicoidal pelo núcleo da espermátide de uma espécie de tentilhão; de LORA-LAMIA et alii (1986), que estudaram a distribuição de actina em espermatozóides de várias espécies de mamíferos; de CLERMONT & TANG (1985) e de RUSSEL et alii (1986) que analisaram respectivamente a síntese de glicoproteínas e os aspectos do cito-esqueleto durante a espermiogênese do rato; de MIRRE & KNIBIEHLER (1985), que observaram aspectos ultra-estruturais do nucléolo durante a espermiogênese de camundongo; de HALENDA et alii (1987), que estudaram o comportamento dos microfilamentos durante a formação do acrosso do espermátide do porquinho da índia; e de ESCALIER (1984), que investigou aspectos da matriz citoplasmática do espermatozóide humano.

A espermiogênese é particularmente bem documentada nos roedores de interesse laboratorial (DYM, 1981) e no homem (HOLSTEIN, 1976).

Em invertebrados, os estudos ultra-estruturais da espermiogênese têm igualmente merecido atenção, como atestam as investigações de PAPATHANASSIOU & KING (1984), que se voltaram ao estudo da espermiogênese do camarão *Palaemon serratus*; de WITALINSKI & AFZELIUS (1987), que estudaram aspectos ultra-estruturais das gônadas e das

células germinativas, bem como da compactação cromatínica da espermatíde do ácaro *Sarcoptes scabiei*; de ROUSE & JAMIESON (1987), que estudaram a ultra-estrutura do espermatozóide de poliquetas e de ARSENAULT (1984), que investigou as alterações que ocorrem a nível de envelope nuclear durante a espermiogênese do camarão *Crangon septemspinosa*.

Em 1974, YASUZUMI apresentou uma revisão enfocando os aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de várias espécies animais que haviam sido publicados até aquela data.

O interesse sempre crescente dos pesquisadores pelo conhecimento das transformações que ocorrem na espermatogênese e, especificamente, na espermiogênese, reside no fato desta ser um modelo de diferenciação celular por excelência. Além disto, sendo a espermiogênese um evento independente da embriogênese e estando na dependência da maturidade sexual do animal, o material a ser estudado é geralmente obtido de indivíduos adultos, o que de certa forma facilita as investigações.

Em insetos, o estudo de aspectos ultra-estruturais da espermiogênese e do espermatozóide formado tiveram início já há muito tempo, praticamente desde a otimização dos métodos de microscopia eletrônica para material biológico (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972).

Dos estudos já realizados, sabe-se que a espermiogênese dos insetos é cística. No início da

espermiogênese, encontra-se em cada cisto um grupo de espermatídes originadas de uma única célula tronco. Este grupo de espermatídes está envolvido por uma célula somática, a célula cística.

O cisto não é tão somente um alojamento, podendo vir a se constituir em uma cápsula que funciona como uma barreira bioquímica. Esta barreira é efetivada pela célula cística, formando então uma barreira hemato-testicular. Este aspecto é observado, por exemplo, em uma espécie de mariposa, *Anagasta kuehniella* (SZOLLOSI et alii, 1980). Desta forma, também em algumas espécies de insetos, o cisto estabelece um ambiente com características específicas para que a espermiogênese ocorra.

Sabe-se também que o número de espermatídes num cisto é constante para uma espécie considerada, podendo haver alguma perda celular em alguns cistos. As células germinativas normalmente são interligadas por pontes citoplasmáticas, cuja existência sugere o favorecimento do sincronismo das transformações envolvidas na diferenciação das espermatídes e possibilita um ordenamento mais ou menos preciso das células dentro do cisto (WANDALL, 1986; CARLSON & HANDEL, 1988).

Previsivelmente o início global da espermiogênese está na dependência de fatores hormonais. Os fatores hormonais que regulam a espermiogênese dos insetos foram revistos por DUMSER (1980).

Pouco se conhece, entretanto, do que diz respeito aos aspectos genéticos envolvidos no processo da espermatogênese. Isto deve-se talvez, à falta da desejável integração dos estudos ultra-estruturais e citogenéticos de insetos.

Apesar disso, em *Drosophila melanogaster* e *D. hydei*, já existe um quadro mais claro dos fenômenos genéticos relacionados à diferenciação das células germinativas (HACKSTEIN, 1987).

Dos estudos realizados até o momento, pode-se ter uma visão geral dos eventos morfogênicos atuantes na espermiogênese dos insetos.

No início da espermiogênese, as espermatídes são células ovóides, com núcleo de mesmo formato ou pleomórfico e com a cromatina pouco condensada.

Os primeiros eventos de diferenciação observáveis são o início da formação do acrossomo e a formação do complexo mitocondrial. O acrossomo origina-se a partir do complexo de Golgi (YASUZUMI, 1974; BAO et alii, 1989), e determina o polo anterior da célula. O complexo mitocondrial que é frequentemente denominado "Nebenkern", especialmente em trabalhos mais antigos que descrevem esta estrutura (PRATT, 1970; TANDLER & HOPPEL, 1972), resulta da fusão das mitocôndrias no polo caudal da célula.

Com o prosseguimento da espermiogênese, notam-se outros eventos importantes tais como o alongamento do

núcleo e aumento gradual na condensação cromatínica (KESSEL, 1966; SCHRANKEL & SCHWALM, 1974). Na verdade, existe um alongamento gradual de toda a célula, sendo que a presença de microtúbulos é considerada fundamental para a aquisição da forma celular definitiva (DUSTIN, 1978).

Concomitante a estes fenômenos tem-se a formação da cauda, com a organização de um axonema típico a partir do centríolo, que é único nas espermatídes de insetos (PEROTTI, 1970).

O padrão organizacional do axonema nos insetos geralmente segue o esquema 9+9+2, embora existam exceções. Em alguns mosquitos é comum o esquema 9+9+1, enquanto em efeméridas predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970). Podem ser encontrados ainda esquemas considerados aberrantes, como a organização 13+0, descrita em dípteros cecidomídeos (BACCETTI & DALLAI, 1976) e em proturos (YIN et alii, 1985).

Ainda durante a formação da cauda, ocorre a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais. Estes, num processo de alongamento, posicionam-se lateralmente ao axonema (TOKUYASU, 1974a). Os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura de natureza protéica, organizada num padrão paracristalino (ROSATI et alii, 1976). O cristalóide - como também é chamada - é formado por uma proteína que foi designada de "cristalomitina" (BACCETTI et alii, 1977).

Os derivados mitocondriais não estão envolvidos com o fornecimento de energia para a movimentação da cauda do espermatozóide, podendo estar, entretanto, relacionados a uma herança citoplasmática paterna (PEROTTI, 1973).

Acredita-se que o axonema dos insetos esteja ancorado no envelope nuclear por uma estrutura de natureza ribonucleoprotéica, conhecida como adjunto do centríolo (CANTACUZÉNE, 1970).

Ao final da espermiogênese a célula madura apresenta-se como uma célula altamente diferenciada. O seu grau de diferenciação pode ser inferido inclusive por alterações que ocorrem a nível de membrana plasmática (BACCETTI et alii, 1971; DALLAI & AFZELIUS, 1982).

O curso normal da espermiogênese nos insetos parece ser influenciado por condições ambientais como temperatura, por exemplo, como foi descrito para *Locusta migratoria* (SZOLLOSI 1976a, 1976b).

Vários autores tem acrescentado informações valiosas ao conhecimento dos aspectos gerais e específicos da espermiogênese em várias espécies de insetos. Pode-se citar como exemplos: em HYMENOPTERA, CHAUVIN et alii (1988), HOAGE & KESSEL (1968), CRUZ-LANDIM & BEIG (1980) e CAETANO (1980); em HEMIPTERA, ITAYA et alii (1980), AFZELIUS et alii (1985), LEE (1985) e DOLDER (1988); em COLEOPTERA, GASSNER III et alii (1975) e HODGES (1982); em ORTHOPTERA, CRUZ-LANDIM (1979) e em EPHEMEROPTERA,

FINK & YASUI (1988).

O estudo ultra-estrutural do espermatozóide de insetos pode ser valioso nas investigações sobre filogenia, como em CURCULIONOIDEA, uma superfamília de coleópteros, onde as famílias e subfamílias podem ser agrupadas segundo as características apresentadas pelo flagelo dos espermatozoides, em especial pela organização do axonema (BURRINI et alii, 1988).

Especificamente na ordem DIPTERA, o estudo da espermiogênese abrange uma razoável quantidade de trabalhos, sendo que, previsivelmente, a espécie mais investigada é *D. melanogaster*, com trabalhos abordando a espermatocitogênese (RASMUSSEN, 1973 e KESSEL, 1981) e a espermiogênese (TOKUYASU, 1974a, 1974b, 1974c, 1975); a espermatogênese de linhagens mutantes (SHOUP, 1967; KIEFER, 1970 e BRICK et alii, 1979) e de animais submetidos a condições experimentais (ANDERSON, 1967; WILKINSON et alii, 1975).

STANLEY et alii (1972), classificaram a espermiogênese de *D. melanogaster* em onze estádios distintos baseados em características ultra-estruturais. Este trabalho é utilizado ainda hoje, como parâmetro para trabalhos similares em dípteros.

QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) e QUAGIO-GRASSIOTTO & DOLDER (1985) caracterizaram a espermiogênese normal da linhagem selvagem do díptero *Ceratitis capitata*, uma praga de frutas, e BAO (1987) investigou a espermiogênese

de uma linhagem mutante RA, anteriormente conhecida como "olho róseo", reprodutivamente inferior. Tais trabalhos foram realizados a nível ultra-estrutural e foram desenvolvidos no Depto. de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

1.2. PROBLEMÁTICA DO TRABALHO

As moscas do gênero *Chrysomya* foram introduzidas na América do Sul na década de setenta, através de portos do sudeste brasileiro. São insetos oriundos da África, trazidos possivelmente por navios procedentes de Angola e Moçambique, quando da chegada de refugiados das guerras de independência daqueles países. Foram identificadas três espécies: *Crysomya megacephala*, *C. putoria* e *C. albiceps* (GUIMARÃES et alii, 1978; GAGNÉ, 1981; BAUNGARTNER & GREENBERG, 1984). Atualmente estes insetos estão estabelecidos no território brasileiro, tendo sido noticiado que já alcançaram até mesmo o estado de Oklahoma (EUA), no sul da América do Norte (GREENBERG, 1988), o que se supõe ter ocorrido através de migração

pelo continente, dada a sua grande capacidade de dispersão.

O gênero *Chrysomya* pertence à família CALLIPHORIDAE da ordem DIPTERA. São moscas caracterizadas primariamente por apresentarem uma coloração verde-azulada metálica, aspecto este que, entretanto, não lhes é exclusivo. ZUMPT (1965) caracteriza morfologicamente larvas e adultos pertencentes a este gênero.

Estes insetos apresentam um elevado grau de sinantropia, fenômeno que pode ser simplifadamente definido como "associação espontânea e indesejável (de animais, especialmente moscas ou roedores) à biocenose humana" (POLVONY, 1971). Isto torna estes insetos especialmente interessantes, já que as fêmeas ovipõem em matéria orgânica como carcaças de animais, sendo que a espécie *C. megacephala* está relacionada às miases dos animais domésticos e do homem (ZUMPT, 1965). Além disto, como são insetos frequentadores de depósitos de lixo, podem ser vetores de patógenos, como o poliovírus e *Salmonella* (GREENBERG, 1971 apud GUIMARÃES et alii, 1978).

Embora tenham sido estudados os aspectos da biologia reprodutiva das fêmeas de *C. putoria* (AVANCINI & do PRADO, 1986) e de *C. megacephala* (LINHARES, 1988), nada concernente aos aspectos da espermiogênese destas espécies tem sido documentado.

O estudo da espermatogênese e, mais especificamente, da espermiogênese pode ser levado a efeito sob diversas abordagens, destacando-se o estudo ultra-estrutural. As contribuições de estudos desta natureza têm influenciado sobremaneira o conhecimento do fenômeno da diferenciação celular. Além disto, o estudo ultra-estrutural da espermiogênese de uma dada espécie animal traz informações sobre aspectos importantes da sua biologia e das relações filogenéticas.

O estudo ultra-estrutural da espermiogênese de *C. megacephala* deverá acrescentar dados importantes ao conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie, podendo contribuir nas atividades de cultura e controle biológico, especialmente através da investigação e linhagens que apresentam anomalias de desenvolvimento das células espermáticas, além de permitir o estabelecimento de relações filogenéticas e/ou taxonômicas através da comparação com espécies relacionadas, dos eventos ultra-estruturais ao longo da espermiogênese, e da própria comparação da estrutura do espermatozóide.

1.3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização dos aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *C. megacephala*.

Para fundamentar a descrição da espermiogênese, e para uma boa compreensão dos eventos que nela ocorrem, serão também caracterizados alguns aspectos da estrutura da gônada, da organização dos cistos e da ultra-estrutura dos espermatócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

2. 1. ESPÉCIMENS

Foram utilizados exemplares adultos machos de *Chrysomya megacephala* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE), geralmente com até 48 horas após a emergência. Também foram empregados adultos com duas semanas após a emergência.

2.2. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMENS NO LABORATÓRIO

Os exemplares eram oriundos de colônias mantidas no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. As colônias são formadas em caixas com armação de ferro com dimensões de 30X30X48 cm, e com cobertura de tela. Cada colônia é formada por aproximadamente 200 exemplares, entre machos e fêmeas. A

temperatura no recinto onde ficam as colônias e controlada, sendo mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A alimentação consiste de uma fonte de proteínas e uma fonte energética, que podem ser leite e açúcar, respectivamente, por exemplo.

2.3 REMOÇÃO DOS TESTÍCULOS

Para a dissecação, os espécimens foram submetidos à letargia por frio (em geladeira) ou à anestesia por breve exposição a vapores de éter. As dissecações foram feitas com o auxílio de uma lupa esteroscópica, sempre certificando-se de que os espécimens ainda estavam vivos.

2.4. PROCESSAMENTO DO MATERIAL E PROCEDIMENTO

BÁSICO DE FIXAÇÃO

Dadas as suas dimensões reduzidas, os testículos foram fixados "in toto", com solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, a pH 7,2, acrescida de 3,5% de sacarose e traços de cálcio; durante 3 horas. O material foi lavado durante 1 hora em tampão fosfato Sorensen 0,1M; pH 7,2 com 3,5% de sacarose e traços de cálcio. Em seguida foi efetuada a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M

a pH 7,2 com 3,5% de sacarose e traços de cálcio, durante 1 hora.

O material foi lavado rapidamente em água destilada e desidratado em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de etanol, da seguinte maneira: com o material imerso na água, foi acrescentado etanol 100°GL por gotejamento, até o volume no frasco dobrar, alcançando, portanto, a concentração aproximada de 50°GL de etanol, durante quinze minutos. Em seguida desprezou-se metade do volume do frasco e repetiu-se a operação, obtendo-se agora a concentração aproximada de 75°GL. O material foi então submetido a três trocas de quinze minutos cada em etanol 95°GL. Até este ponto, todo o procedimento foi efetuado a frio (aproximadamente 4°C). Finalmente o material foi submetido a três trocas de dez minutos cada em etanol 100°GL, já a temperatura ambiente.

Após a desidratação, o material foi imerso em uma solução de etanol 100°GL/acetona P.A. (1:1) durante cinco minutos e submetido a duas trocas de cinco minutos cada em acetona. Seguiu-se a embebição em solução de Epon/acetona (1:1) durante uma noite, em frasco aberto e à temperatura ambiente.

No dia seguinte, o material foi imerso em Epon em sua variante mais dura segundo LUFT (GLAUERT, 1975). A polimerização foi efetuada em estufa a 60°C.

Todo o sistema de processamento descrito até aqui está de acordo com os procedimentos usuais de preparo de

material biológico para microscopia eletrônica (GLAUERT, 1975).

2.5. VARIANTES NO SISTEMA DE FIXAÇÃO

VARIANTE 1. Fixação em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1 M; pH 7,2 com 3,5% de sacarose e com traços de cálcio, durante doze horas seguido de procedimento básico. Modificado de vários autores, entre os citados PHILLIPS et alii (1987) e WITALINSKI & AFZELIUS (1987).

VARIANTE 2. Fixação terciária em acetato de uranila a 2% (solução aquosa), durante 2 horas. Após isso o material foi lavado rapidamente em água e desidratado segundo o procedimento básico. Esta variante é comum em M.E.. Ver HAYAT (1970).

VARIANTE 3. Após a fixação básica em glutaraldeído e ósmio, o material foi imerso em solução de ácido tânico a 2% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, com 3,5% de sacarose e traços de cálcio, durante 1 a 2 horas. Após esse procedimento o material foi lavado rapidamente em água e

desidratado segundo o procedimento básico. Modificado de SIMIONESCU & SIMIONESCU (1976a, b).

2.6. CORTE E OBSERVAÇÃO

Cortes semifinos (0,2 μ m, aproximadamente) e ultra-finos (30-45 nm, aproximadamente), foram obtidos em ultra-micrótomo LKB. Os cortes semifinos corados com azul de toluidina a pH 12 são úteis para um conhecimento da dinâmica da espermiogênese ao longo da extensão do testículo e dão apoio às informações obtidas nos cortes ultra-finos.

Os cortes ultra-finos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 2% durante trinta minutos e em solução alcalina (NaOH 1N) de citrato de chumbo a 0,2% durante cinco minutos. Os cortes de material processado segundo a variante 2 foram contrastados apenas com citrato de chumbo.

As observações foram levadas a efeito em aparelhos Zeiss EM-9S 60 KV e EM-10 60kV. As fotomicrografias foram feitas com filmes Fuji ou Kodak para microscopia eletrônica e revelados com revelador Kodak D19-B. Para as ampliações foi empregado um ampliador Fuji S69, papel fotográfico resinado Kodak F-3 e reveladores Dektol e D19-B.

RESULTADOS

3. 1. ASPECTOS MACROSCÓPICOS DA GÔNADA

Alojadas na porção final do abdômen do animal, a gônada apresenta aspecto piriforme, sendo que, da extremidade mais dilatada, parte o ducto deferente (Ver Esquema 1). Nos animais estudados, o maior eixo deste órgão media em torno de 1mm. Esses órgãos apresentam uma pigmentação característica: nos animais recém-emergidos a coloração é amarelo pálido, após dois dias de vida adulta a cor se intensifica, tornando-se alaranjada. Naqueles com mais de uma semana de emergência a cor pode chegar a vermelho brilhante.

3.2. ULTRA-ESTRUTURA DA PAREDE DA GÔNADA

O Esquema 1 resume os aspectos ultra-estruturais da organização tecidual da gônada.

A gônada apresenta uma camada superficial composta por células achatadas (Figs. 1-3). As células desta camada contêm os pigmentos responsáveis pela coloração do órgão. Os pigmentos parecem estar contidos em grânulos eletrodensos, esféricos e delimitados por membrana. A quantidade destes grânulos aumenta com a idade dos indivíduos, o que pode ser observado comparando-se as Figuras 1-3 com a Figura 46.

Logo abaixo desta camada ocorre uma lâmina basal, às vezes bastante espessa, que a separa de um conjunto de células musculares. Estas células musculares apresentam o citoplasma quase completamente preenchido por miofilamentos que estão dispostos ao longo do maior eixo da célula. Estes miofilamentos não estão organizados em feixes de miofibrilas. Próximas ao miofilamentos são encontradas mitocôndrias. O núcleo destas células é ovóide e possui cromatina frouxa, com áreas fortemente eletrodensas (Figs. 1-3).

3. 3. ULTRA-ESTRUTURA DOS CISTOS

As espermatídes são circundadas por uma grande célula cística. Em cortes ultra-finos estas células apresentam-se, na maioria das vezes, como uma delgada "parede citoplasmática", (Figs. 11, 32-34). As células císticas adjacentes se interdigitam profusamente, podendo apresentar junções semelhantes a desmosomos (Fig. 1).

3. 4. ASPECTOS DA MATURAÇÃO DOS CISTOS

As espermatídes em um cisto desenvolvem-se sincronicamente, entretanto não se verifica uma sincronia de desenvolvimento entre os cistos (PHILLIPS, 1974a). Tomando-se a gônada em seu eixo longitudinal podemos dividi-la em três partes de tamanhos equivalentes. Considerando-se o ducto deferente como referência temos: (1) O terço proximal, (2) o terço médio e (3) o terço distal ao ducto (Esquema 1).

Quando são examinados cortes semifinos sequenciais das regiões acima definidas, observa-se que a frequência relativa de cistos maduros é decrescente a partir do terço proximal, ou seja, a partir do terço proximal

encontram-se cistos em estádios de maturação mais adiantados que os encontrados no terço médio. Neste, por sua vez, observam-se cistos mais maduros que os encontrados no terço distal. É necessário advertir, entretanto, que num mesmo plano de corte transversal podem ser encontrados cistos com graus de maturação bastante variáveis, refletindo a não uniformidade das regiões, uma vez que estas não são regiões anatómicas estanques e sim um artifício descritivo.

3. 5. ULTRA-ESTRUTURA DOS ESPERMATÓCITOS

Os espermátócitos são células ovaladas e relativamente grandes. As maiores podem contar com 12,5 μ m em seu maior eixo. O núcleo pode ser pleomórfico, embora, mais frequentemente, possua formato que acompanha o da célula. Sua cromatina apresenta numerosas granulações de dimensões variadas e por vezes fortemente eletrodensas (Fig. 4-6), sendo que, entretanto, o aspecto geral é de grande descompactação. O núcleo possui ainda um nucléolo proeminente, de aspecto anelado, apresentando uma estrutura fibro-granular fortemente eletrodensa (Figs. 5-7). Associada ao nucléolo pode ser encontrada uma estrutura esférica aparentemente homogênea

e de média eletrodensidade, que passamos a denominar de "corpo esférico". No perímetro circular do corpo esférico podem ser notados alguns grânulos com eletrodensidade comparável àquela apresentado pelo nucléolo, que estão aparentemente dispostos de forma regular (Fig. 7).

No citoplasma encontramos numerosas mitocôndrias (Figs. 4-6), e o retículo endoplasmático desenvolvido, podendo este apresentar uma morfologia grosseiramente circular (Fig. 10), havendo uma grande quantidade de ribossomos e polirribossomos (Fig. 4). Frequentemente são encontrados dois dictiossomos por célula, sendo que não podem ser relacionados a nenhuma outra estrutura celular em particular. Foram também encontradas lamelas anuladas (Figs. 4 e 9), bem como algumas inclusões fortemente eletrodensas (Figs. 4).

No espaço entre as células, e frequentemente associados à superfície celular, são encontrados corpos mielínicos (Fig. 6). Entre os espermatócitos são observadas pontes citoplasmáticas, que apresentam um acúmulo de material eletrodense junto às faces citoplasmáticas de suas membranas (Fig. 8).

3. 6. ESTÁDIOS DA DIFERENCIAÇÃO

DAS ESPERMÁTIDES

Será apresentada a seguir uma classificação sumária para o reconhecimento das fases de diferenciação das espermátides no cisto, que se baseia nos trabalhos de STANLEY et alii (1972), de QUAGLIO-GRASSIOTO (1983) e de BÃO (1987). Uma visão simplificada dos eventos prevalentes na espermiogênese é apresentada no Esquema 2.

Estádio 1 - Figuras 11-13. Neste estágio inicial de diferenciação, as espermátides apresentam núcleo esférico com cromatina frouxa de aspecto granular e com pequenas áreas condensadas. Os poros nucleares estão distribuídos por toda a extensão do envelope nuclear. Não há indícios da existência de nucléolo. No citoplasma, há perfis de retículo endoplasmático ao redor do núcleo. O complexo de Golgi encontra-se próximo ao núcleo, estando associado a uma série de vesículas que possuem um conteúdo de aspecto granular. A característica mais importante neste estágio é o agrupamento das mitocôndrias em um dos pólos da célula. Não há indícios da formação do axonema, embora possa ser observada uma massa granular eletrodensa entre o núcleo e o grupo de mitocôndrias, que se assemelha a primórdios do adjunto do centríolo. Apenas neste estágio observou-se a presença de pontes

citoplasmáticas entre as espermatídes.

Estádio 2 - Figuras 14-16. Neste estágio ocorre a fusão das mitocôndrias e a consequente formação do complexo mitocondrial ou "Nebenkern". Neste estágio temos então o início da polarização da espermatíde com o delineamento do pólo caudal, que é assinalado pela presença do complexo mitocondrial. O pólo anterior não pode ser claramente definido pois o acrossomo não é observado. Porém há um grande Golgi próximo ao núcleo, que está, inclusive, associado a vesículas de eletrodensidades variáveis. No núcleo ainda esférico, há um aumento das áreas eletrodensas.

Estádio 3 - Figuras 17 e 18. A característica mais importante das espermatídes deste estágio é a disposição do complexo mitocondrial em duas massas interligadas e dispostas bilateralmente ao axonema. Por sua vez, este mostra-se no padrão 9+2 e está circunscrito por uma bainha dupla de membranas lisas.

Estádio 4 - Figuras 19-23. As espermatídes neste estágio apresentam núcleo esferóide, com a cromatina marcada pela presença de áreas granulares fortemente eletrodensas. Os poros nucleares estão restritos a pouco mais de um terço do envelope nuclear. Esta área não se restringe a uma zona específica do envelope nuclear. A

característica mais importante neste estágio é a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais, lateralmente associados ao axonema; os derivados podem encerrar pequenas áreas citoplasmáticas. O adjunto do centríolo é uma massa fibro-granular localizada em uma depressão do envelope nuclear. Localizado no centro do adjunto, encontra-se o centríolo em sua configuração típica.

Estádio 5 - Figuras 24-31. Neste estágio as células apresentam núcleo em alongamento. A cromatina pode estar em massas granulares eletrodensas, embora existam áreas eletrolúcidas que podem ser amplas. O acrossomo posiciona-se na região apical da célula, junto ao núcleo. Os derivados mitocondriais não mais encerram as pequenas áreas citoplasmáticas e podem ainda apresentar cristas típicas. Neste estágio inicia-se a formação do cristalóide. Podem ser observados microtúbulos ao redor dos derivados mitocondriais e do núcleo. No axonema, que continua com o padrão 9+2, há início da formação dos túbulos acessórios e das fibras densas.

Estádio 6 - Figuras 32-33. As espermatídes, já bastante alongadas, apresentam cromatina com aspecto granular e pouco condensada. Caracteristicamente há uma faixa de cromatina condensada aposta ao envelope nuclear.

O núcleo exibe concavidades e convexidades, sendo que os microtúbulos estão associados às convexidades e às concavidades associam-se as membranas adjacentes.

Estádio 7 - Figuras 34-36. As concavidades nucleares estão mais pronunciadas. Em cortes transversais notam-se geralmente duas concavidades dispostas de cada lado do núcleo, podendo, entretanto, serem encontradas figuras pleomórficas. As membranas adjacentes estão mais pronunciadas em relação ao estágio anterior. A cromatina neste estágio é caracterizada por um aspecto de fitas dispostas por todo o núcleo. Estas fitas podem estar associadas à faixa de cromatina aposta ao envelope nuclear. Os elementos do flagelo estão organizados de forma semelhante àquela dos espermatozóides. O adjunto do centríolo localiza-se entre os derivados mitocondriais (em um curto trajeto) e possui uma estrutura homogênea, não mais com aspecto fibro-granular. O axonema já mostra um esboço do padrão 9+9+2.

Estádio 8 - Este estágio não foi observado, mas em função da grande diferença de desenvolvimento entre os estádios 7 e 9, sua existência pode ser presumida. Provavelmente as fitas cromatínicas do núcleo se agregariam em massas densas separadas por áreas eletrolúcidas. As concavidades do núcleo tornar-se-iam menos pronunciadas e as membranas adjacentes começariam a

afastar-se. O preenchimento dos derivados mitocondriais pelo cristalóide estaria quase completo.

Estádio 9 - Figuras 37-41. Neste estágio os núcleos apresentam secção transversal circular. A cromatina apresenta condensação intensa que, porém, não é homogênea. O acrossomo posiciona-se lateralmente à porção anterior do núcleo. Os elementos da cauda estão totalmente estruturados. Os derivados mitocondriais estão preenchidos pelo material paracristalino. Em algumas células a bainha dupla de membranas ainda circunda completamente o axonema. Geralmente, entretanto, ela representa apenas um fragmento que se interpõe ao axonema e derivados mitocondriais. As membranas adjacentes estão afastadas do núcleo e apresentam um aspecto típico em espiral. Algumas células apresentam citoplasma ainda abundante. O material nuclear a ser eliminado forma "bulbos nucleares" na região posterior do núcleo.

Estádio 10 - Espermatozóides - Figuras 42-48;
Esquema 3. Na célula diferenciada, o citoplasma residual foi completamente perdido, e com ele, são eliminados os microtúbulos e as membranas adjacentes. O núcleo apresenta a cromatina fortemente compactada. Os derivados mitocondriais estão preenchidos pelo cristalóide. O adjunto do centríolo persiste interposto aos derivados mitocondriais por um curto trajeto. O espermatozóide de

C. megacephala é uma célula alongada, com um pequeno acrossomo lateralizado ao núcleo. Por sua vez, o núcleo apresenta um aspecto de forte compactação cromatínica. No pólo caudal do núcleo há uma região de sobreposição dos elementos do flagelo. Os derivados mitocondriais são claramente diferentes em comprimento. O axonema apresenta o esquema 9+9+2, comum nos insetos. O Esquema 3 resume estes aspectos da ultra-estrutura do espermatozoide.

3. 7. EVENTOS ESPECÍFICOS DA CITODIFERENCIAÇÃO

3.7.1 A FORMAÇÃO DO ACROSSOMO

Nos estádios precoces da espermiogênese pode-se detectar a presença de um complexo de Golgi desenvolvido, nas proximidades do núcleo das espermatídes (Figs. 11 e 12). Este Golgi pode apresentar estrutura complexa e estar associado a vesículas de eletrodensidade variáveis (Figs. 14 e 15)). O acrossomo é detectado aposto a porção anterior do núcleo no estágio 5 (Fig. 26); neste estágio observa-se um material difuso e granular associado externamente a membrana acrossômica. Ainda no estágio 5 pode ser detectada também uma membrana lisa associada ao

acrossomo, mas já não se observa um complexo de Golgi característico. No estágio 9, o acrossomo se encontra numa posição lateral ao núcleo e apresenta uma estrutura simples, sendo delimitado por uma membrana e possuindo conteúdo homogêneo de média eletrodensidade (Fig. 32). Neste estágio aquele material granular externo e a membrana associada não são mais detectados.

3.7.2. AS TRANSFORMAÇÕES NUCLEARES

3.7.2.1. A COMPACTAÇÃO CROMATÍNICA

Até o estágio 5 as espermátides apresentam uma sequência crescente de compactação cromatínica. Isto é observado pelo aumento de áreas fortemente eletrodensas geralmente centralizadas no núcleo. Este processo não é necessariamente uniforme, podendo ocorrer aspectos bastante diferenciados (Figura 15). No estágio 5 ocorre a associação de áreas de cromatina compactada com o envelope nuclear (Fig. 24). No estágio 6, observa-se que uma estreita faixa de cromatina compactada associou-se ao envelope nuclear conferindo um aspecto espessado à membrana interna do mesmo, com exceção de uma estreita faixa nuclear onde inclusive o espaço inter-membranas

parece ser mais amplo (Fig. 33). No estágio 7 são notadas fitas cromáticas eletrodensas, algumas das quais parecem ser contínuas à faixa de cromatina condensada aposta ao envelope nuclear (Figs. 35 e 36). O estágio 8 não foi encontrado, mas deve representar a agregação das fitas cromáticas em massas maiores, que resultarão no núcleo com a cromatina fortemente compactada dos estádios 9 e 10 (Figs. 37 e 47). O nucléolo, tal como está organizado nos espermatócitos, não é observado já a partir do estágio 1 (para maior clareza recomendamos comparar as Figuras 5-7 com a Figura 11 e subsequentes).

3.7.2.2. MODIFICAÇÕES DO FORMATO NUCLEAR

Até o estágio 4 o núcleo tem um aspecto esferóide (Figs. 11 e 21). A partir do estágio 5 o núcleo começa a sofrer um alongamento gradual, que é acompanhado pela aposição de microtúbulos ao envelope nuclear (Fig. 25). Nos estádios 6 e 7, o núcleo apresenta concavidades e convexidades quando observado em corte transversal. Caracteristicamente os microtúbulos estão associados às convexidades e nas concavidades observa-se a presença de membranas adjacentes (Figs. 33, 35 e 36). No estágio 9, já bastante alongado, o núcleo apresenta secção transversal circular (Fig. 37). As membranas adjacentes estão afastadas, enquanto os microtúbulos são observados

em todo o perímetro nuclear. Ao longo da espermiogênese os poros nucleares ocupam área cada vez mais reduzida do envelope nuclear. No estágio 1, os poros nucleares são observados espalhados pelo envelope nuclear (Fig. 12), enquanto no estágio 4 estão confinados a um terço do envelope nuclear aproximadamente (Figs. 20 e 22). Esta área onde se congregam os poros nucleares não possui localização específica em relação à inserção dos elementos do flagelo no núcleo. Nos estádios seguintes, 6 e 7, observa-se, como já descrito, um estreito segmento do envelope nuclear onde não há associação de cromatina condensada e o espaço inter-membranas parece mais amplo. No estágio 7 este segmento parece conter poros remanescentes e aí pode-se estabelecer um posicionamento especificamente oposto ao segmento do núcleo que se volta aos elementos do flagelo (Figs. 33, 35 e 36). Nas espermátides de estágio 9, que ainda possuem grandes segmentos de citoplasma, são observadas áreas de envelope nuclear que delimitam um conteúdo finamente granular, conhecidas como "bulbos nucleares" (Figs. 38 e 39) (QUAGLIO-GRASSIOTO, 1983).

3.7.3. A FORMAÇÃO DO FLAGELO

3.7.3.1. O COMPLEXO MITOCONDRIAL E OS DERIVADOS MITOCONDRIAIS

No estágio 1, todas as mitocôndrias da espermátide se agrupam num pólo da célula (Figs. 11 e 13). Subsequentemente, no estágio 2, estas mitocôndrias sofrem um processo de fusão formando o complexo mitocondrial (Figs. 14-16). No próximo estágio o complexo mitocondrial inicia sua divisão quando se dispõe em duas massas relacionadas bilateralmente a um eixo projetado a partir do axonema (Figs. 17 e 18). Concomitante a massa mitocondrial continua a se fundir diminuindo o seu aspecto segmentado inicial. No estágio 4 o complexo mitocondrial se divide em dois derivados mitocondriais nos quais ainda se observam pequenas áreas citoplasmáticas resultantes da fusão mitocondrial (Fig. 19). A partir deste ponto os derivados mitocondriais sofrerão um processo de alongamento, mantendo sempre posições laterais ao axonema. No estágio 5, inicia a formação do cristalóide ou estrutura paracristalina no interior dos derivados mitocondriais. O cristalóide apresenta granulação fina, organizada de maneira regular, ocupando uma pequena área quadrangular ou hexagonal no interior de cada derivado (Figs. 27, 30 e 31). A partir

deste estágio o cristalóide passa a preencher gradualmente o interior dos derivados. Nos espermatozóides nota-se claramente a existência de uma matriz paracristalina preenchendo totalmente o seu interior (Figs. 44 e 45). Os dois derivados mitocondriais persistem após a espermiogênese, sendo que, apesar de possuírem secção transversal com áreas equivalentes, diferem em comprimento. Isto pode ser notado em cortes próximos ao final do flagelo, onde o axonema é ladeado por apenas um derivado mitocondrial em perfil típico e pela porção final do outro (Fig. 43).

3.7.3.2. A FORMAÇÃO DO AXONEMA

O axonema se origina a partir de um centríolo típico (Fig. 23), que está situado em uma depressão do envelope nuclear (Fig. 25). Associado ao centríolo está o adjunto do centríolo (Figs. 23 e 25). Este é uma massa fibro-granular que circunscreve o centríolo nos estádios 4, 5 e 6 (Figs. 21-23 e 25). Nos estádios subsequentes o adjunto do centríolo torna-se uma estrutura compacta interposta aos derivados mitocondriais por um curto trajeto a partir da origem do flagelo, numa organização que persiste até o final da espermiogênese (Figuras 36-41 e 44 e 45). O axonema com seu esquema básico 9+2 é observado no estágio 3 (Figs. 17 e 18). No estágio 5

nota-se o início da formação dos túbulos acessórios a partir dos subtúbulos B. Observa-se também o início da formação das fibras densas (Fig. 31). A partir do estágio 7, o axonema está completamente organizado no esquema 9+9+2 (Fig. 36). Os elementos ordenados do axonema do espermatozóide são identificados na Fig. 44. Os elementos mais periféricos são os túbulos acessórios e as fibras densas. Em direção ao centro do axonema encontram-se as duplas de túbulos, formadas pelos subtúbulos A e B. Os subtúbulos A apresentam os braços de dineína, e deles partem os raios em direção à bainha que envolve a dupla de túbulos centrais. Estes raios terminam em estruturas globulares antes de chegar a bainha. Esta é composta de material fracamente eletrodense e que circunscreve a dupla de microtúbulos centrais. Os túbulos centrais, os subtúbulos A e os túbulos acessórios são "preenchidos" por uma "matriz" fracamente eletrodensa, embora, em menor frequência, possam ser encontrados túbulos centrais com matriz eletrolúcida (Fig. 43). Não foi detectado nenhum indício de ligação entre o axonema e os derivados mitocondriais, porém o axonema parece estar alinhado em relação aos derivados mitocondriais, quando se observa que os pares de túbulos 2 e 4 estão relacionados aos derivados mitocondriais (uma dupla para cada derivado) (Fig. 44).

3.7.3.3. MEMBRANAS LISAS DO FLAGELO

Durante o alongamento da espermatíde, no estágio 5, observam-se membranas lisas associadas aos elementos do flagelo (Figs. 27 e 30). Também é frequente nesta região a presença de um complexo de Golgi distinto daquele relacionado à formação do acrossomo, desde os estádios iniciais da diferenciação até pelo menos o estágio 5 (Fig. 13, 21, 27 e 30).

3. 8. AS PONTES CITOPLASMÁTICAS

Com exceção do estágio 1 (Fig. 11), não foi detectada a presença de pontes citoplasmáticas entre as espermatídes dos demais estádios.

3. 9. ESPERMIOGÊNESE ATÍPICA

Podem ser observados alguns cistos com associações entre espermatídes de dois estádios diferentes não necessariamente subsequentes (Figs. 49, 50 e 51). Às vezes, em cortes de cistos de espermatídes em alongamento, são encontradas células dispostas em níveis diferentes (Figs. 32, 34, 36, 37 e 42).

3. 10. ESPERMÁTIDES ABERRANTES E FIGURAS DE ABSORÇÃO

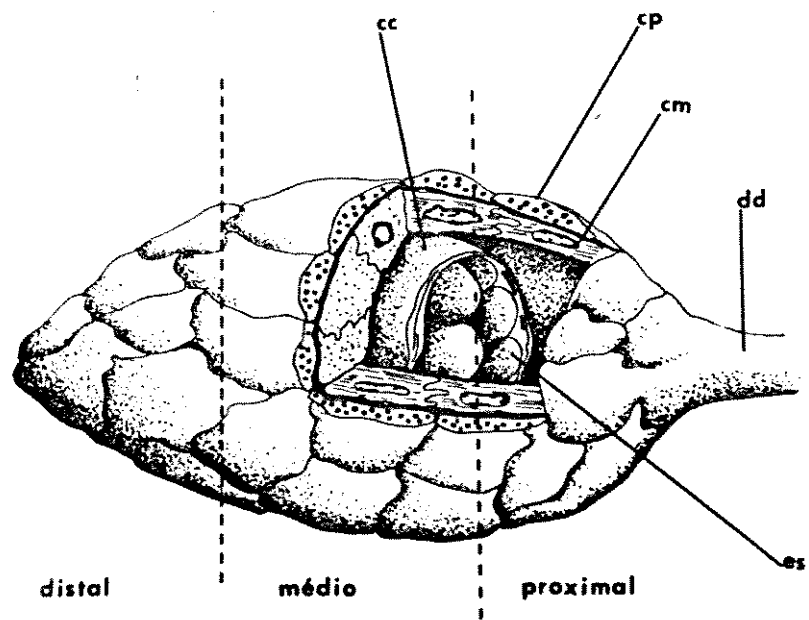
Foram obtidas imagens de espermatozóides inseridos em interstícios celulares da parede da gônada (Fig. 52).

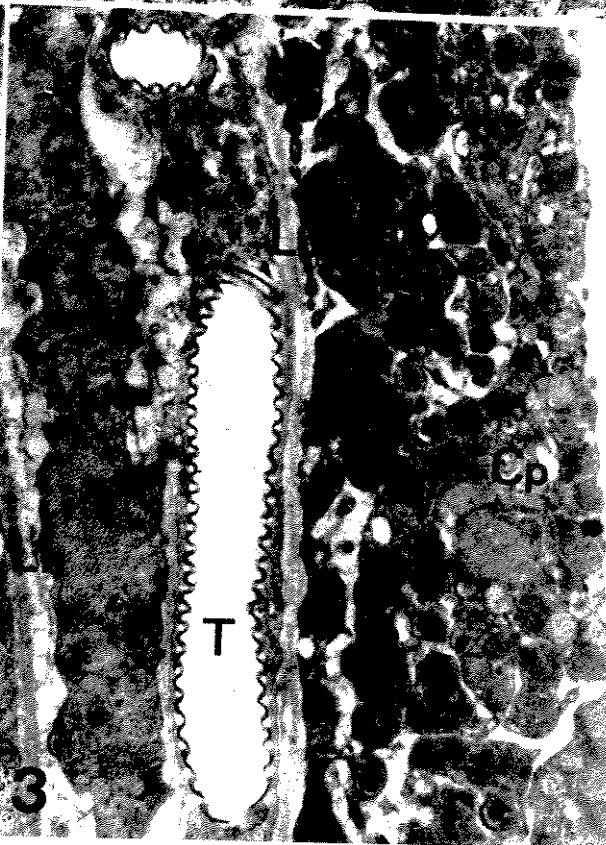
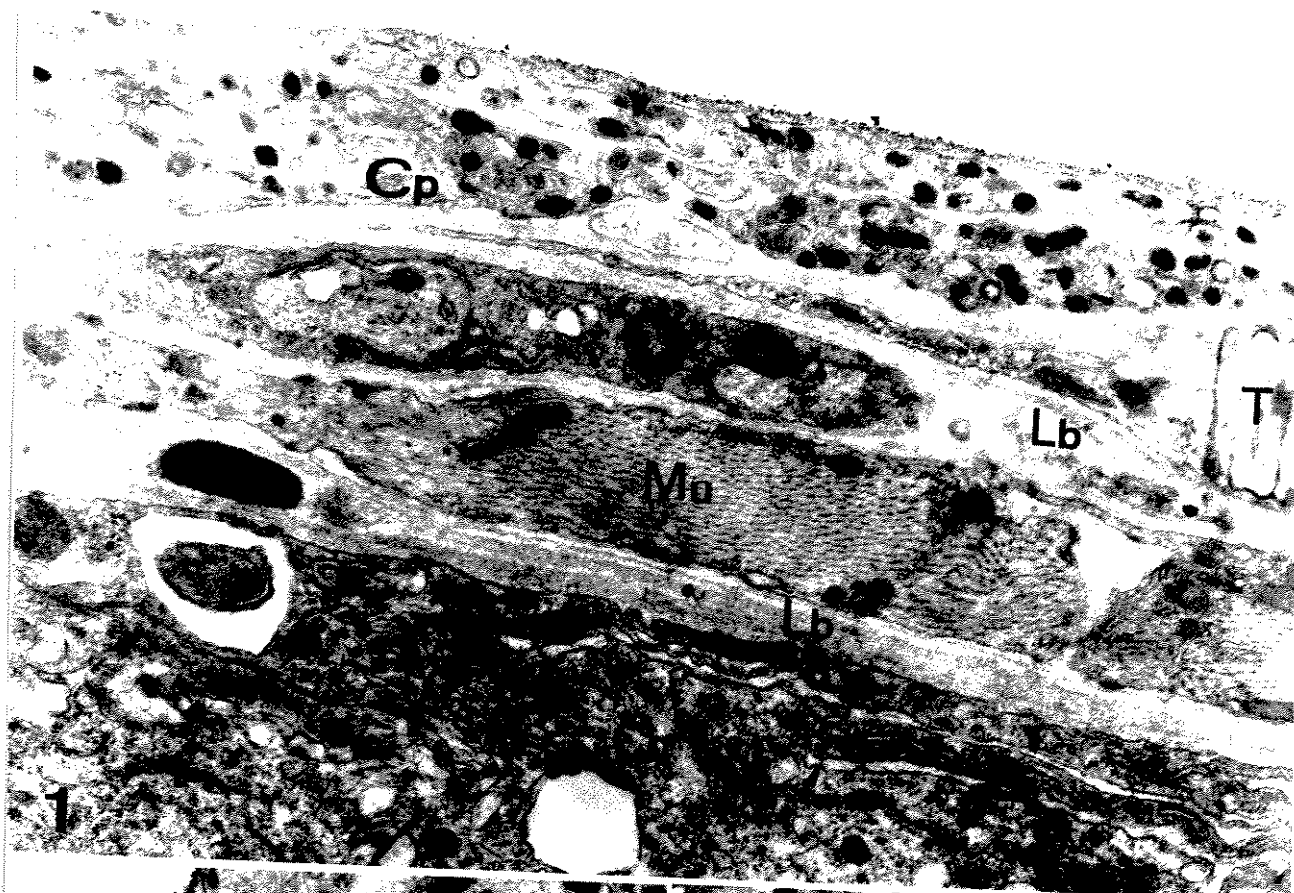
A presença de figuras aberrantes no material estudado foi relativamente frequente. Assim foram observados axonemas desorganizados (Fig. 53), desalinhamento de organelas e elementos supra-numerários (Figs. 54-56), figuras de fusão entre espermátides (Figs. 51 e 57); e elementos pouco usuais, de difícil classificação (Fig. 58).

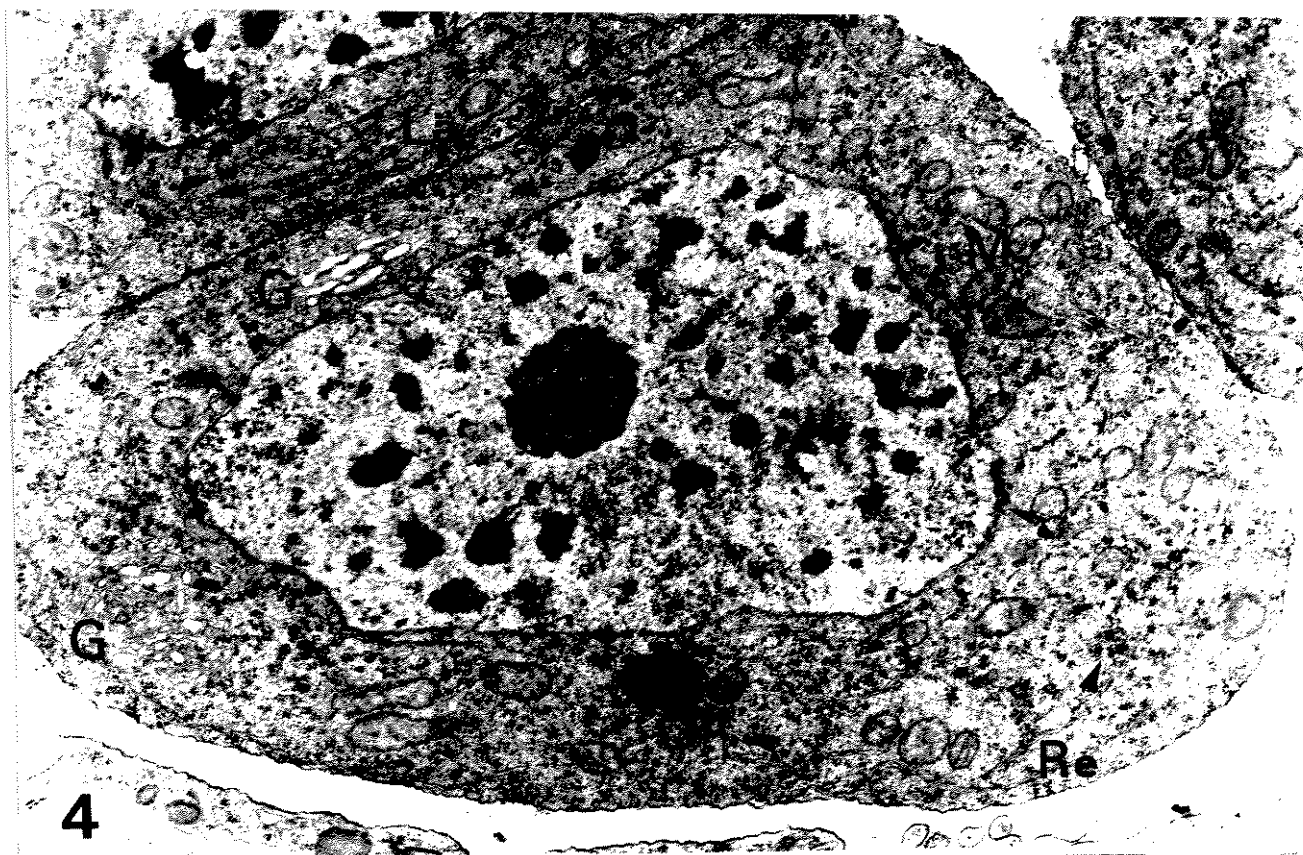
3.11. FIGURAS

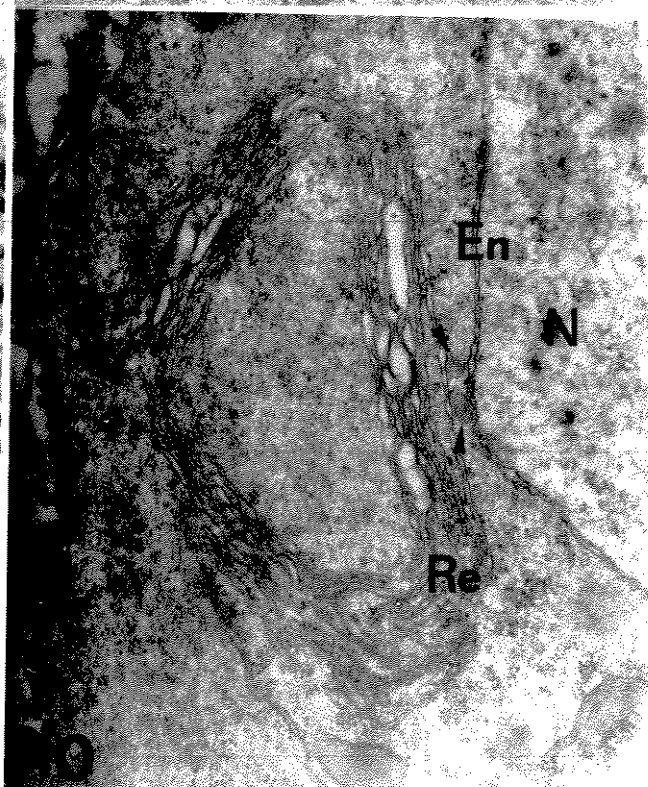
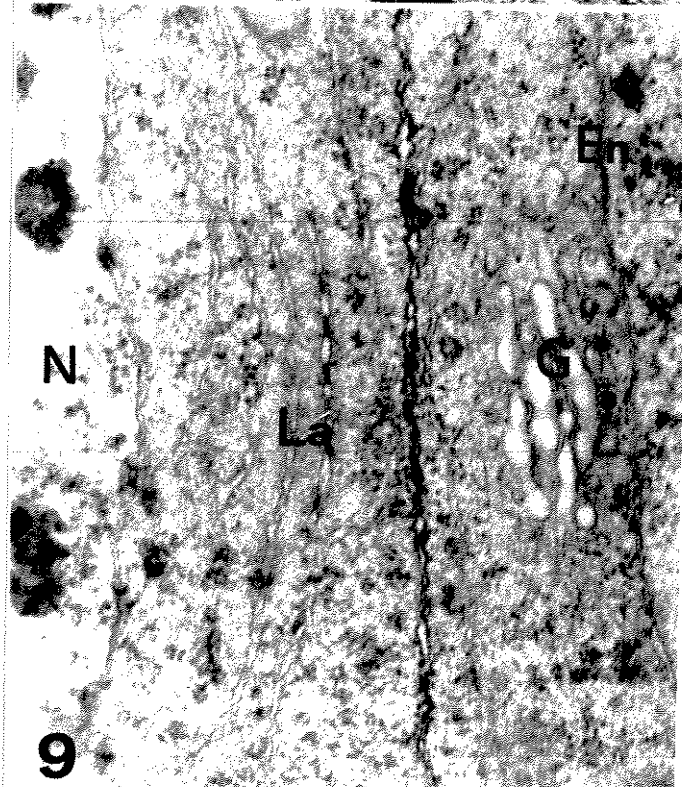
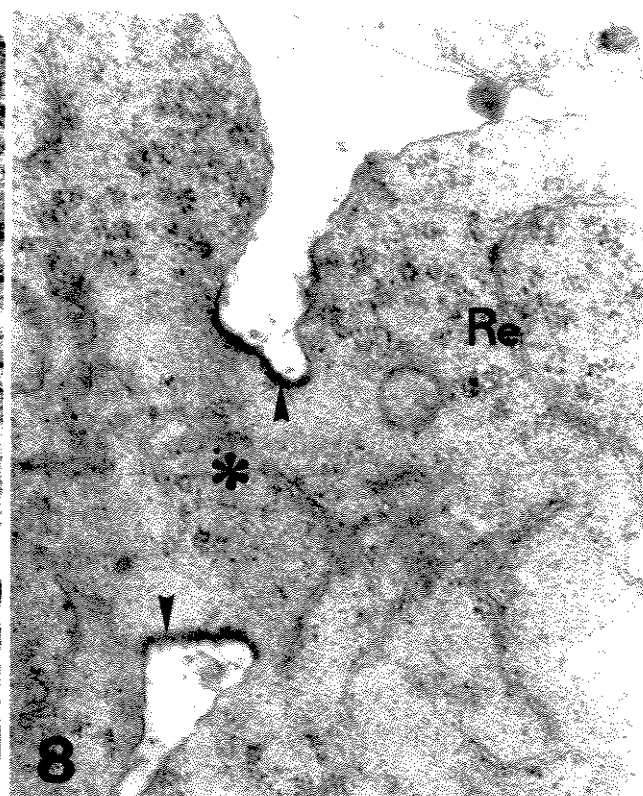
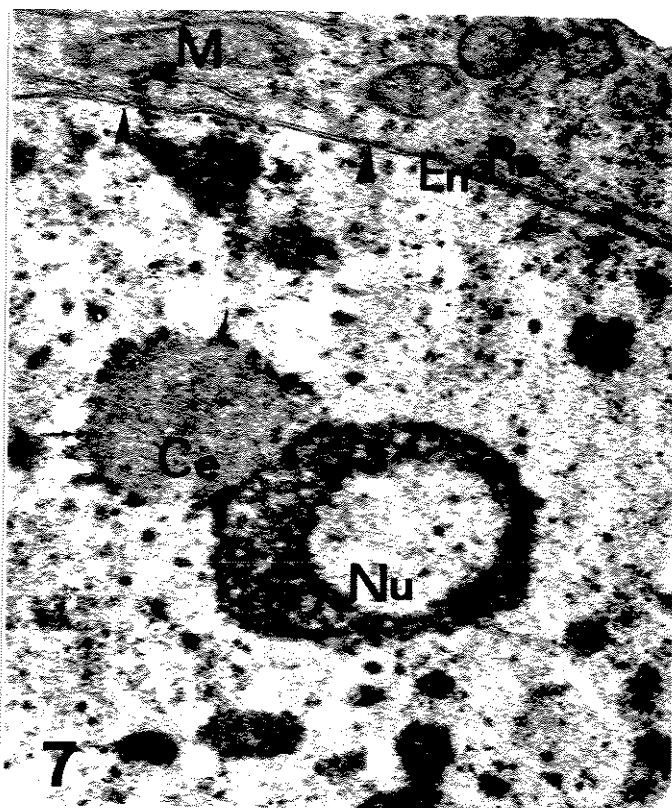
As fotomicrografias apresentadas foram obtidas a partir do material processado segundo o procedimento básico, a variante 1 e a variante 2. Não foram usadas fotomicrografias de material processado segundo a variante 3 devido aos resultados insatisfatórios em termos de contrastes.

Estrutura da Gônada

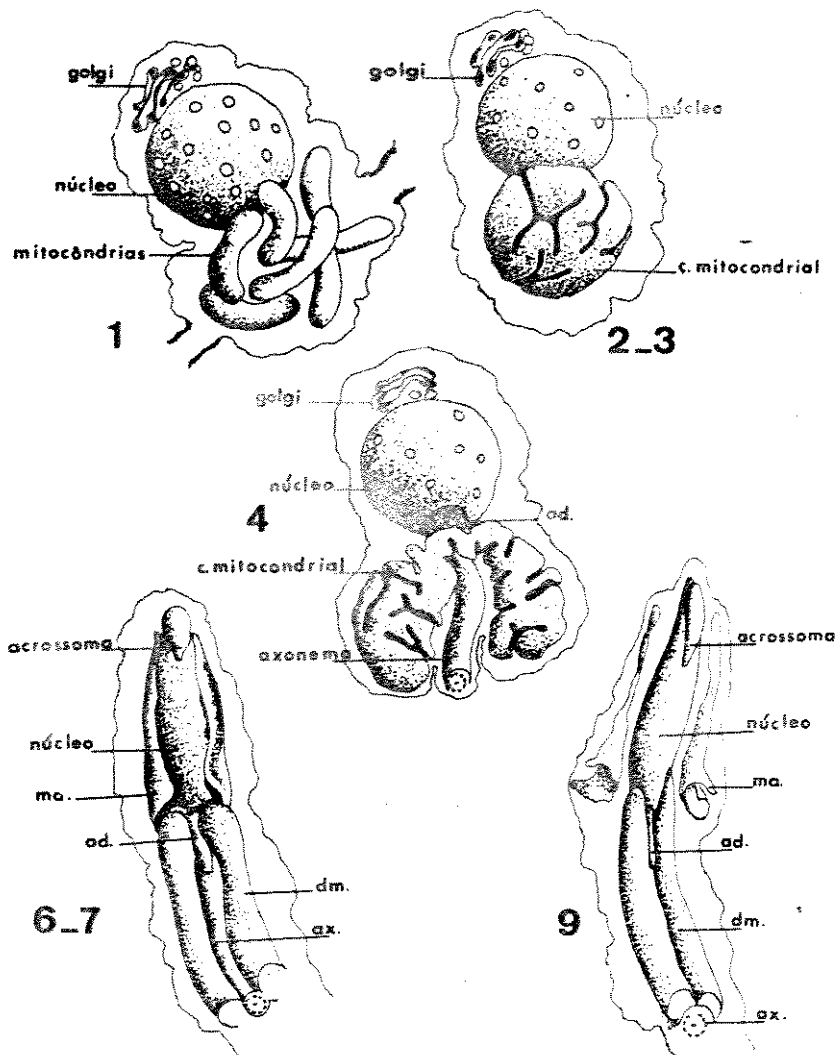


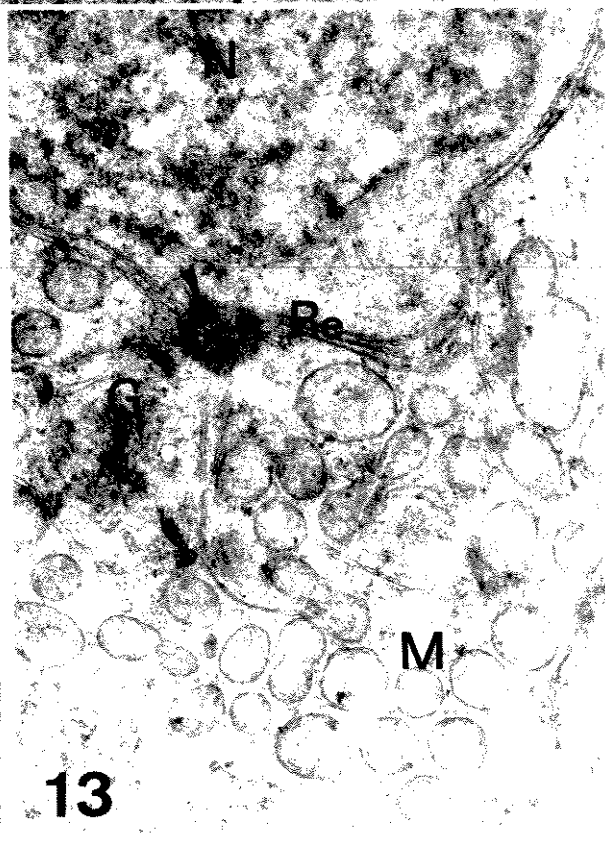
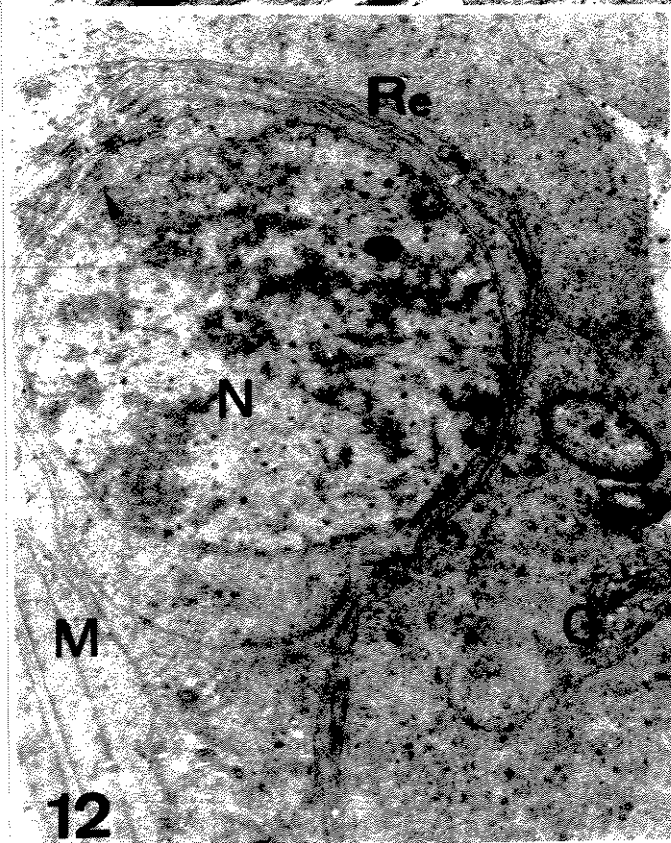
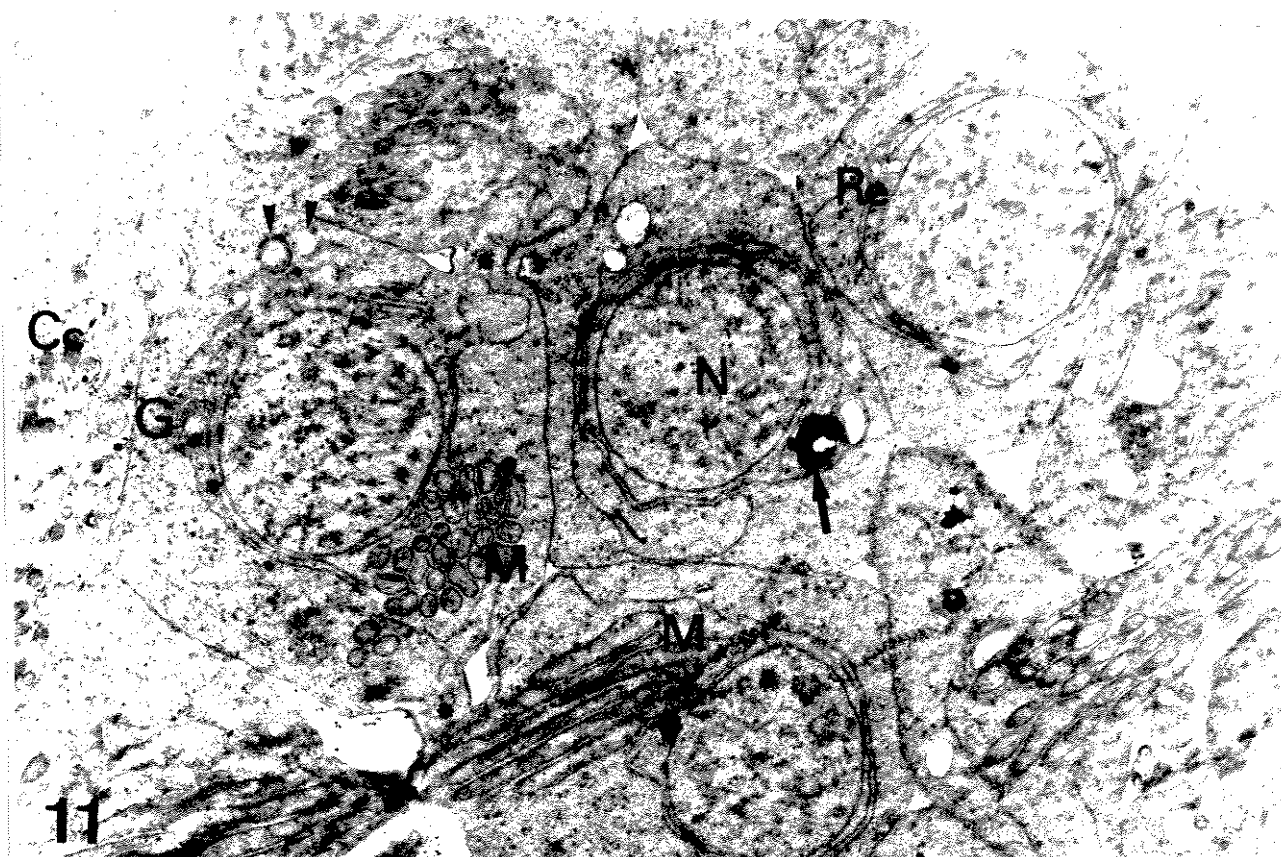


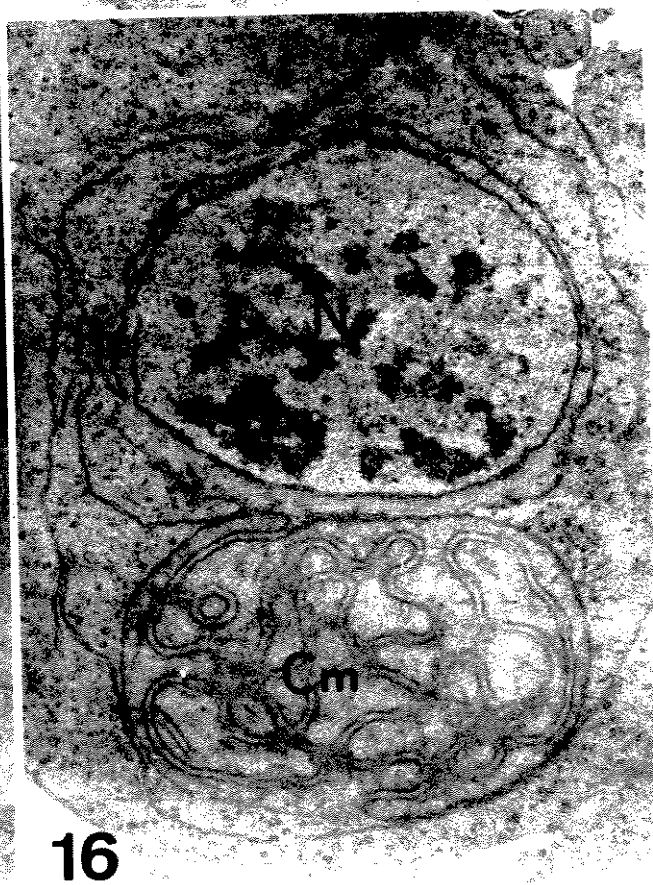
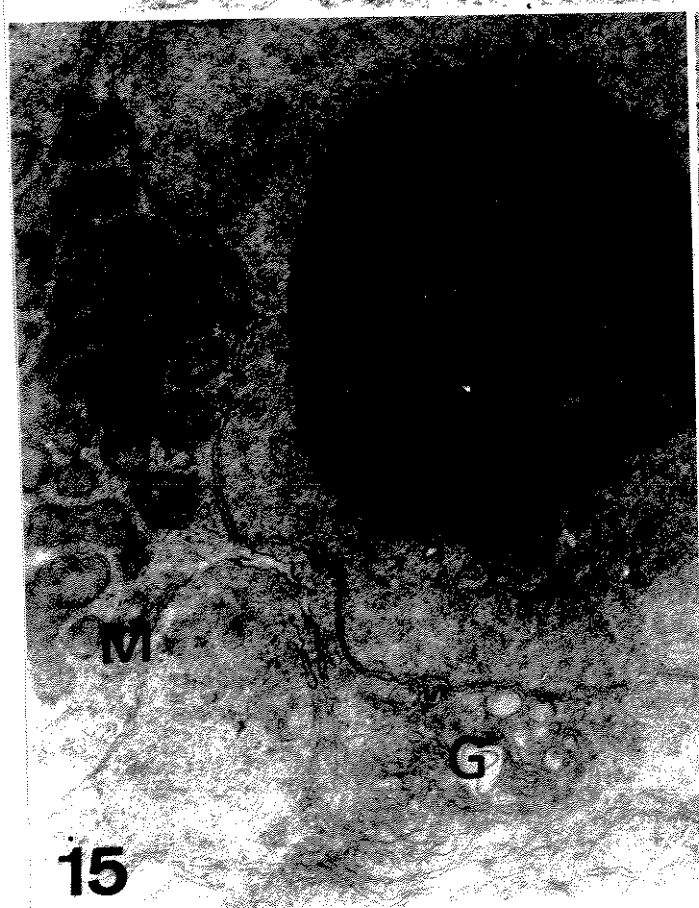
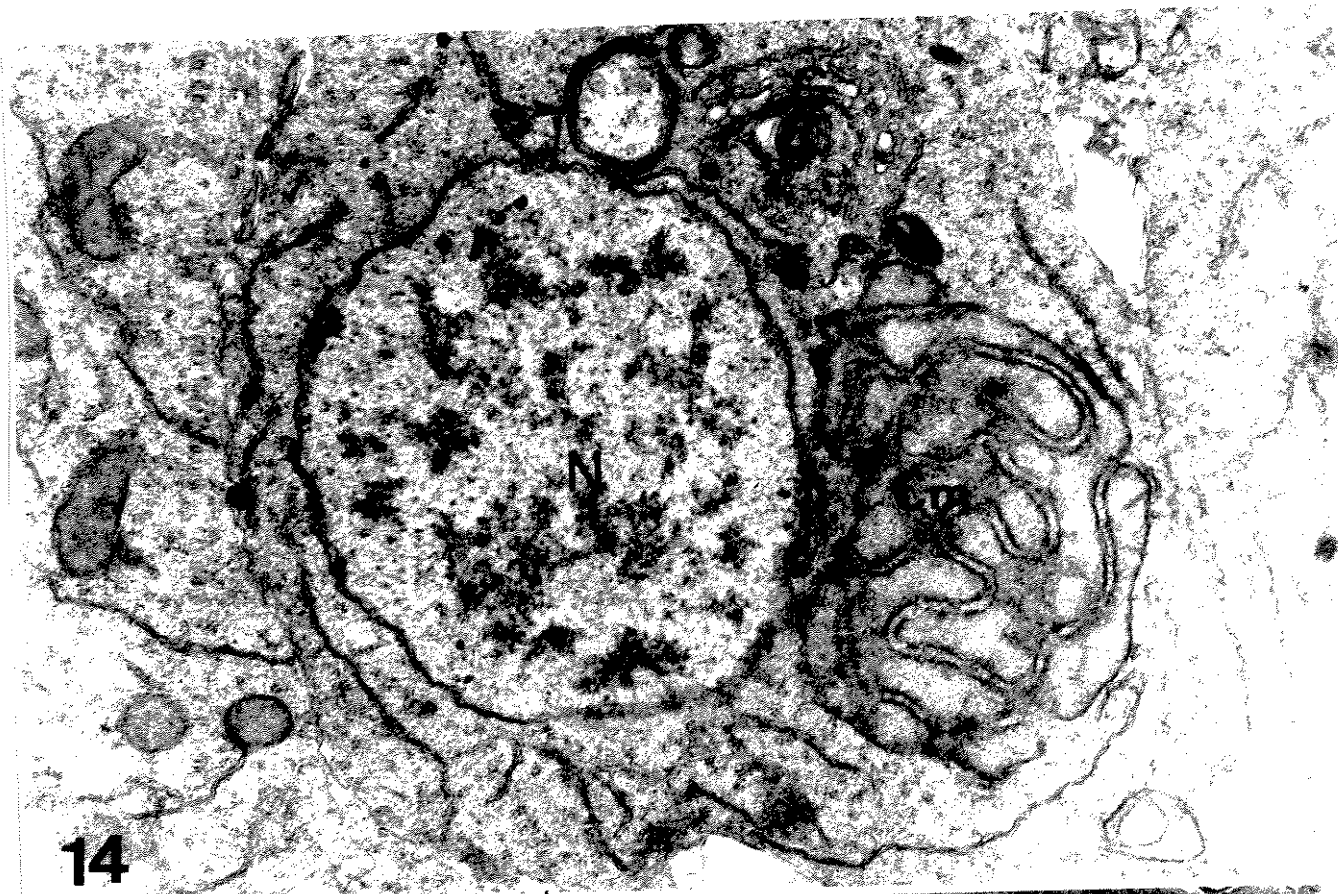


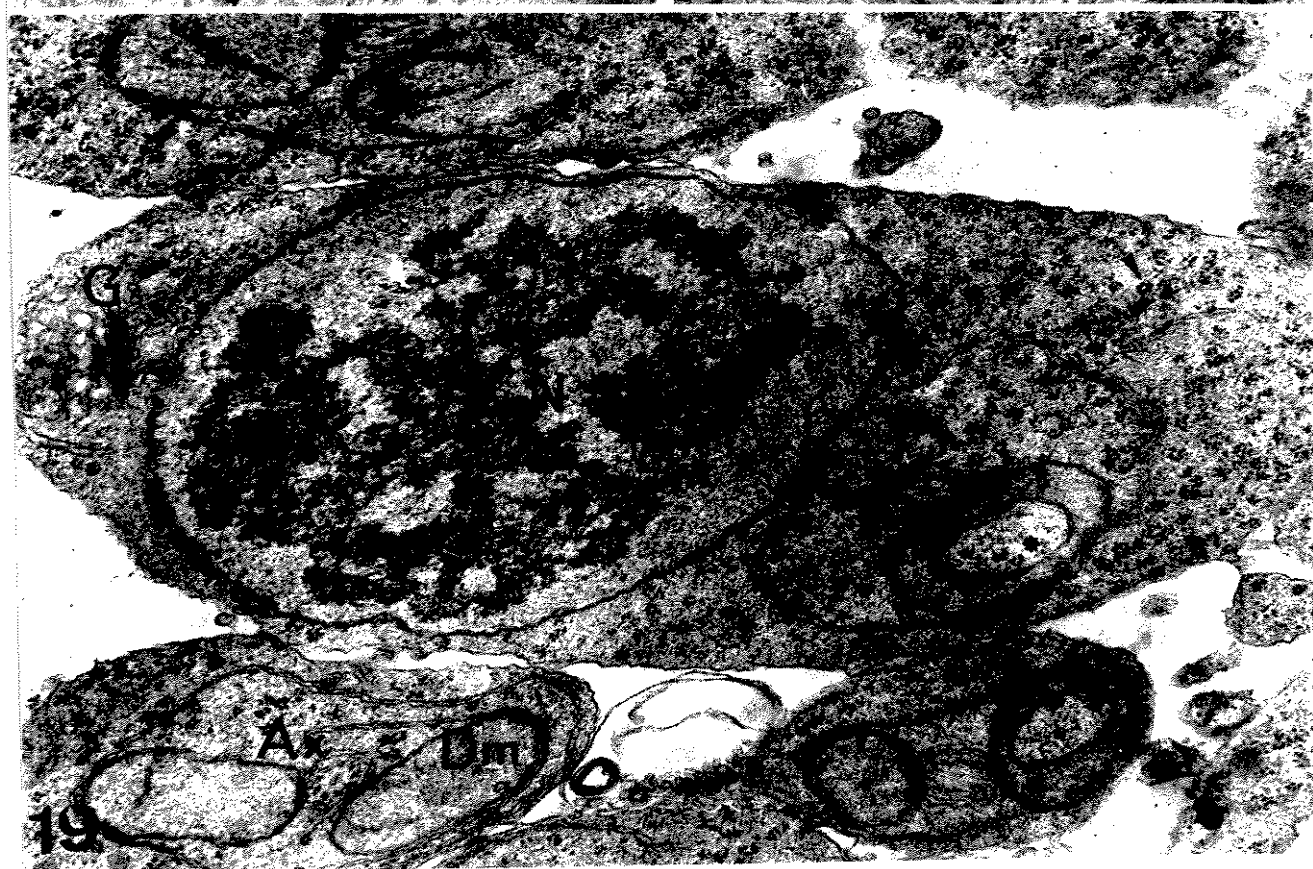
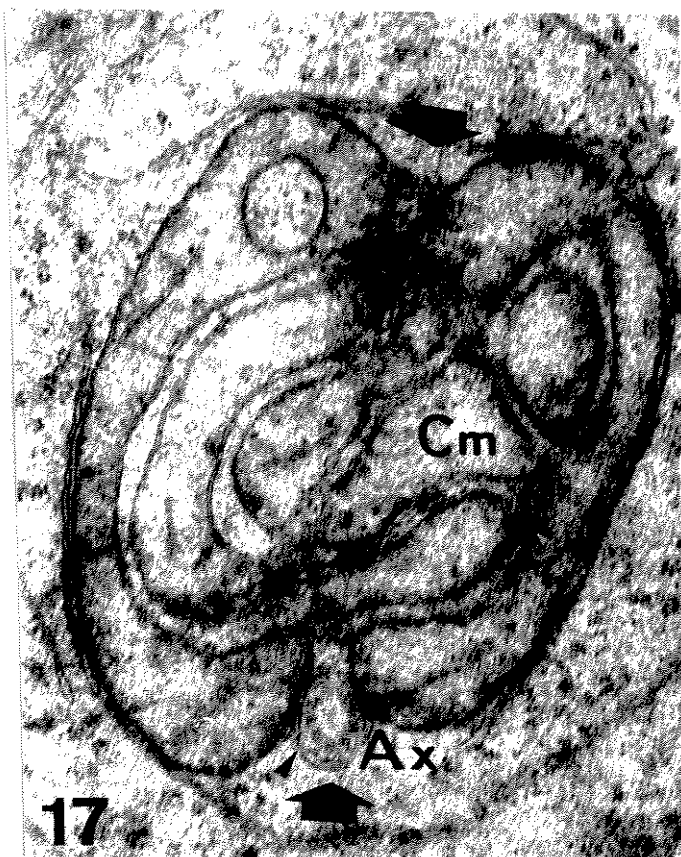


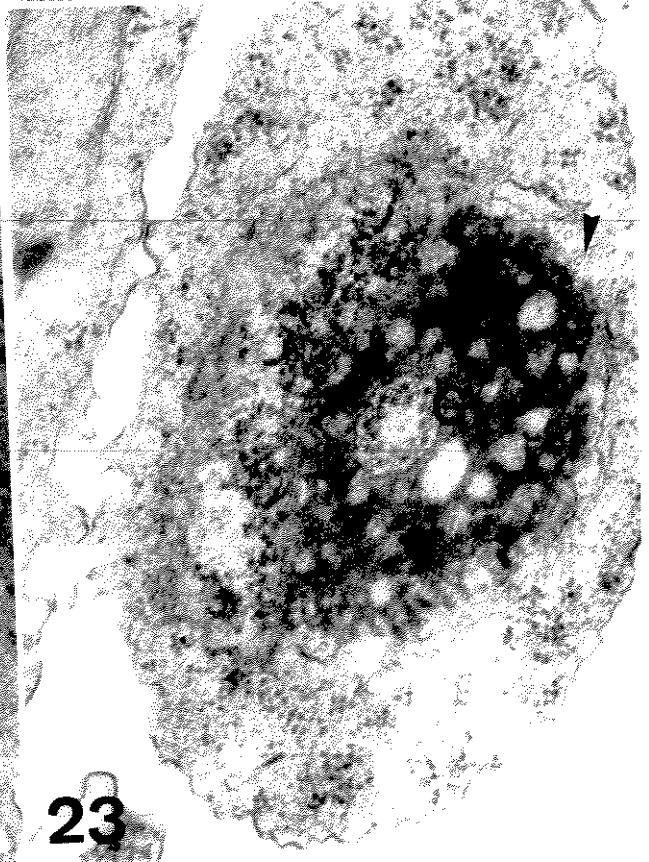
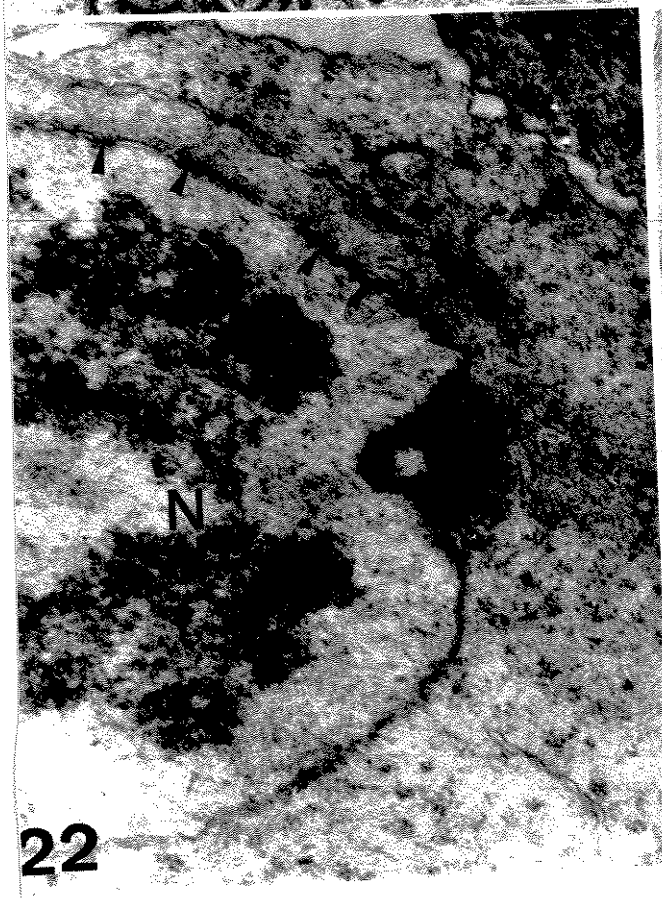
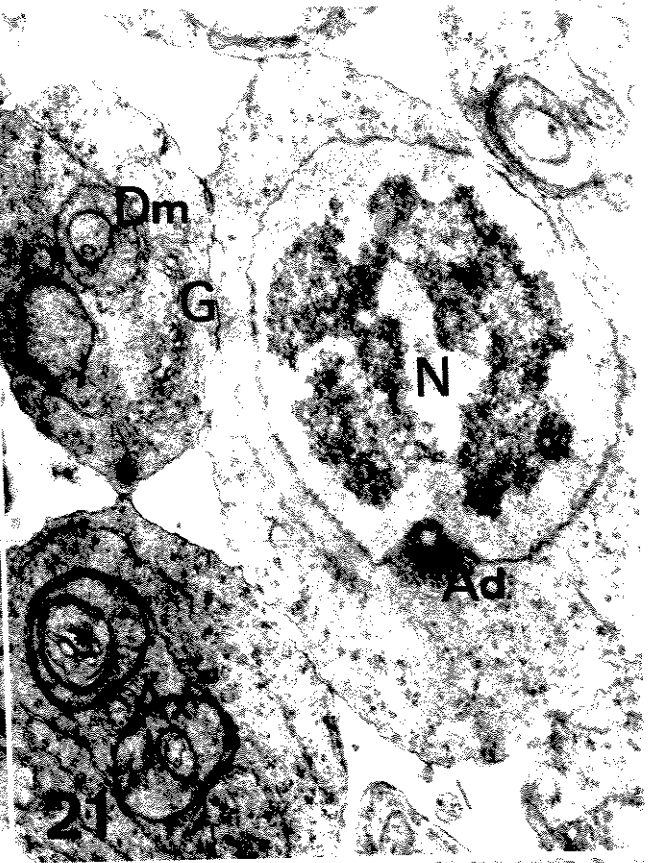
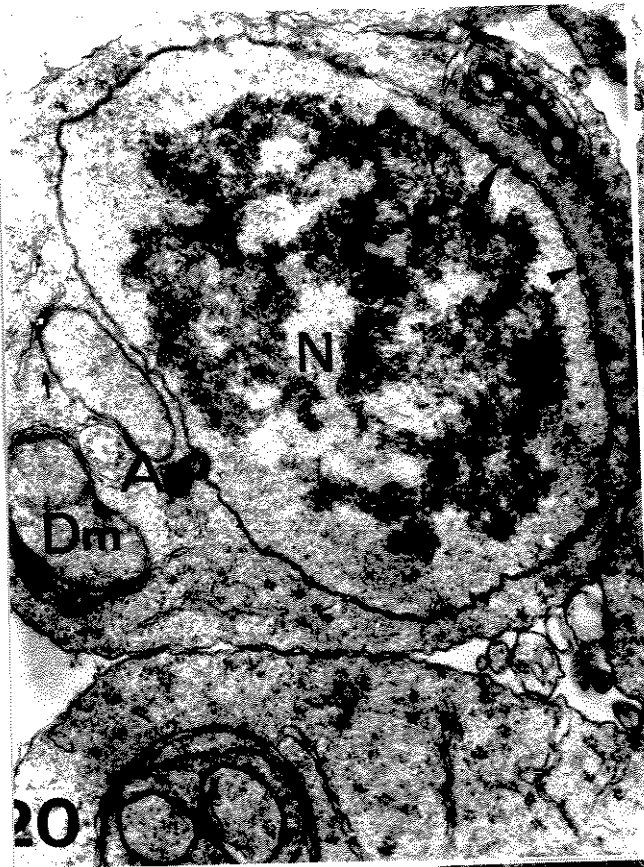
Estádios da Espermiogênese

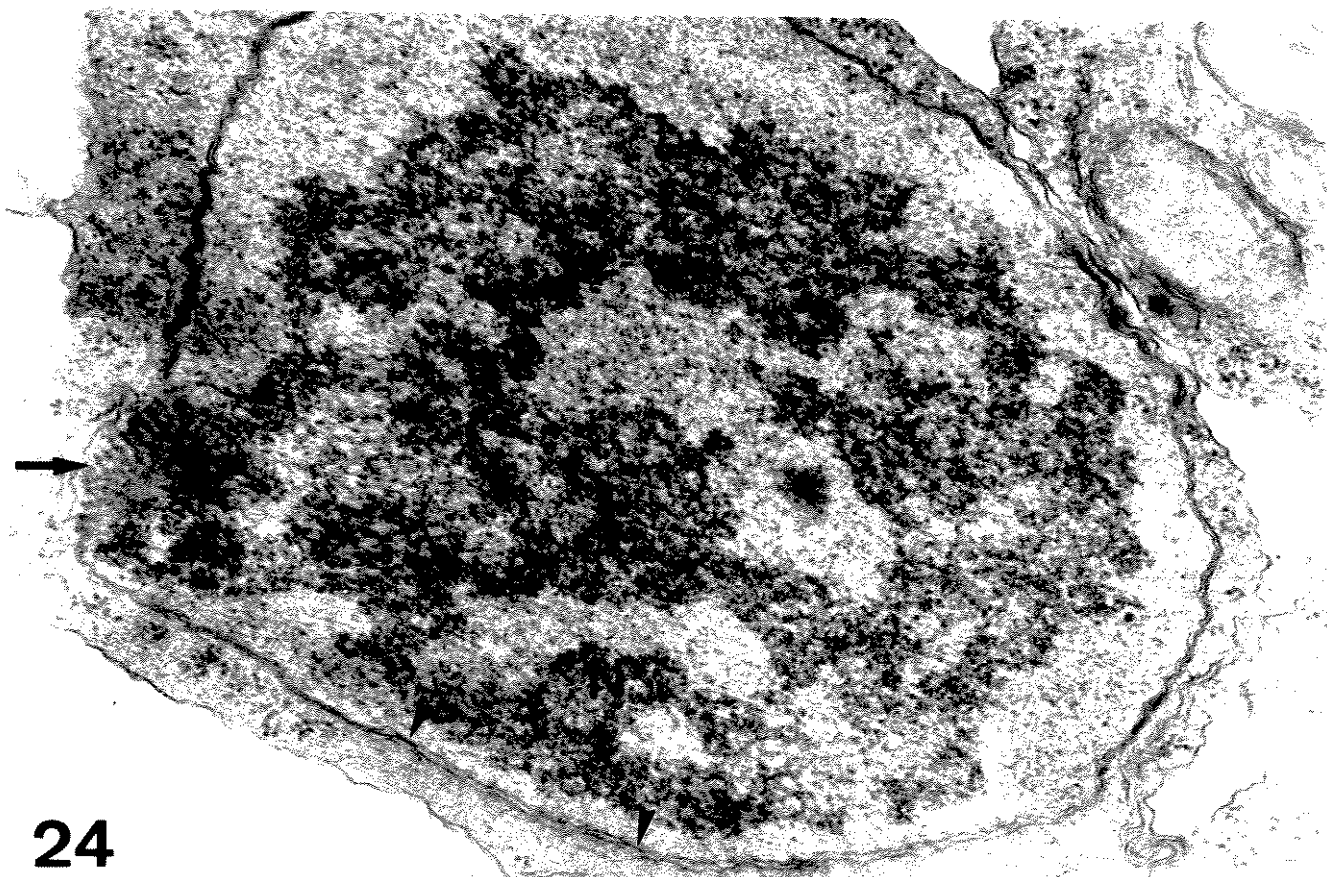








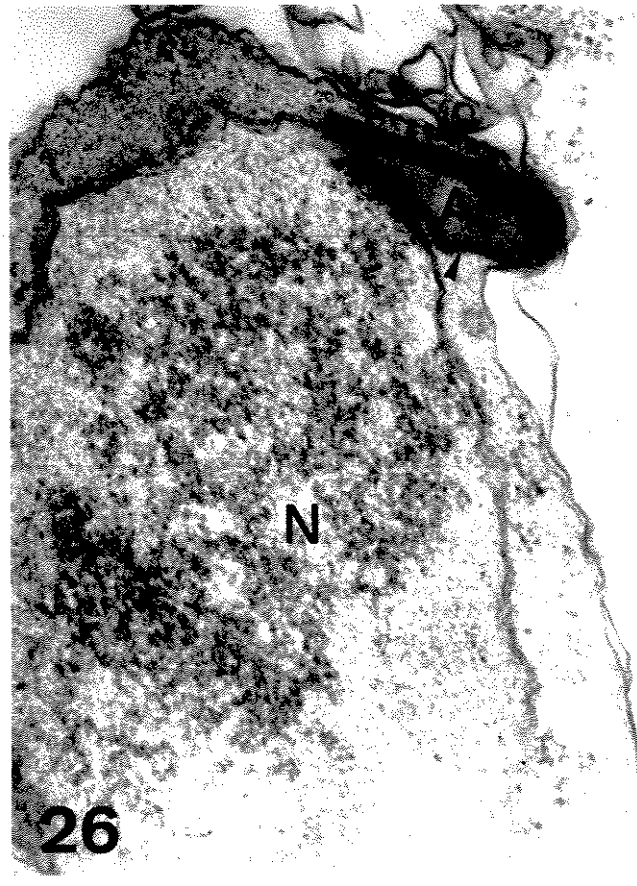




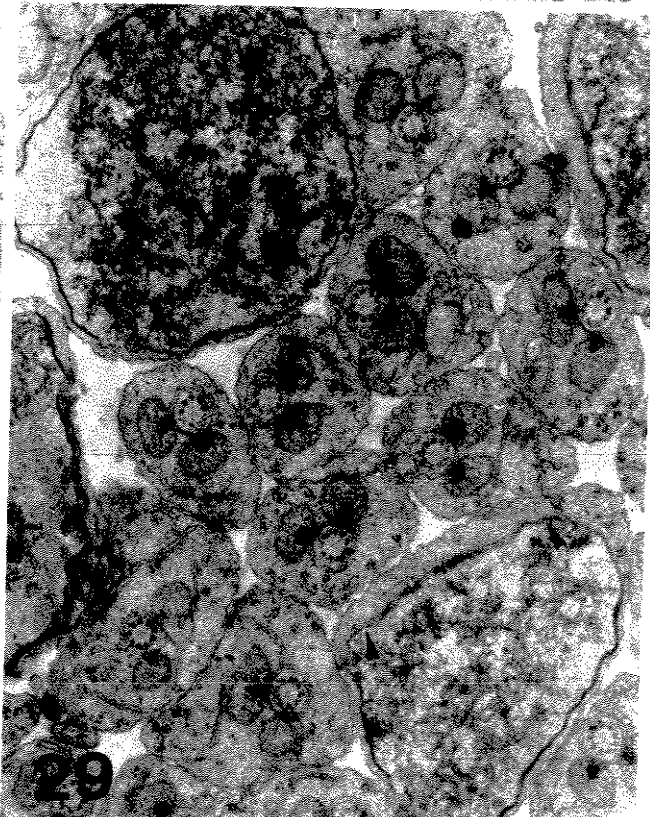
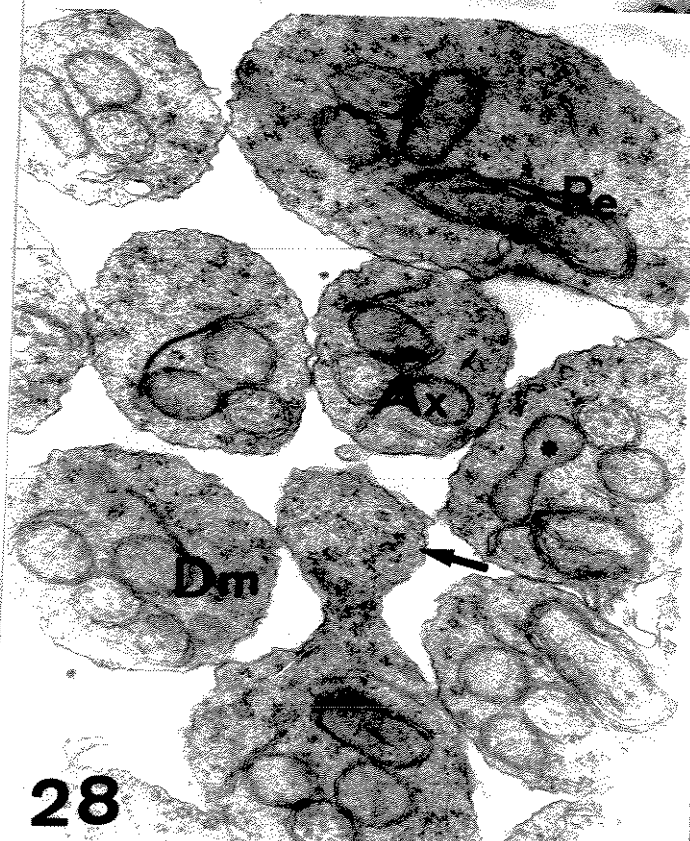
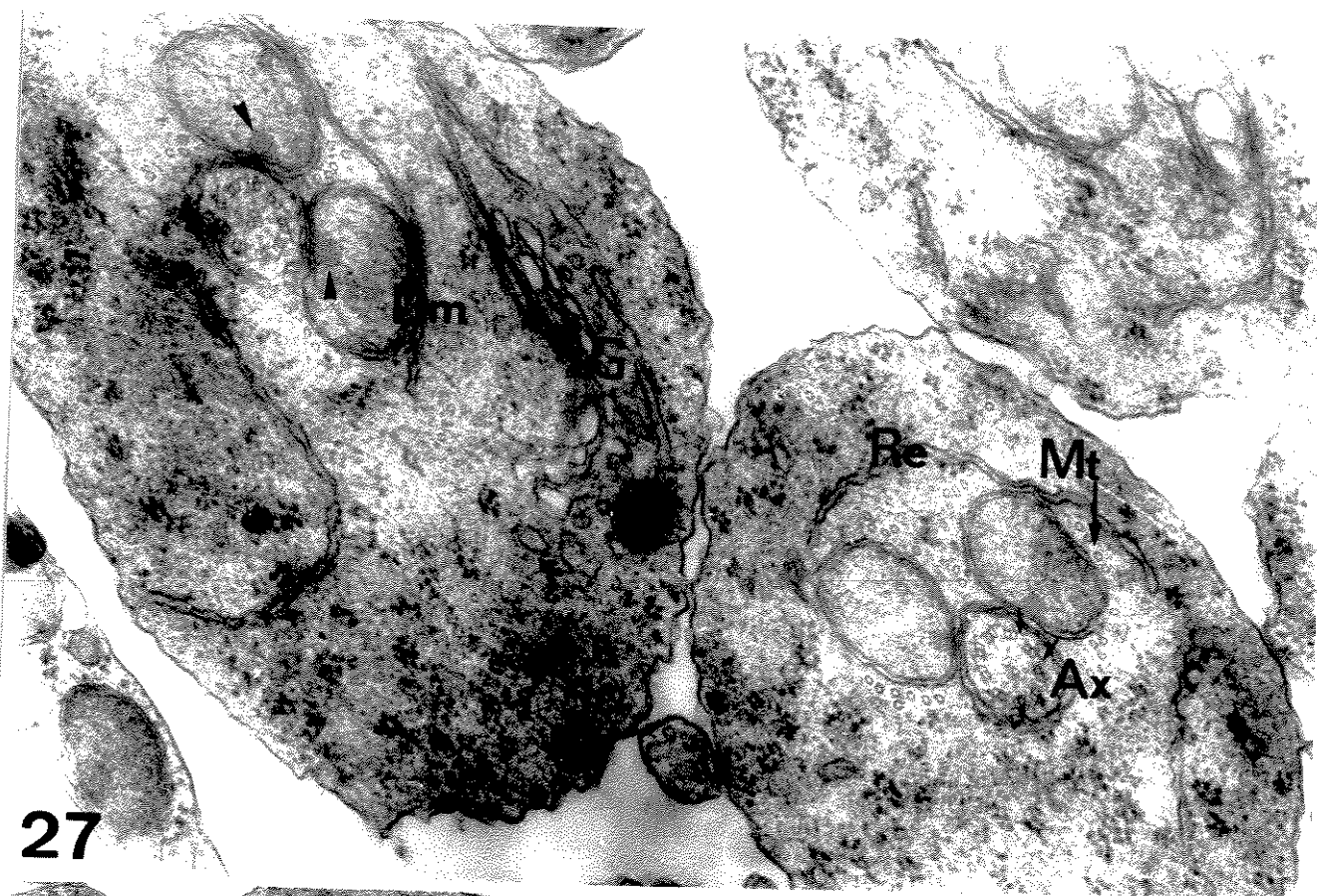
24

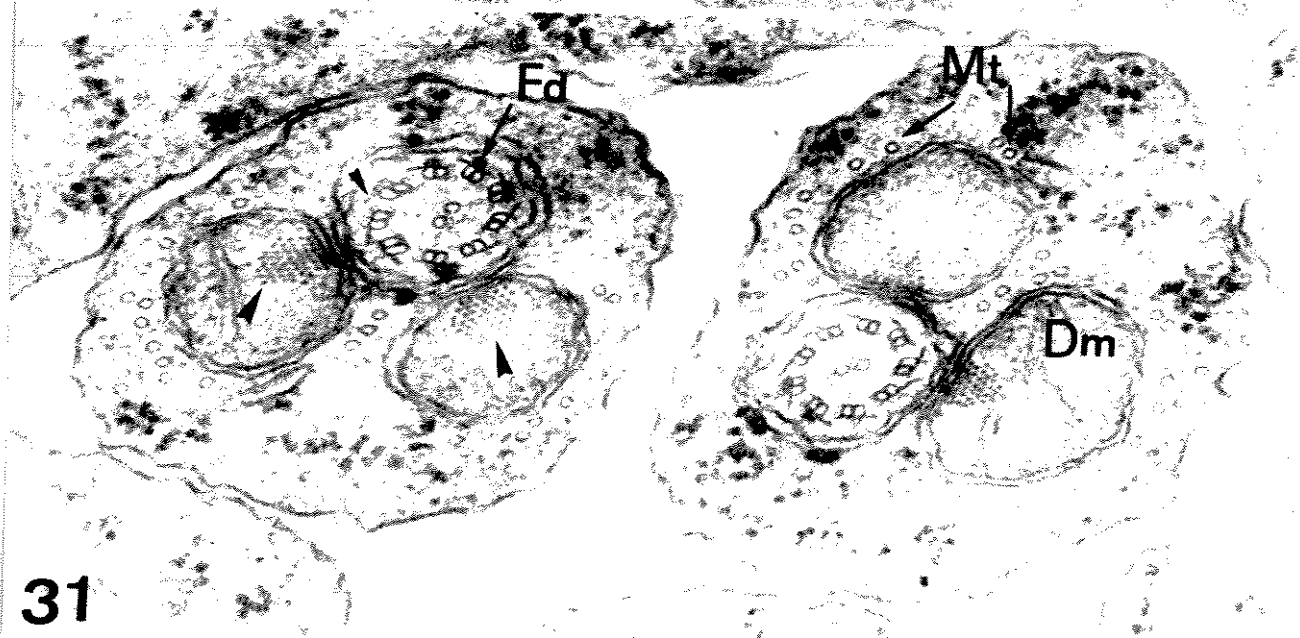
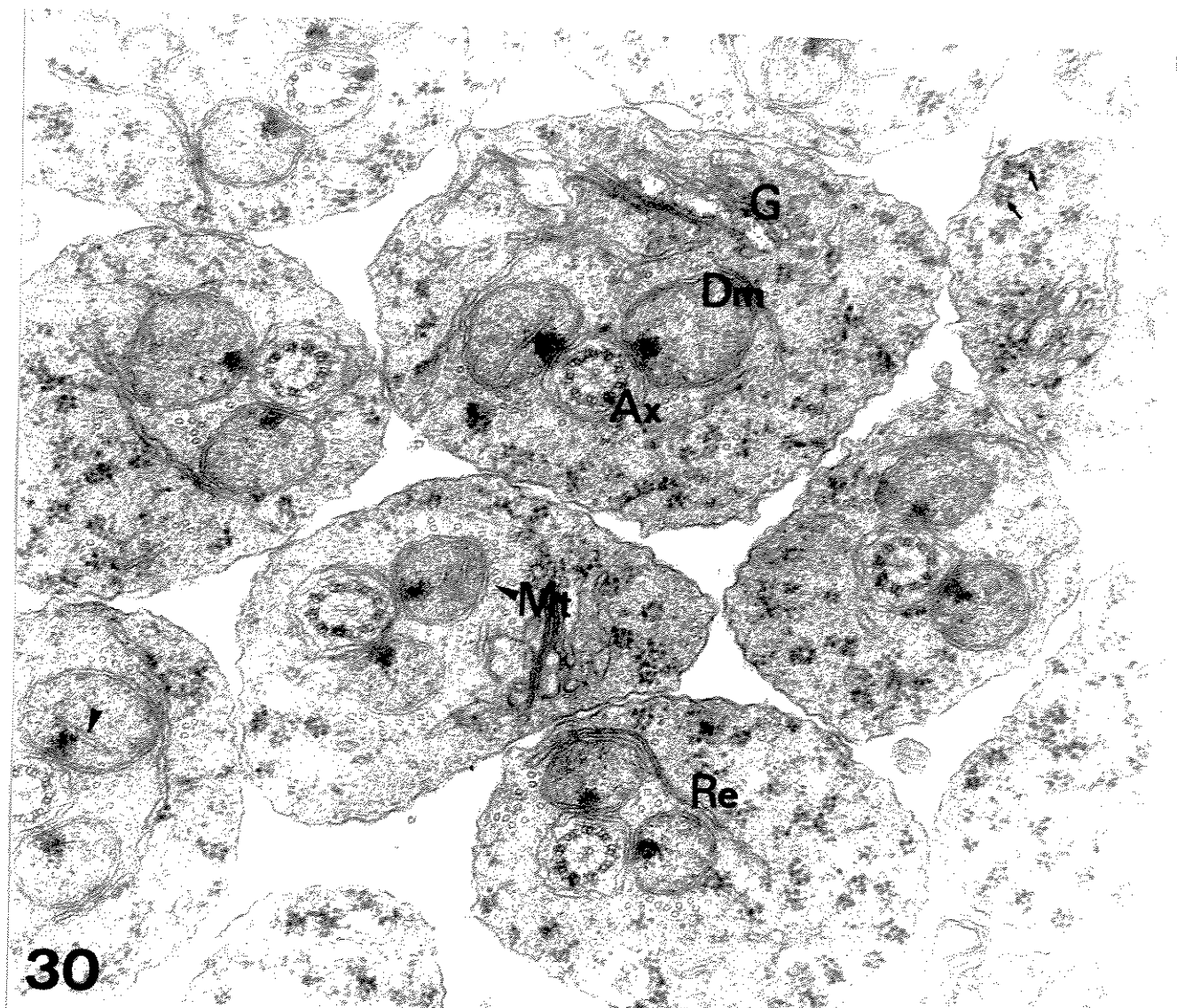


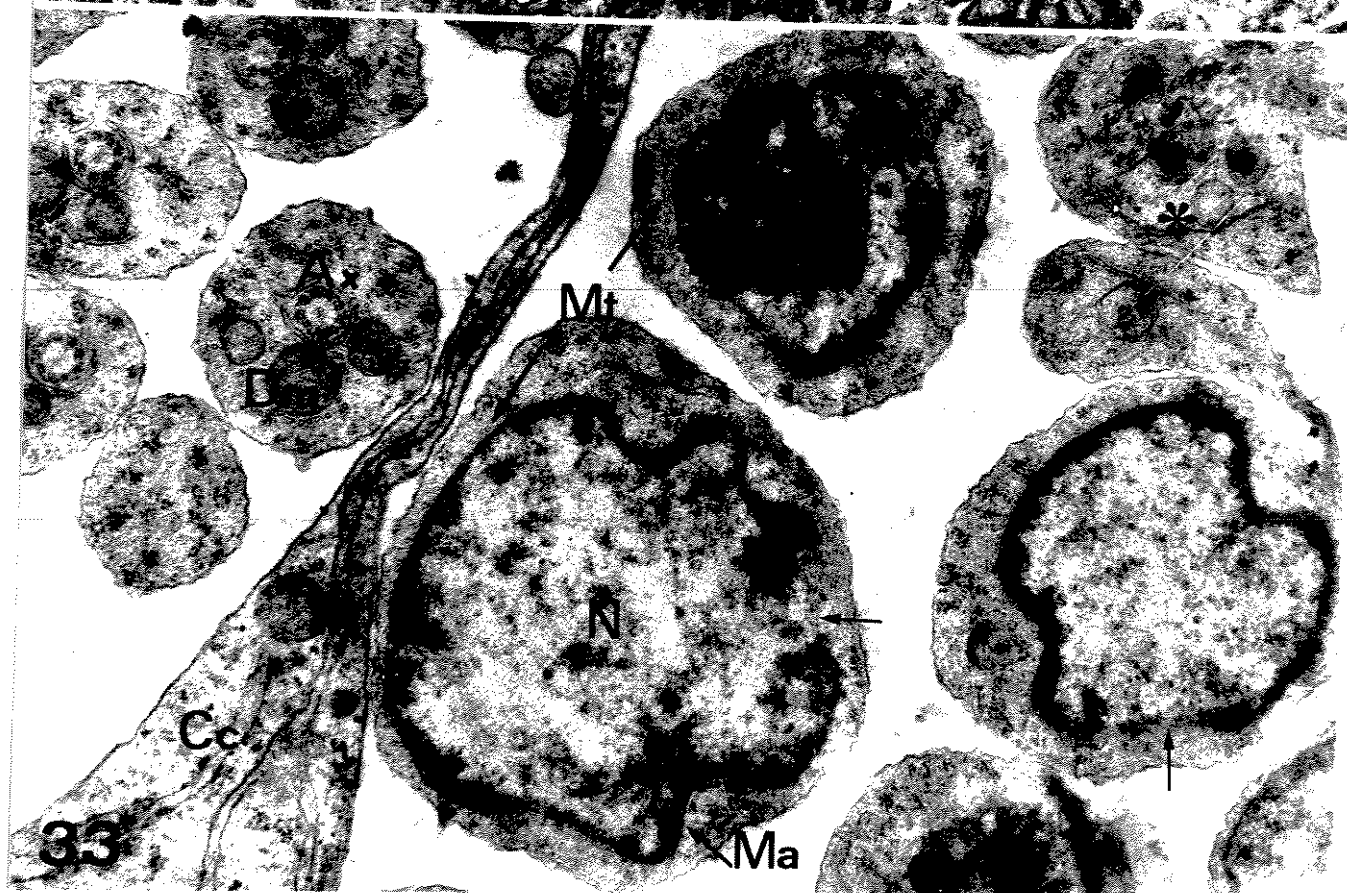
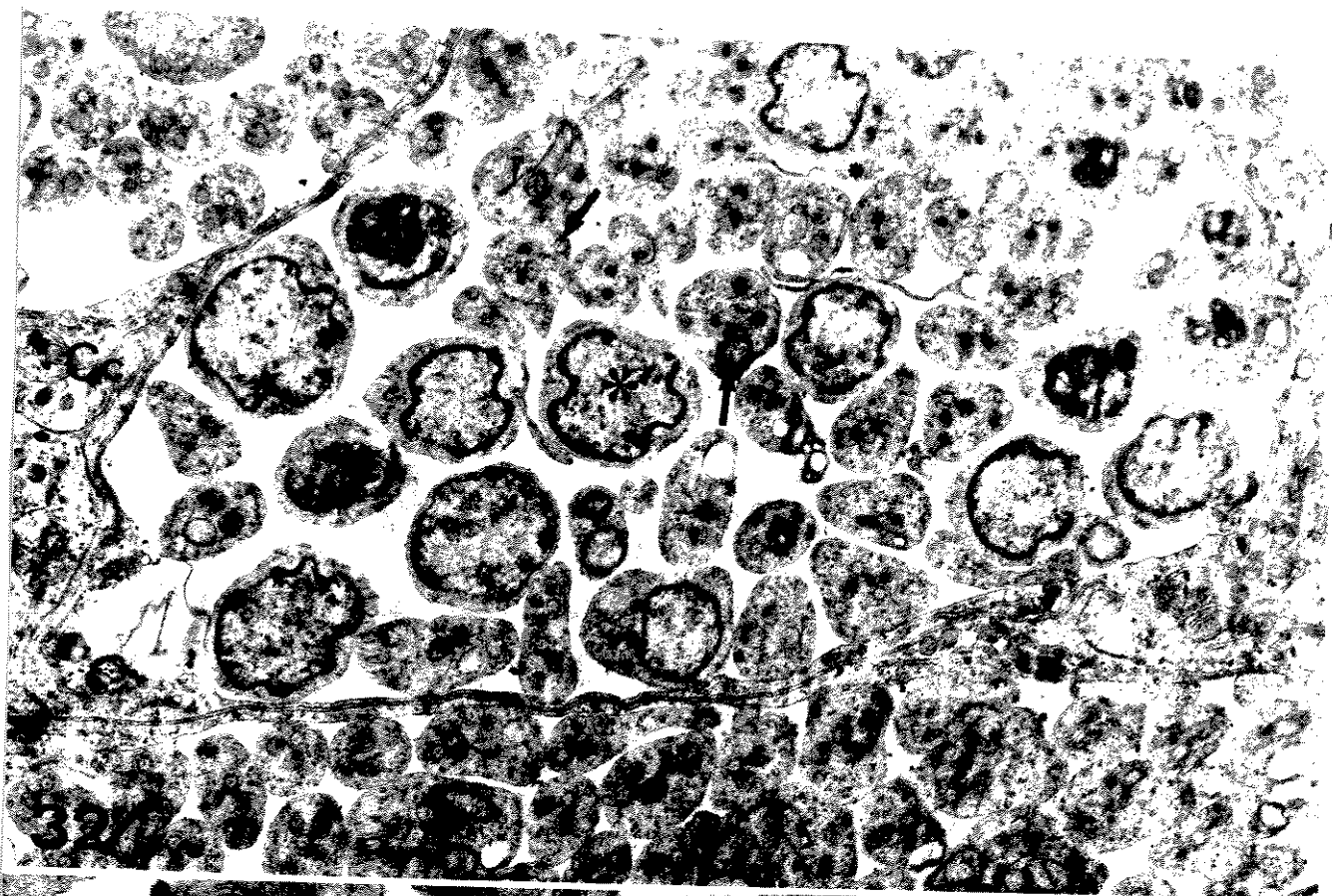
25

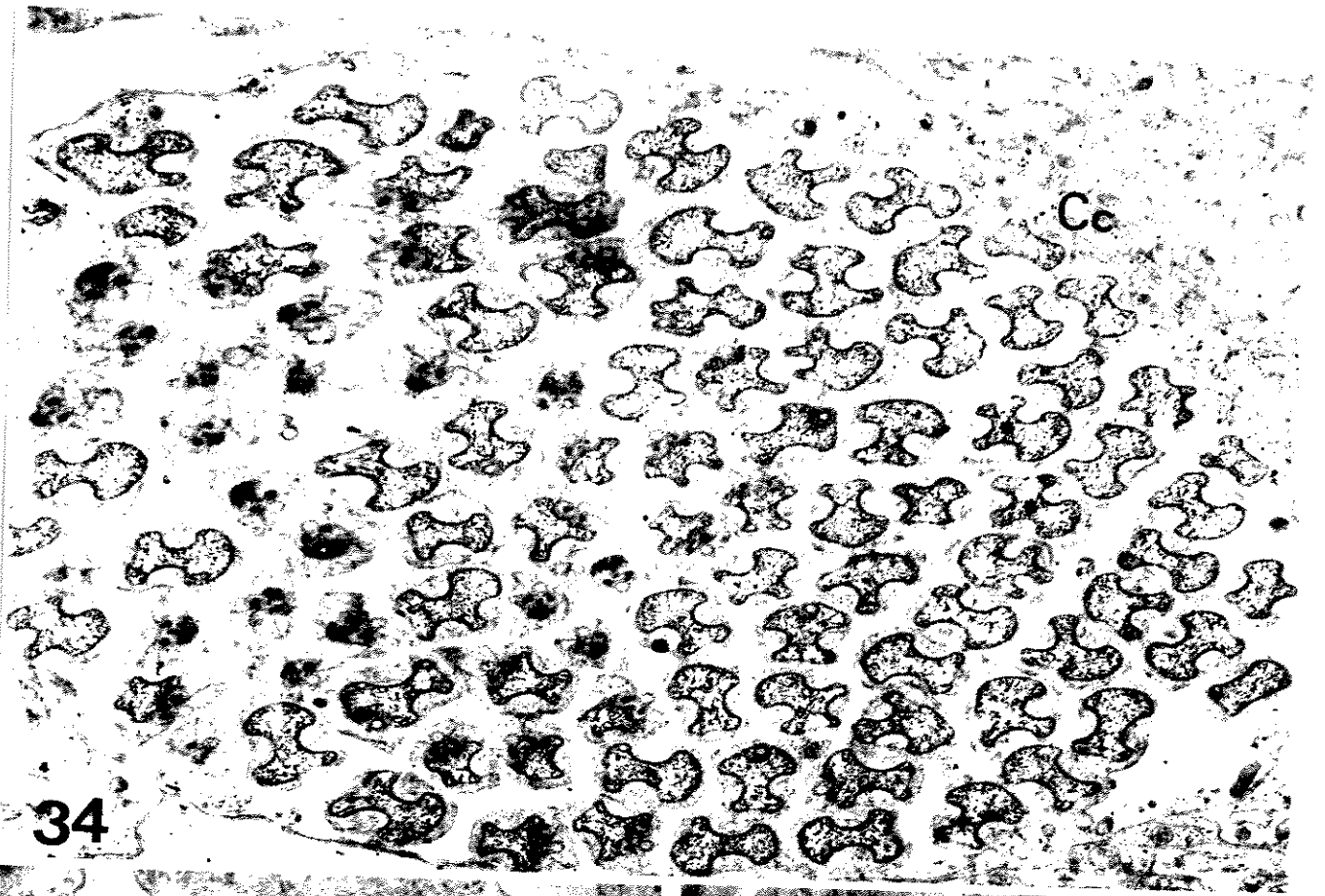


26





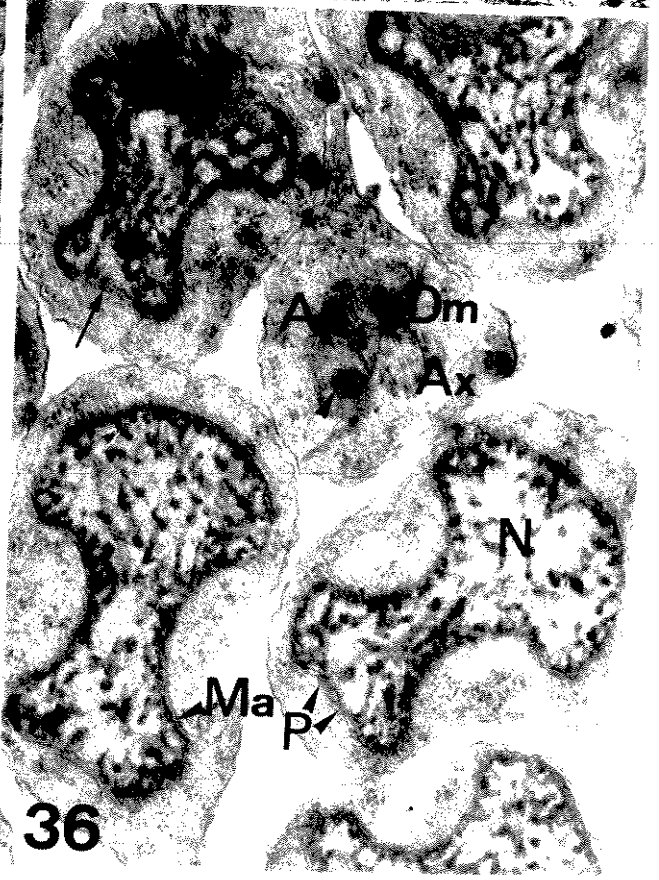




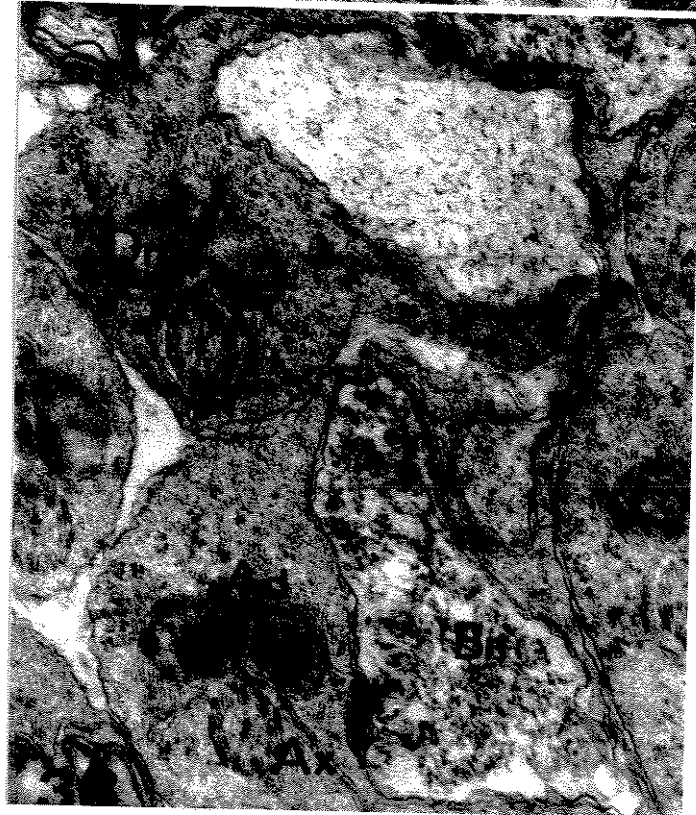
34

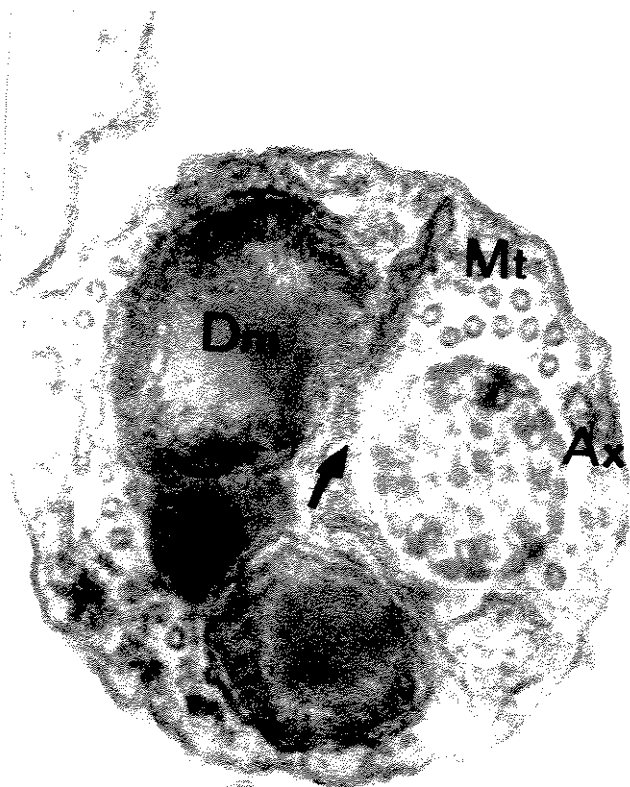


35

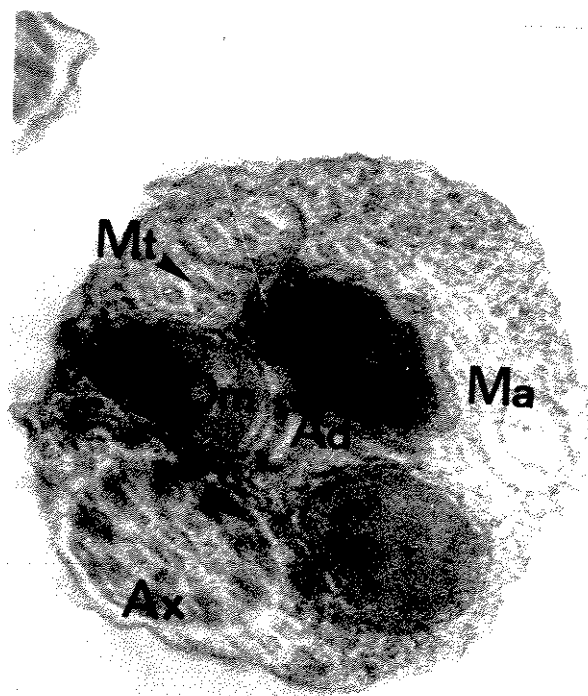


36

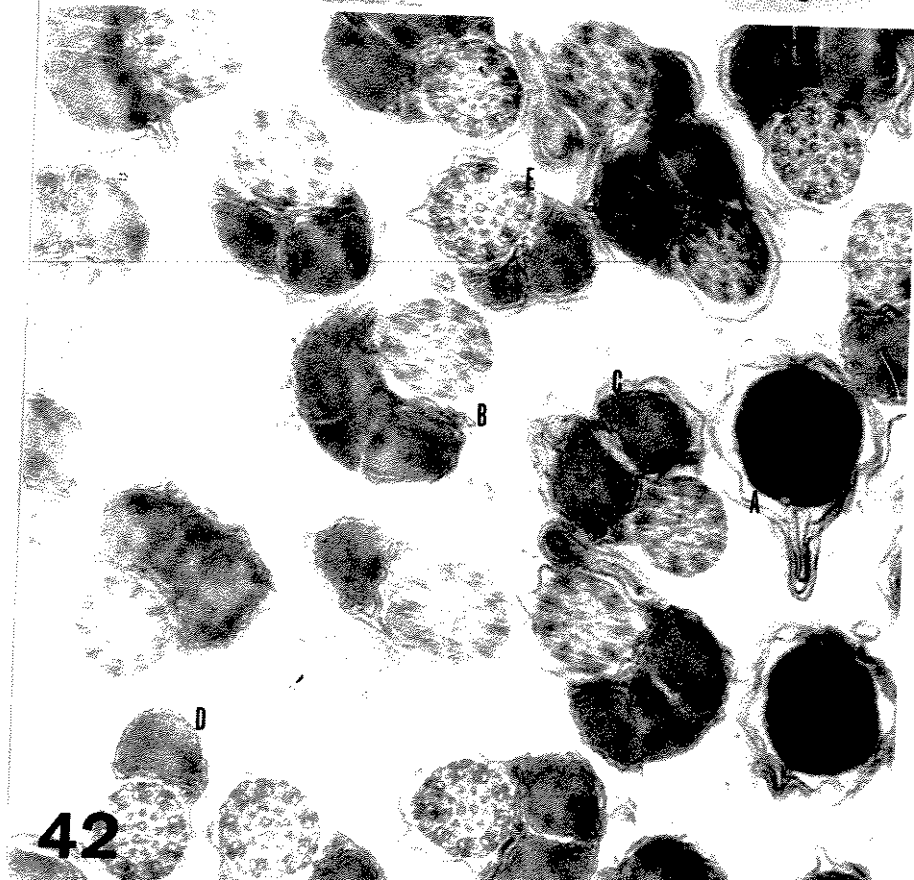




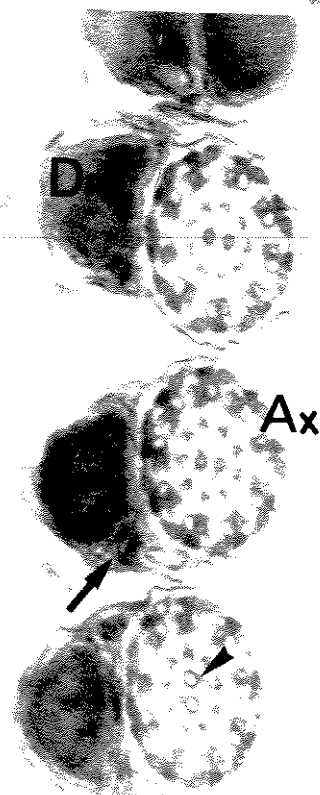
40



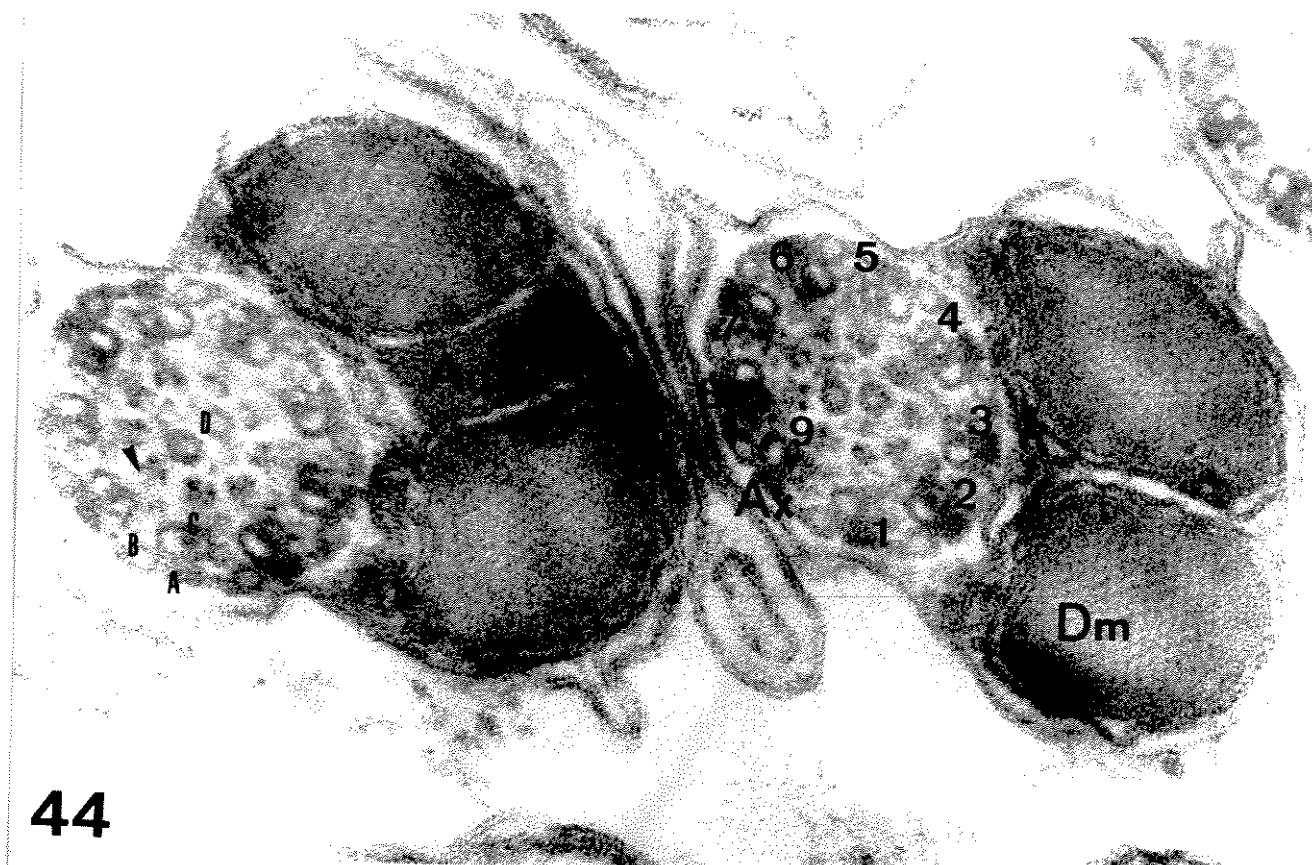
41



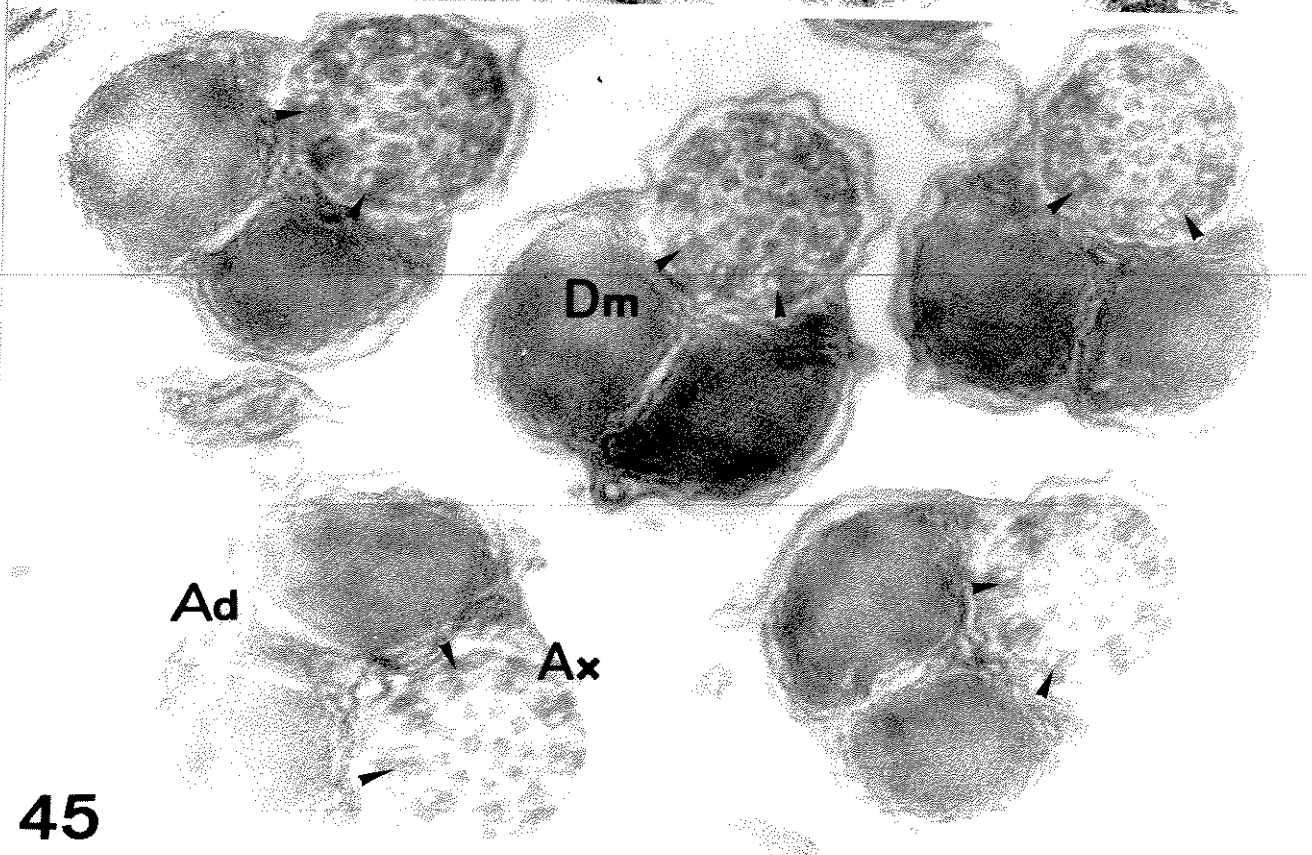
42



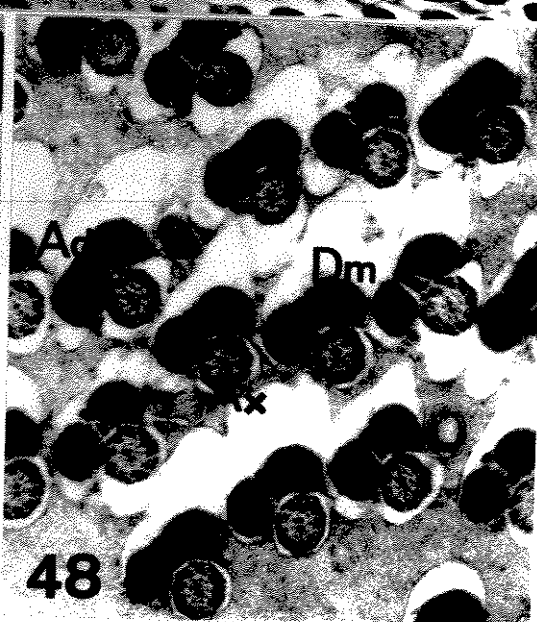
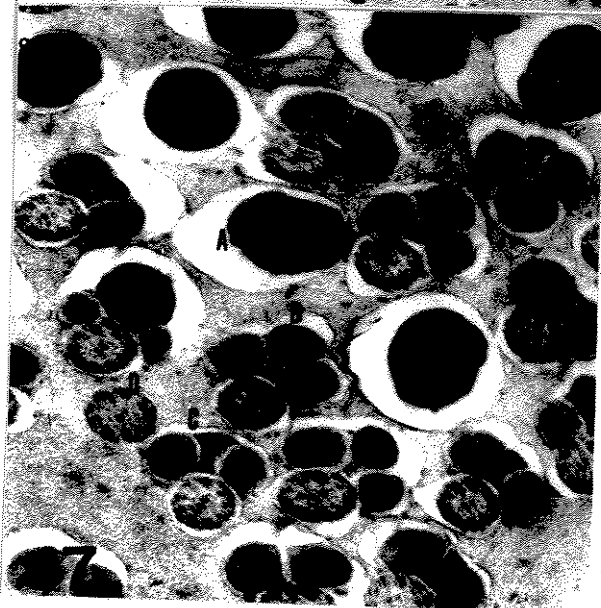
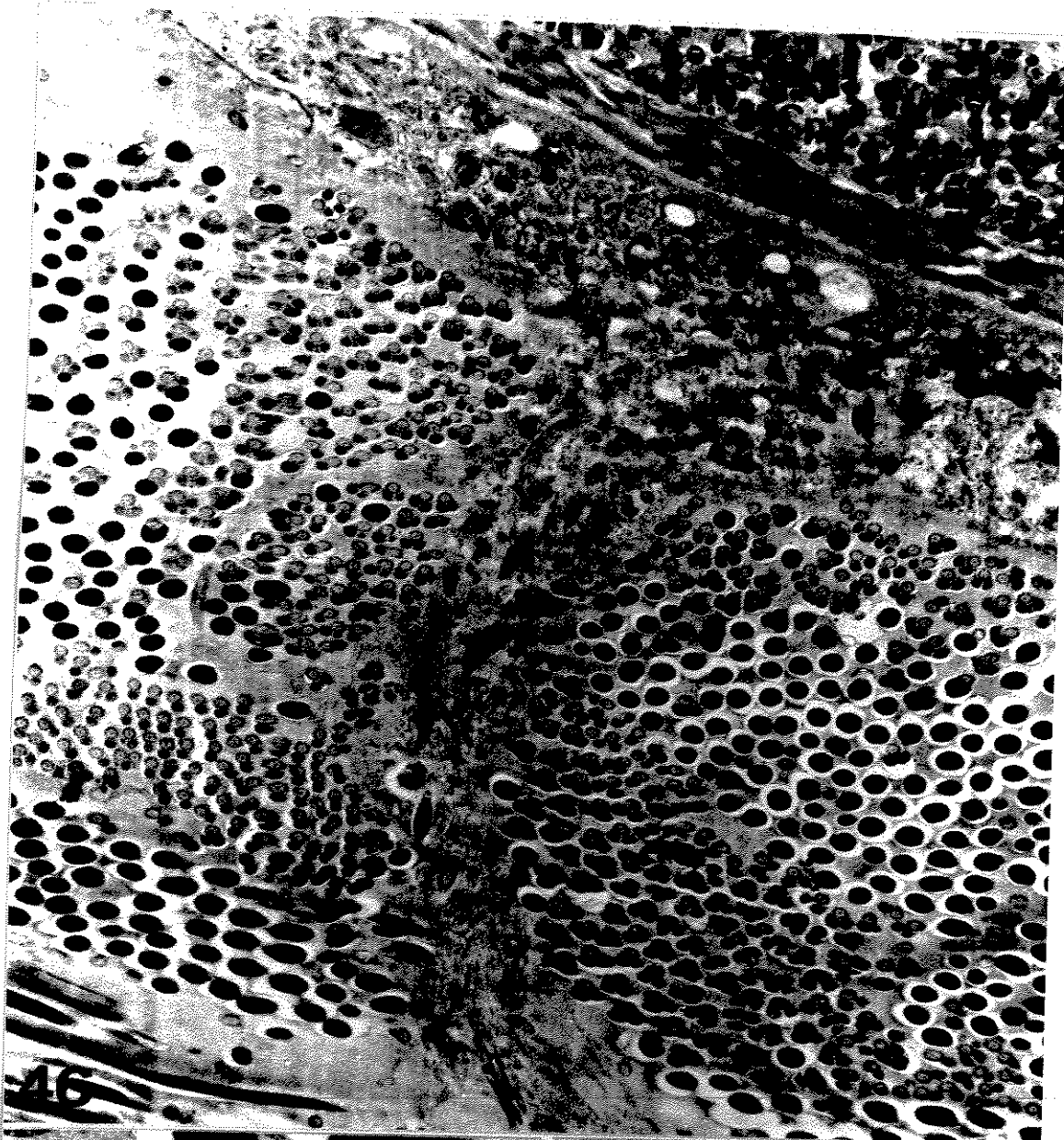
43



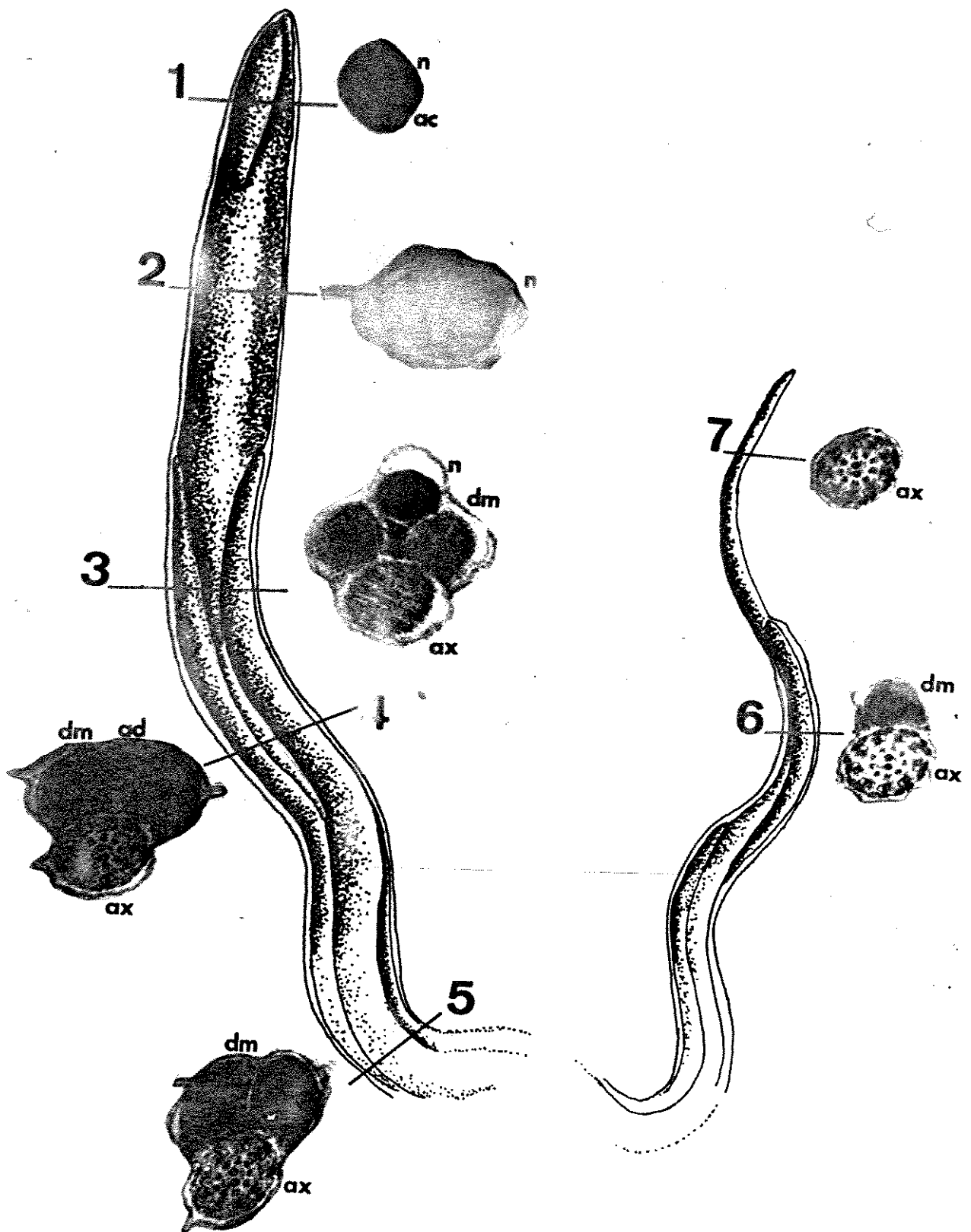
44

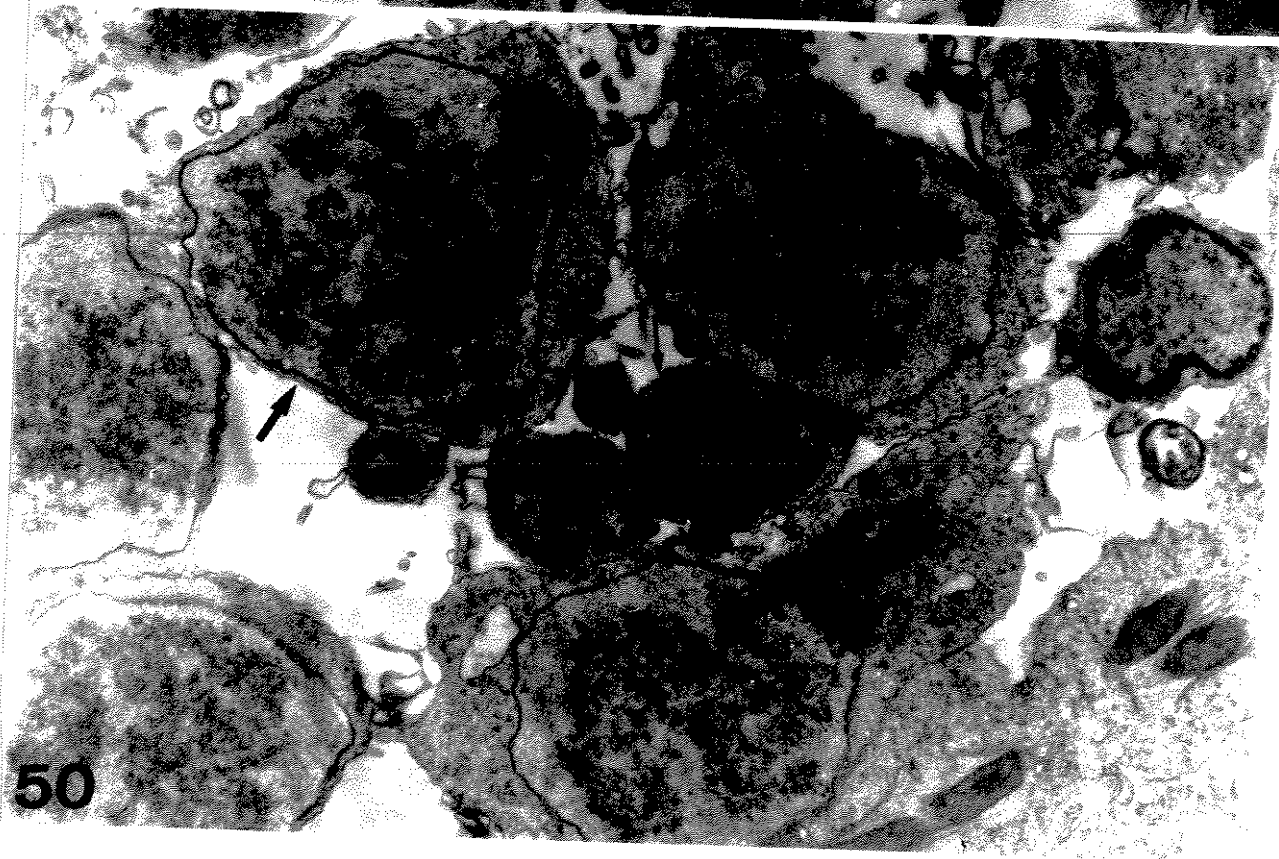
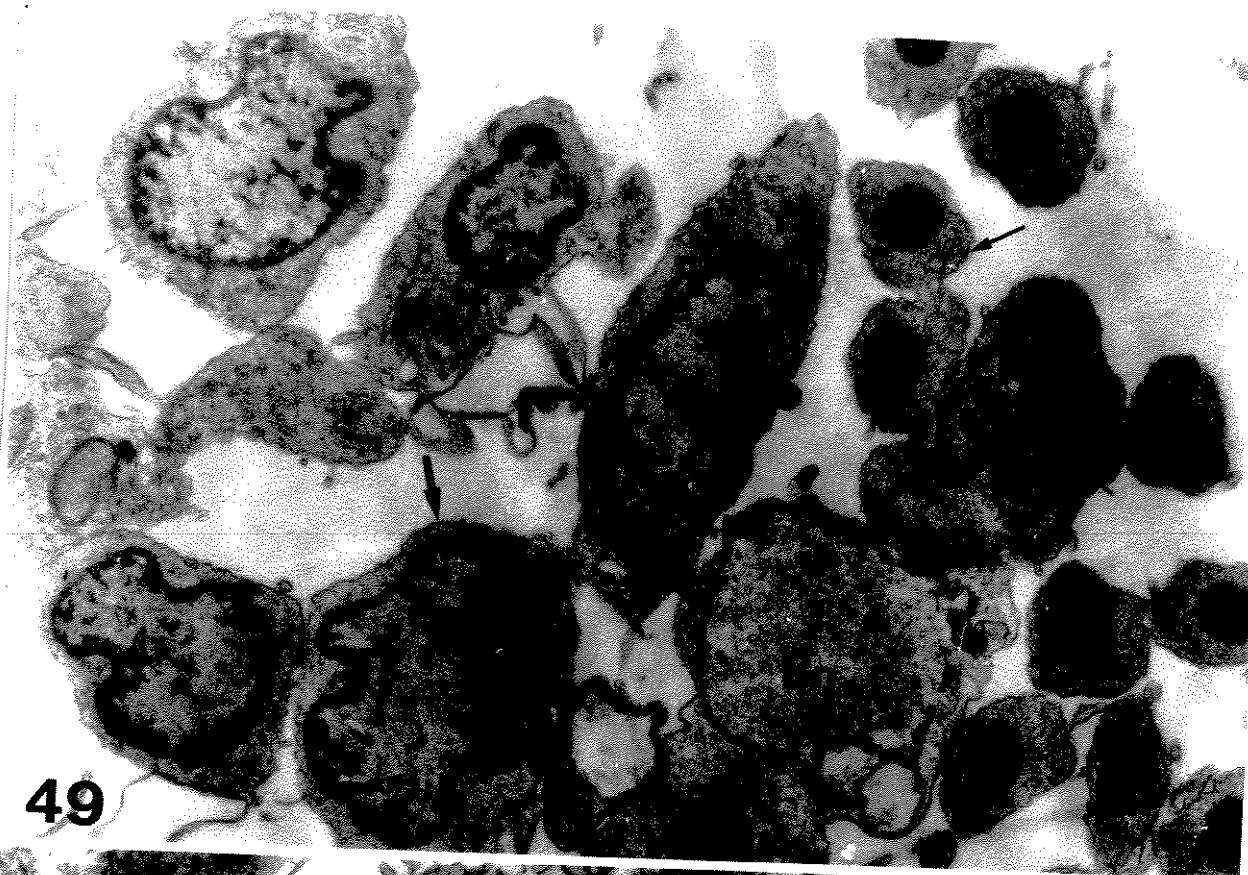


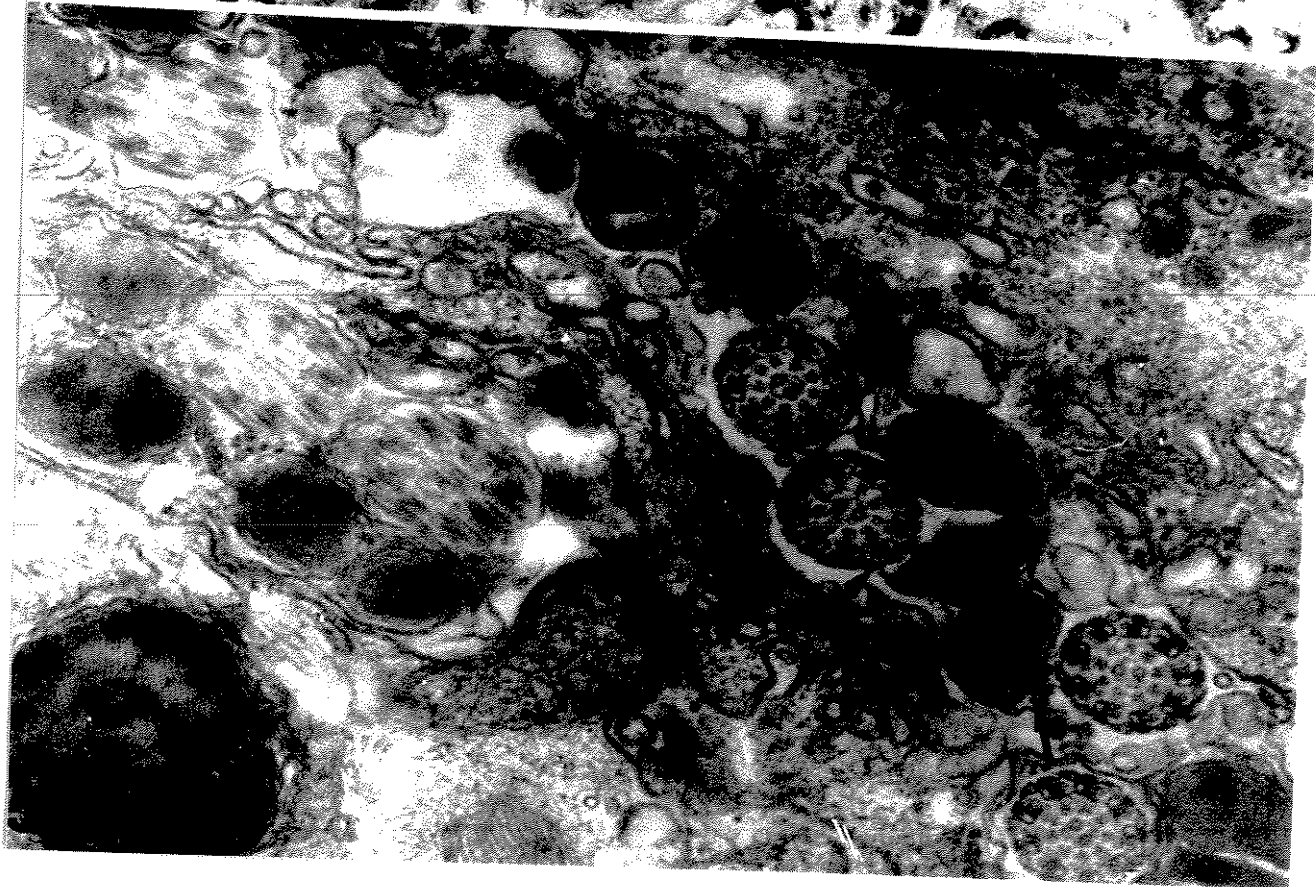
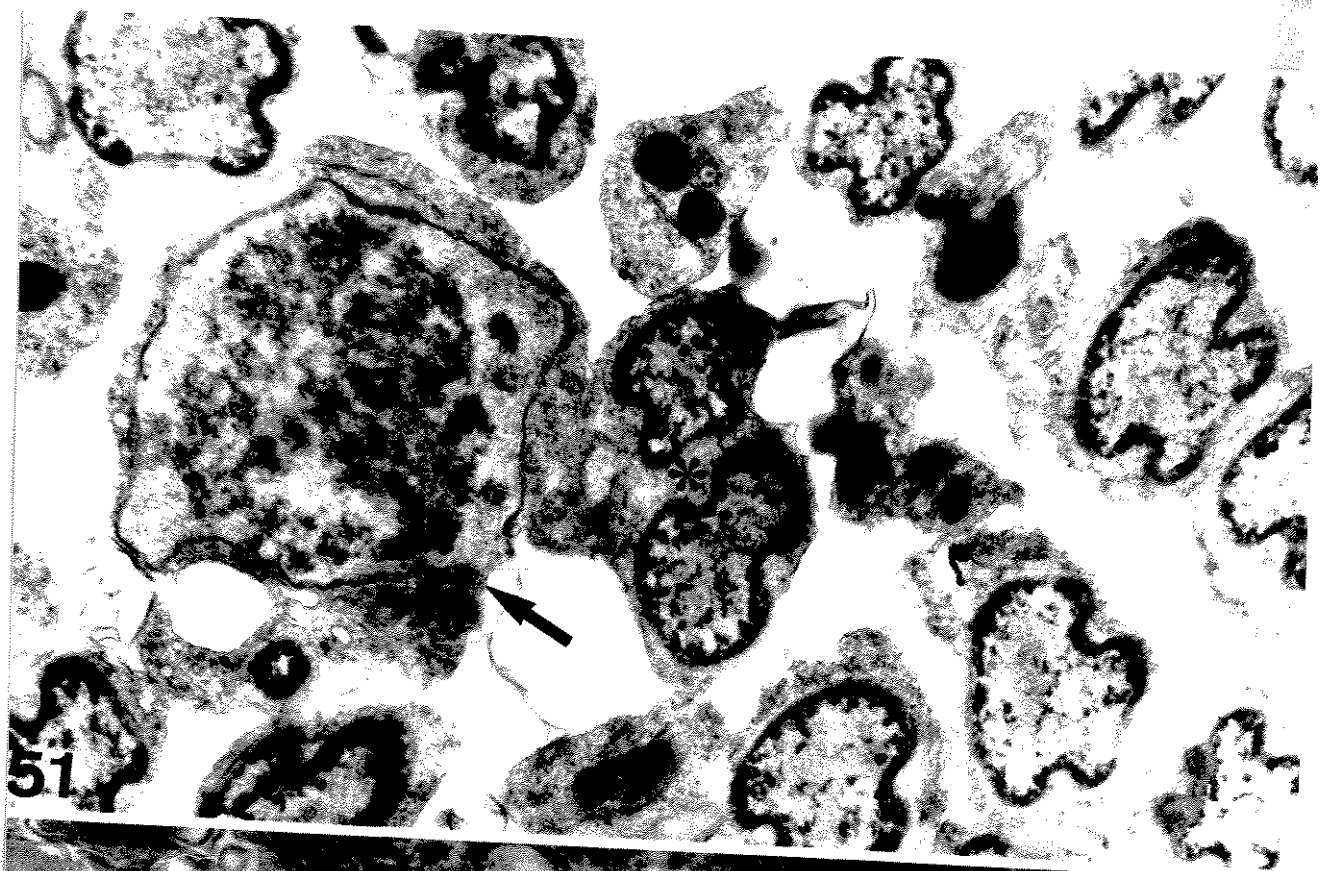
45

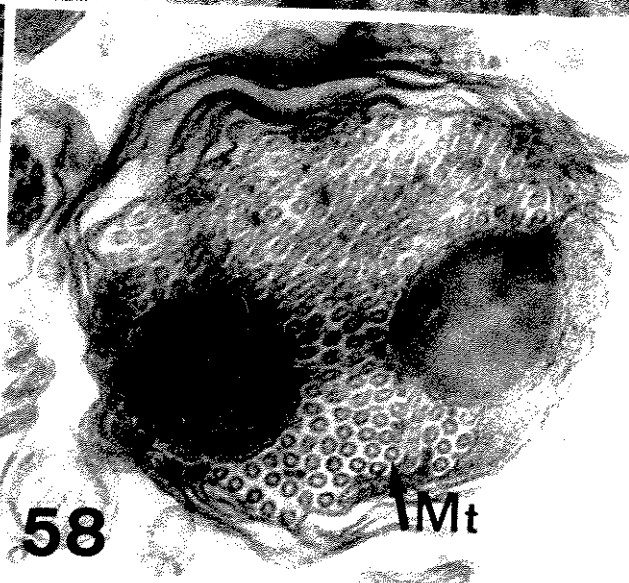


Estrutura do Espermatozóide









DISCUSSÃO

4. 1. A ULTRA-ESTRUTURA DA PAREDE DA GÔNADA

A ultra-estrutura da parede da gônada dos insetos tem merecido pouca atenção dos autores que se dedicam a estudos sobre espermiogênese. A parede da gônada de *Chrysomya megacephala* apresenta uma organização tecidual semelhante àquela descrita por BAO (1987) para *Ceratitis capitata*. O exame ultra-estrutural das células do epitélio pigmentado de revestimento do testículo de *C. megacephala*, revela a presença de um grande número de grânulos citoplasmáticos eletrodensos. Assume-se que estes grânulos contenham os pigmentos responsáveis pela coloração do órgão. Isto fundamenta o estabelecimento de uma relação entre o aumento na intensidade de coloração e o incremento no número de grânulos que se observa com o envelhecimento dos animais. A camada muscular é constituída por células musculares estriadas do tipo visceral, prevalente nos insetos (HARWOOD, 1988).

4. 2. OS CISTOS

Nos insetos, o cisto tem despertado interesse no sentido de que se delineia a participação de células sustentaculares ou císticas, na organização de uma barreira hemato-testicular. SZOLLOSI & MARCAILLON (1977), ao estudarem a gônada de *Locusta migratoria*, definiram pelo menos duas regiões no órgão que são distintas quanto à permeabilidade a traçadores eletrodensos: uma porção permeável (apical) e outra impermeável (basal). Os autores atribuíram este aspecto à presença de um tipo de célula somática denominada "célula parietal interna", que possui junções do tipo oclusivo. Porém, SZOLLOSI et alii (1980), ao fazerem observações nas gônadas de *Anagasta kuehniella*, sugeriram a existência de uma barreira a nível de célula cística. Igualmente, foram descritas especializações juncionais em células císticas de *Bombyx mori* (TOSHIMORI et alii, 1979) e de *Triatoma infestans* (MIRANDA & CAVICHIA, 1988). BALDWIN et alii (1987) assinalam a existência de "uma barreira hemato-testicular localizada a nível de células somáticas do envelope" (cisto) do lepidóptero *Heliothis virescens*. Deve-se salientar que estes autores utilizaram técnicas de criofratura e traçadores eletrodensos para estabelecer a existência de tais barreiras.

todos esses achados indicam um aspecto aparentemente geral da fisiologia dos insetos que, provavelmente, é de grande importância na seletividade bioquímica do fluido que banha as células espermáticas.

Em *C. megacephala* há indícios da presença de desmosomos entre as células; ademais existe uma profusão de interdigitações entre as células do cisto, pelo menos nos indivíduos jovens. Na presente investigação não foram empregados traçadores eletrodensos, uma vez que este aspecto fugia do interesse primário do trabalho. Assim não se dispõe de dados suficientes para se traçar paralelos com outras espécies já estudadas. Porém, como parece bem fundamentado, em vários grupos de insetos a existência de uma barreira hemato-testicular como consequência da presença de vários tipos de junções inter-celulares, a extensa interdigitação entre as células císticas, assim como a presença de junções do tipo "adesão", sugerem que, também em *C. megacephala*, exista uma compartimentalização do local onde se processa a espermiogênese.

4. 3. DINÂMICA DA MATURAÇÃO

DOS CISTOS

Parece haver em *C. megacephala*, uma sequência definida de maturação dos cistos. Os cistos mais próximos ao ducto deferente amadurecem antes que os subsequentes. Este aspecto é semelhante ao descrito por BAO (1987) para *C. capitata*, tanto para linhagem selvagem quanto para linhagem mutante, embora nesta última haja uma defasagem no desenvolvimento cístico.

Esta sequência de desenvolvimento indica uma cronologia, onde os primeiros cistos a amadurecerem seriam os mais próximos à saída da gônada. Deve-se assinalar uma vez mais, que a sequência de maturação cística discutida aqui é relativa, e que a distinção entre os terços proximal, médio e distal tem propósitos descritivos e se baseia, inclusive, no trabalho desenvolvido por BAO (1987) para *C. capitata*.

4. 4. OS ESPERMATÓCITOS

Estão sendo considerados como espermatócitos, em *C. megacephala*, as células incluídas nos cistos e ligadas entre si por pontes citoplasmáticas. Estas células apresentam características ultra-estruturais de células com

alta atividade metabólica. Além disto, estas células não apresentam características ultra-estruturais de células em meiose, como cromossomos e complexos sinaptonêmicos, o que as caracterizaria como células pré-meióticas (espermátócitos primários). Dois aspectos citológicos relevantes que distinguem essas células serão discutidos a seguir: O nucléolo e as lamelas anuladas.

RASMUSSEN (1973) descreveu aspectos ultra-estruturais da meiose de *D. melanogaster*, dispensando, especial atenção à estrutura nuclear dos espermátócitos primários. A estrutura fibro-granular do nucléolo descrita por este autor é semelhante àquela encontrada em *C. megacephala*. Nesta espécie, o nucléolo apresenta-se com uma estrutura submicroscópica bastante diferenciada, que parece, entretanto, ser típica de células com elevada atividade metabólica. MIRRE & KNIBIEHLER (1985) descreveram em espermátides de camundongo, um nucléolo composto por uma massa fibro-granular densa associada a um anel semi-circular (aspecto de "cadeado"), que é observado nas fases iniciais da espermiogênese. À medida que a diferenciação prossegue, este nucléolo se simplifica e finalmente desaparece. SCHULTZ et alii (1984) também descreveram a existência de um corpo redondo ("round body"), com natureza protéica não-histônica em espermátides de rato.

O nucléolo dos espermátócitos de *C. megacephala* é esferóide, com uma estrutura fibro-granular. A ele se associa, frequentemente, uma estrutura com eletrodensidade

média, e que denominamos corpo esférico. Este nucleolo é característico dos espermatoцитos, não sendo mais detectado já nas primeiras fases da espermiogênese. Parece, portanto, que a atividade nucleolar cessa antes do início da espermiogênese.

A natureza bioquímica do corpo esférico, bem como sua função não podem ser discutidas aqui, uma vez que seriam necessárias outras abordagens metodológicas. SCHULTZ et alii (1984) sugeriram uma possível função regulatória da atividade nucleolar para o então chamado corpo redondo. Apesar da grande distância filogenética, mas assumindo-se que há uma certa constância em muitas atividades celulares ao longo dos Filos, é possível que o corpo esférico dos espermatoцитos de *C. megacephala* seja uma expressão morfológica de elementos com natureza regulatória.

As lamelas anuladas, outro componente típico dos espermatoцитos, são conceituadas por STAFSTRON & STAEHELIN (1984) como organelas citoplasmáticas compostas por grupos de membranas empilhadas contendo poros, que são estruturalmente indistinguíveis dos complexos de poros nucleares. Tais organelas são também frequentes em tecidos neoplásicos (ALLEN, 1988) e embrionários.

Trabalhando com embriões de *Drosophila*, STAFSTRON & STAEHELIN (1984) sugeriram que as lamelas anuladas seriam o resultado da super-produção de componentes dos complexos de poros durante o desenvolvimento embrionário.

Em estudos sobre a espermatogênese de *D. melanogaster* e sobre a ovogênese de *Libellula pulchella*, KESSEL (1981, 1983, 1985) sustenta a origem das lamelas anuladas a partir de corpos fibro-granulares citoplasmáticos. Tais corpos seriam oriundos do núcleo, possivelmente de regiões nucleolares. Este autor sugere ainda que as lamelas anuladas de espermatócitos e de ovócitos teriam um papel importante no processamento ou na ativação de produtos gênicos e na organização de polirribossomos nas fases subsequentes da espermiogênese e da ovogênese, quando, apesar de intensa síntese protéica, não ocorre nenhuma síntese de RNA (KESSEL, 1981). Curiosamente, em oposição a estas hipóteses, GULYAS (1971) sugeriu que a organização de lamelas anuladas em ovócitos de coelhos se daria a partir de vesículas e cisternas citoplasmáticas, não se relacionando aos chamados corpos fibrogranulares.

Os espermatócitos de *C. megacephala* possuem inclusões densas no citoplasma que, entretanto, não se assemelham aos corpos fibro-granulares descritos por KESSEL (1981). Ademais, a origem de tais inclusões não pôde ser inferida. Ressalte-se também que não foi detectada nenhuma relação espacial entre as inclusões densas e as lamelas anuladas. Portanto, a partir dos resultados apresentados, a origem das lamelas anuladas em *C. megacephala* não pode ser sugerida.

4.5. ESTÁDIOS DA ESPERMIOGÊNESE

A espermiogênese em *C. megacephala* apresenta uma sequência de desenvolvimento bastante semelhante ao apresentado por outros dípteros.

A formação do flagelo em *C. megacephala* é semelhante ao descrito por WARNER (1971) para a espermiogênese de *Sarcophaga bullata*. As transformações que ocorrem nos estádios iniciais (1 a 5) de *C. megacephala* são comparáveis àsquelas de *D. melanogaster*, tais como descritas por STANLEY et alii (1972). Já o espermátócito de *C. megacephala* é muito parecido com as espermátides de estágio 1 de *C. capitata* (QUAGLIO-GRASSIOTO, 1983), havendo ainda várias similaridades entre as espermátides dos estádios subsequentes.

Estas considerações tornam-se importantes sob o ponto de vista de filogenia, já que as relações apresentadas podem contribuir para o conhecimento das relações evolutivas entre estas espécies de dípteros.

Torna-se necessário ressaltar que a espermiogênese é um evento dinâmico e que a classificação adotada, representa um artifício com propósitos descritivos, sendo que este tipo de classificação possibilita o estabelecimento de relações temporais entre os eventos da espermiogênese.

Desta forma, a espermiogênese de *C. megacephala* apresenta como eventos precoces a formação do complexo mitocondrial e o início da formação do acrossomo. O aparecimento das fibras densas e dos túbulos acessórios do axonema são eventos intermediários, ao passo que a aquisição do aspecto típico em espiral pelas membranas adjacentes se dá tardiamente, ao final do processo.

4. 6. EVENTOS ESPECÍFICOS DA CITODIFERENCIAÇÃO

4. 6. 1. FORMAÇÃO DO ACROSSOMO

Na maioria das espécies animais o acrossomo é uma organela fundamental para a fecundação (PHILLIPS, 1970).

O evento inicial na morfogênese da organela é a formação do grânulo pré-acrossômico a partir de um dictiossomo posicionado nas proximidades do núcleo (PHILLIPS, 1970). Os eventos subsequentes podem ser bastante complexos, como acontece no hemíptero *Notonecta glauca* (WERNER, 1986; WERNER et alii, 1988). O acrossomo maduro pode possuir subestrutura bastante complexa, dependendo do grupo considerado (BACCETTI, 1972).

O início da organização do acrossomo em *C. megacephala* parece situar-se entre os estádios 1 e 2. Isto pode ser inferido pela observação de um grande complexo de Golgi situado nas proximidades do núcleo nos estádios citados, não acompanhado de grânulos pré-acrossômicos típicos. O acrossomo organizado e aposto ao núcleo é observado no estágio 5. A organela situa-se lateralmente à porção apical do núcleo e apresenta um conteúdo de eletrodensidade média. A situação lateral em relação ao núcleo é mais claramente observada no estágio 9. Esta disposição parece ser característica dos dípteros (BACCETTI, 1972). Ainda no estágio 5, observa-se um material granular aparentemente amorfo associado à face externa da membrana acrossomal. A natureza deste material não pode ser discutida nos termos da metodologia empregada.

Observa-se também a presença de uma membrana associada a uma das faces do acrossomo. QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) refere-se à existência de uma membrana intersticial entre o núcleo e o acrossomo de *C. capitata*, o que até então não havia sido observado em dípteros. Tal membrana seria importante no posicionamento da organela nas fases iniciais da espermiogênese (McMASTER-KAY & KAY, 1980 apud QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983; BAO et alii, 1989). Não observamos uma membrana situada nesta região, sendo porém possível que a membrana descrita em *C. megacephala* seja igualmente importante na morfogênese do acrossomo.

O acrossomo possui enzimas hidrolíticas importantes na fecundação. PHILLIPS (1972), descreve que as enzimas do acrossomo possuem arranjos paracristalinos em várias espécies de mamíferos. QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) descreve um material paracristalino no acrossomo das espermátides de *C. capitata*, aspecto este observado em preparações utilizando coloração negativa. Este aspecto também é observado por WARNER (1971) em *S. bullata*. O conteúdo aparentemente homogêneo observado no acrossomo de *C. megacephala* não descarta a possibilidade de existência de um arranjo paracristalino similar. Esta questão permanece então por ser investigada.

4.6.2. AS TRANSFORMAÇÕES NUCLEARES

4.6.2.1. A COMPACTAÇÃO CROMATÍNICA

O exame ultra-estrutural dos núcleos das espermátides de *C. megacephala* demonstra a existência de uma sequência gradual de compactação cromatínica. As espermátides jovens apresentam cromatina pouco compactada, enquanto os espermatozóides a apresentam fortemente condensada. Estes aspectos são concordantes com o que ocorre

na maioria dos insetos (BACCETTI, 1972; PHILLIPS, 1970).

Em muitos organismos, inclusive insetos, a compactação cromatínica se dá através da mudança do tipo de proteínas básicas associadas ao DNA nuclear, havendo uma substituição de histonas somáticas por proteínas básicas, ricas em arginina (tipo protaminas) ou em lisina (BLOCH, 1969). Os detalhes moleculares da interação DNA/proteínas são conhecidos, predominando as interações de natureza eletrostática. Já as interações das protaminas entre si são tanto de natureza covalente como de natureza não-covalente, destacando-se entre as primeiras as pontes dissulfeto (S-S) (BALHORN, 1982; LOIR & LAMNEAU, 1984). Muito provavelmente estes aspectos moleculares se reproduzem em outros grupos animais na escala evolutiva.

Nos insetos, observa-se que o comportamento de compactação cromatínica é variável segundo o grupo analisado (PHILLIPS, 1970). Nos estádios iniciais e intermediários (1 a 7) de *C. megacephala*, identifica-se um aumento gradual de áreas eletrodensas, geralmente situadas na região central do núcleo. Estes aspectos são semelhantes aos descritos por REYES et alii (1985) para *Neta chilensis* e por QUAGLIO-GRASSIOTTO (1983) para *C. capitata*. Estas áreas eletrodensas não possuem associações com o envelope nuclear pelo menos até o estágio 5, quando existem indícios de que este tipo de associação se inicie, evoluindo no estágio 6 para uma associação clara entre a cromatina condensada e a membrana interna do envelope nuclear. No estágio 7 a

cromatina condensada assume um aspecto de "fitas" eletrodensas que foram observadas também nas investigações já citadas de WARNER (1971), QUAGLIO-GRASSIOTTO (1983) e de REYES et alii (1985). Apesar de não ter sido documentado, presume-se a existência de um estágio 8, provavelmente estabelecido por transformações rápidas, onde as fitas cromatínicas se agregam em áreas fortemente compactadas, disso resultando os núcleos com cromatina fortemente condensada dos estádios 9 e 10. Estes eventos discutidos em bases puramente ultra-estruturais, por si só não revelam as drásticas transformações bioquímicas em curso durante a compactação cromatínica. DASS & RIS (1958 apud PHILLIPS, 1970) demonstraram uma clara correlação entre o aspecto da cromatina na espermatíde e a mudança das proteínas básicas do núcleo, que ocorrem durante a espermiogênese de gafanhotos. As mudanças ultra-estruturais observadas no núcleo da espermatíde de *C. megacephala*, bem como em outros insetos parecem refletir um grande dinamismo em rearranjos bioquímicos.

4.6.2.2 O NUCLEÓLO

O nucléolo em *C. megacephala* não é notado nos estádios iniciais da espermiogênese, sendo que a estrutura complexa observada nos espermatócitos desintegra-se logo no início da diferenciação. Este é um aspecto que difere de *D.*

melanogaster, onde o nucleolo é observado nos estádios iniciais da espermiogênese (RASHUSSEN, 1973), e de *C. capitata*, onde o nucleolo pode ainda ser notado em estádios avançados da espermiogênese (QUAGLIO-GRASSIOTTO, 1983). A persistência do nucleolo em fases tardias da espermiogênese pode indicar uma necessidade de síntese adicional durante a diferenciação da espermatíde. Em mamíferos, como o camundongo (MIRRE & KNIEBIEHLER, 1985), o nucleolo desorganiza-se durante a fase de maturação da espermatíde. Em *C. megacephala*, a ausência do nucleolo e a notável quantidade de ribossomos no citoplasma das espermatídes até pelo menos o estágio 5, pode indicar que a atividade nucleolar é requerida somente até o início da espermiogênese, sendo que o "pool" de ribossomos presentes nas espermatídes de estágio 1 é suficiente para os eventos de síntese subsequentes.

4.6.2.3. MODIFICAÇÕES DO FORMATO NUCLEAR

Observa-se claramente na espermiogênese de *C. megacephala* um processo de alongamento e redução da área nuclear da espermatíde. Consideraremos aqui as transformações do formato nuclear em termos do papel desempenhado pelos microtúbulos e pelas membranas adjacentes, associando quando possível ao processo de

compactação cromatinica. Será discutida também a redução dos poros nucleares e o papel dos bulbos nucleares.

Em cortes transversais das espermátides de *C. megacephala* nos estádios 6 e 7, obtém-se imagens do núcleo apresentando concavidades, às quais estão associadas as membranas adjacentes e convexidades, às quais se verifica a associação de microtúbulos. Estes aspectos são semelhantes aos descritos na espermiogênese de *S. bullata* (WARNER, 1971), de *C. frigida* (SCHRANKEL & SCHWALM, 1974) e de *C. capitata* (QUADIO-GRASSIOTTO, 1983; BAO, 1987).

Membranas adjacentes e especialmente microtúbulos, são elementos atuantes no alongamento e redução do volume nuclear. As membranas adjacentes são de origem controversa, sendo que WARNER (1971) considera que sejam, na verdade, o folheto mais externo do envelope nuclear, que seria destacado do núcleo. Atribui-se a elas um papel no alongamento nuclear, embora este não esteja bem estabelecido (SCHRANKEL & SCHWALM, 1974). Já os microtúbulos são considerados como elementos fundamentais na aquisição da forma definitiva do núcleo dos espermatozóides (DUSTIN, 1978).

Em ACRIDIDAE, FONZO & ESPONDA (1975) sugerem uma associação morfológica entre a cromatina nuclear e os microtúbulos da espermátide. Porém, PHILLIPS (1974b) descreve a espermiogênese de uma espécie de escorpião, cuja transformação nuclear ocorre na ausência de microtúbulos. PHILLIPS et alii (1987) descrevem na espermiogênese de uma

espécie de grou, padrões de condensação cromatínica variáveis e aparentemente normais, aos quais atribuíram a responsabilidade pela variação no formato das cabeças dos espermatozóides.

Apoiando a ideia desse papel para os microtúbulos estão McINTOSH e PORTER (1967) que descrevem o formato em hélice do núcleo da espermatíde do galo doméstico, ao lado de uma correspondente disposição de feixes de microtúbulos e KONDO et alii (1988) que reafirmam que a aquisição da forma helicoidal do núcleo de tentilhão é dependente de uma disposição correspondente de feixes de microtúbulos.

Na verdade tais investigações apontam para uma ideia conciliatória onde as transformações no formato do núcleo das espermatídes dos animais sejam consequência da somatória de fatores como compactação cromatínica e a disposição característica dos elementos do citoesqueleto.

Em *C. megacephala* pode ser razoável sugerir que o momento crítico das transformações nucleares situa-se nos estádios 5, 6, 7 e possivelmente 8, onde parecem atuar conjuntamente a compactação cromatínica e a presença dos microtúbulos.

Concomitantemente ao alongamento do núcleo observa-se claramente uma gradual redução da área do envelope nuclear que apresenta poros nucleares, enquanto nos estádios iniciais, as espermatídes apresentam-se com poros nucleares em toda a extensão do envelope. Nos estádios subsequentes a área de poros se reduz. É possível que nos

estádios iniciais da espermiogênese as trocas núcleo-citoplasma sejam intensas, daí o aspecto "interfásico" (MAUL et alii, 1971). O processo encontrado em *C. megacephala* é semelhante àquele de *S. bullata* (WARNER, 1971). É provável que nos estádios 6 e 7 a área de poros já teria se reduzido expressivamente resumindo-se a uma estreita faixa de envelope nuclear, onde não se observa associação cromatinica e que é oposta à região nuclear voltada aos elementos do flagelo, aspecto este similar ao descrito para *Sarcophaga bullata* (WARNER, 1971). A redução do número de poros nucleares em eventos de espermiogênese parece ser algo frequente nas espécies animais (LIU, 1972 apud ARSENAULT, 1984). ARSENAULT (1984), analisando espermátides do camarão *Crangon septemspnosa*, sugere que a redução gradual e o desaparecimento dos poros nucleares seja um processo indissociável do estabelecimento da polaridade da espermátide, dos padrões de agregação cromatinica e de eventos citoplasmáticos, o que parece perfeitamente plausível.

Ao longo da espermiogênese é observado também que parte do conteúdo nuclear deve ser eliminado. A observação de "bulbos nucleares" no estadio 9 sugere que esta eliminação está presente também em *C. megacephala*, em semelhança ao observado em *C. capitata* por QUAGLIO-GRASSIOTTO (1983).

4.7. A FORMAÇÃO DO FLAGELO

4.7.1. O COMPLEXO MITOCONDRIAL E OS DERIVADOS MITOCONDRIAIS

Nos insetos, o complexo mitocondrial é produto da fusão das mitocôndrias da espermatide, após sua agregação no pólo caudal da célula, sendo observado como uma massa esferóide, justaposta ao núcleo. Esta fusão é um evento comum nos insetos (PHILLIPS, 1970). Exemplos específicos podem ser encontrados nos trabalhos de CRUZ-LANDIM (1979) em *Myogryllus* sp; de REYES et alii (1985) em *Neta chilensis*; de STANLEY et alii (1972) em *D. melanogaster* e de WARNER (1971) em *S. bullata*.

Frequentemente o complexo mitocondrial se divide em dois derivados mitocondriais. Estes se transformam em estruturas tubulares que se posicionam lateralmente ao axonema. É frequente a persistência dos dois derivados, embora possa haver regressão de um deles, como se dá em *Drosophila* (STANLEY et alii, 1972) e em *Alabama argilacea* (MEDEIROS, 1986). Em *C. megacephala*, os dois derivados persistem, embora um seja claramente mais longo que o outro. O significado funcional do posicionamento lateralizado dos derivados ao axonema é discutível, uma vez que a atividade

respiratória, com o fornecimento de energia ao axonema e considerado irrelevante (BACCETTI, 1972).

ROSATI et alii (1976) sugerem uma provável função mecânica com importância no movimento flagelar. Em hipótese bastante atraente, FEROTTI (1973) sugere, entretanto, que os derivados mitocondriais sejam detentores de uma herança citoplasmática paterna. Em diversas espécies de insetos, os derivados são preenchidos por uma estrutura paracristalina de natureza protéica. Este preenchimento se dá em diferentes proporções segundo a espécie considerada (ROSATI et alii, 1976). A proteína que constitui a estrutura paracristalina dos derivados foi denominada por BACCETTI et alii (1977) de cristalomitina.

Em *C. megacephala*, o início da organização do retículo paracristalino no interior dos derivados é observado já no estágio 5, como uma granulação eletrodensa com disposição ligeiramente hexagonal. Este aspecto é semelhante ao descrito por WARNER (1971) em *S. bullata*. Parece haver um preenchimento gradual dos derivados pela estrutura paracristalina, até o seu total preenchimento, no estágio 10 (maduro). Este é um aspecto característico dos dípteros (ROSATI et alii, 1976).

4.7.2. O ADJUNTO DO CENTRÍOLO E A FORMAÇÃO DO AXONEMA

O axonema de *C. megacephala* tem origem a partir de um centriolo único e apresenta, quando maduro, o padrão 9+9+2, que é prevalente em muitas espécies de insetos (PHILLIPS, 1970).

O centriolo é claramente observado nos estádios 4 e 5 mas sua persistência ou inexistência na célula madura não pôde ser afirmada, embora classicamente seja aceito que o centriolo não persiste nos espermatozóides dos insetos (BACCETTI, 1972). O centriolo pode ser tratado aqui como corpúsculo basal. Nesses estádios mencionados, o centriolo está envolto por um anel fibro-granular, caracterizado como adjunto do centriolo. O adjunto do centriolo possui natureza ribonucleoprotéica e sua origem é controversa (TAFFAREL & ESPONDA, 1980). A função do adjunto também é discutida, sendo sugerida, entretanto, uma função mecânica de ancoragem do segmento inicial do axonema ao pólo caudal do núcleo (GATENBY et alii, 1969 apud QUAGLIO-GRASSIOTTO, 1983). Esta hipótese torna-se bastante atraente frente aos achados ultra-estruturais. A partir do estágio 7, o adjunto do centriolo passa a apresentar um aspecto homogêneo, sendo observado como uma estrutura interposta aos derivados mitocondriais e acompanhando-os por um curto trajeto. Em cortes transversais ele apresenta um aspecto de cunha, o que foi também notado em *C. capitata* (QUAGLIO-GRASSIOTTO, 1983) e

em *S. bullata* (WARNER, 1971).

A morfogênese do axonema propriamente dito é semelhante ao descrito para outras espécies de insetos (BACCETTI, 1978; KIEFER, 1970; PHILLIPS, 1970; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983). Nota-se a princípio um axonema básico 9+2 até o estágio 4; a partir do estágio 5, observa-se claramente a formação das fibras densas e dos túbulos acessórios que se originam de apêndices do subtúbulo B. Estes aspectos são concordantes com aqueles observados por STANLEY et alii (1972), que postulam que o desenvolvimento do axonema ocorra por meio de um gradiente organizacional onde, primariamente, são notados os sub-túbulos A, aos quais são acrescidos os elementos restantes, juntamente com a dupla de túbulos centrais. Além disto observa-se o aparecimento de uma bainha dupla de membranas lisas que envolve o axonema e que mantém-se íntegra até os estádios finais, persistindo como um pequeno segmento interposto ao axonema e derivados mitocondriais.

TOKUYASU (1974a) postula que a presença de uma bainha como essa atuaria como suporte mecânico das estruturas em organização, ao menos durante os estádios precoces da espermiogênese.

Em algumas espécies, como *C. capitata* (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983) e *T. infestans* (DOLDER, 1988) pode-se detectar, especialmente por técnicas de contrastação negativa, a existência de ligações densas entre o axonema e os derivados mitocondriais. Em *C. megacephala*, embora

ligações deste tipo não tenham sido detectadas, nota-se uma gradual aproximação dos derivados mitocondriais e o axonema ao longo da espermiogênese.

Além disso, pode-se observar relações espaciais aparentemente precisas dos elementos do axonema e dos derivados mitocondriais. Analisando o relacionamento do axonema e os derivados mitocondriais de *D. melanogaster*, TOKUYASU (1974a) observou o estabelecimento de relações angulares entre eles. O autor sugere que o axonema tenha um certo grau de liberdade de rotação em relação aos derivados mitocondriais. Parece ser isto o que acontece no flagelo de *C. megacephala*, onde pode-se observar um posicionamento do axonema em relação aos derivados mitocondriais de tal sorte que cada uma das duplas de túbulos 2 e 4 está geralmente voltada a um dos derivados mitocondriais.

Ao final da espermiogênese o axonema apresenta-se no esquema 9+9+2. Sua subestrutura consiste de 9 túbulos acessórios associados a 9 fibras densas, formando o anel mais periférico. Em direção ao centro encontramos as 9 duplas de subtúbulos A e B, sendo o túbulo A possuidor dos braços de dineína e das ligações radiais que se dirigem aos dois túbulos centrais. Estes últimos acham-se envoltos por uma bainha densa. Este é um esquema clássico de axonema (PHILLIPS, 1974a).

Já foi sugerido que a "simetria em nove" seria responsável, ao menos em parte, pela motilidade do axonema (WARNER, 1970). Atualmente, entretanto, parece mais aceito

que a presença dos braços de dineína (que são aIFases) é fundamental, sendo estes, provavelmente, os verdadeiros responsáveis pelo movimento, independente do seu padrão organizacional (BACCETTI & DALLAI, 1976; YIN et alii, 1985).

Os tubulos acessórios, os subtubulos A e a maioria dos tubulos centrais do axonema de *C. megacephala* apresentam-se preenchidos por um material relativamente eletrodenso, enquanto os subtubulos B, e ocasionalmente os subtubulos centrais, não apresentam esta característica. KAYE (1970) descreveu a existência de um arranjo fino de microcilindros, formando uma espécie de matriz na luz dos tubulos do axonema de espermátides, e AFZELIUS (1981) demonstrou uma variação no preenchimento dos subtubulos A do axonema, conforme a espécie de invertebrado analisada. O significado funcional dessa organização subestrutural permanece ainda obscuro.

4.7.3. MEMBRANAS LISAS DA CAUDA

Observando espermátides de *Myogryllus* sp em diferentes fases de alongamento, CRUZ-LANDIM (1979) descreveu a presença de membranas lisas delimitando os elementos da cauda. Estas membranas circunscrevem as porções

citoplasmáticas que se relacionam aos elementos da cauda e proporcionam a eliminação do citoplasma excedente. A autora observa o mesmo fenômeno em *Conocephalus saltator* (ORTHOPTERA) e sugere que estas membranas seriam originárias do retículo endoplasmático (CRUZ-LANDIM, 1980).

Em *C. megacephala*, as membranas lisas, ou os segmentos do retículo endoplasmático liso, parecem não delimitar completamente os elementos da cauda durante os estádios de alongamento (4 e 5), embora possam desempenhar funções similares às descritas por CRUZ-LANDIM (1980).

É comum observar-se um grande dictiossomo associado aos elementos da cauda. Nos insetos, aceita-se que após a formação do acrosso, o dictiossomo que lhe dá origem comumente se desloca do polo apical em direção à cauda (PHILLIPS, 1970). No rato, CLERMONT & TANG (1985) demonstraram a nível de complexo de Golgi, a incorporação de açúcares marcados, mesmo após a organização do acrosso. Estes autores sugerem que a organela participe também na incorporação de glicoproteínas as membranas do flagelo, durante o processo de alongamento da espermátide. Não foi possível a delimitação precisa da migração do dictiossomo em *C. megacephala*. Contrariamente, há sugestão de que existam dois dictiossomos, que poderiam atuar independentemente: um relacionado à formação do acrosso e o outro à biogênese dos elementos da cauda. Dois dictiossomos foram também encontrados em espermátides de *T. infestans* (H. DOLDER, comunicação pessoal).

4.8. PONTES CITOPLASMÁTICAS

Nos insetos, as espermátides de um mesmo cisto estão geralmente ligadas por pontes citoplasmáticas até quase o término da espermiogênese (PHILLIPS, 1970; PHILLIPS, 1974a). Os espermatócitos conectados por pontes citoplasmáticas podem formar organizações razoavelmente complexas, como ocorre em *Aedes aegypti* (WANDALL, 1986). Normalmente, ressaltase a importância das conexões entre as células em termos da manutenção da sincronia de desenvolvimento e fertilidade (CARLSON & HANDEL, 1988), o que estaria diretamente relacionado ao acoplamento metabólico entre as células germinativas (FULKA et alii, 1989). Em *C. megacephala*, a existência de pontes citoplasmáticas se resume ao estágio I, embora seja possível que a não detecção de pontes citoplasmáticas nos estádios subsequentes esteja em função unicamente de restrições metodológicas. Um aspecto interessante a ser considerado é a dificuldade na obtenção de cortes com as espermátides alinhadas ou mostrando qualquer outro tipo de organização. Igualmente foram observados cistos com células em diferentes fases de maturação, o que favorece a idéia de que a perda das pontes citoplasmáticas em um momento precoce da espermiogênese seja um evento frequente.

4.9. ESPERMIOGÊNESE ATÍPICA

A existência de cistos com células de diferentes estádios da espermiogênese e a dificuldade em se obter cortes transversais de espermátides em alongamento, onde estivessem alinhadas em um mesmo nível de corte, parecem refletir um aspecto que deve ser considerado à luz do exposto no tópico anterior.

Conforme assumido, a presença de pontes citoplasmáticas garante a sincronia do desenvolvimento das espermátides na maioria dos insetos. Se as pontes citoplasmáticas são desfeitas já nos estádios precoces da espermiogênese, é razoável aceitar-se que as espermátides em um mesmo cisto possam se desenvolver de modo não sincrônico.

Assumiu-se que os indivíduos utilizados eram normais, não existindo qualquer alteração fenotípica evidente, que sugerisse que os indivíduos analisados fossem mutantes. Entretanto, os resultados aqui obtidos não são compatíveis com aqueles descritos para a espermiogênese de outros insetos, em especial de outros dípteros.

Sabendo-se que insetos mutantes podem apresentar transtornos a nível de espermiogênese (BÁO, 1987; BÁO & DOLDER, 1990) e que condições ambientais, como a temperatura podem influenciar no desenvolvimento normal da espermiogênese (SZOLLOSI, 1976a; 1976b), talvez seja importante considerar que os aspectos atípicos descritos para a espermiogênese de *C. megacephala* possam ser devidos a alterações promovidas por fatores de cultivo desfavoráveis, incluindo temperatura e alimentação por exemplo, que conduzam a um tipo de estresse. Porém tais considerações só poderão ser comprovadas através da comparação com achados obtidos a partir de exemplares coletados na natureza, ficando, portanto, essa questão em aberto.

4.10. FIGURAS ABERRANTES E DE ABSORÇÃO

A presença de espermátides aberrantes na espermiogênese de insetos não parece ser um evento raro. Por exemplo, CAETANO (1980) descreveu espermatozóides com elementos constituintes supra-numerários em *Atta capiguara* e *A. sexdens rubropilosa* (FORMICIDAE).

Parece que, em *C. megacephala*, o testículo é capaz de eliminar espermatozoides defeituosos, provavelmente por meio de células parietais ainda não plenamente caracterizadas. SZOLLOSI (1976a, 1976b) descreveu os espermatozoides de *Locusta migratória*, com elementos supranumerários no flagelo e com compactação cromatinica retardada em exemplares submetidos a condições desfavoráveis de temperatura.

A análise subjetiva do material de *C. megacephala* revela uma frequência razoável de espermátides maduras ou quase maduras, consideradas aberrantes, podendo-se sugerir novamente a existência de fatores estressantes no ambiente em que os espécimens estavam alocados. Porém, ressalte-se mais uma vez que, esta consideração só poderia ser bem fundamentada através do exame de espécimens obtidos na natureza.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. Os aspectos macroscópicos, a organização da gônada, e a sequência de transformações que caracterizam a diferenciação das espermatídes de *C. megacephala* revelam aspectos semelhantes aos descritos para outras espécies de insetos, de dípteros em particular.

2. As células da linhagem germinativa são envolvidas pelas células císticas, que são unidas entre si por junções celulares. O amadurecimento dos cistos dá-se segundo uma gradação, na qual o desenvolvimento daqueles próximos ao ducto deferente em geral antecede o dos seguintes.

3. Os espermatócitos possuem aspectos ultra-estruturais típicos de células pouco diferenciadas e com alta atividade metabólica, além de apresentarem pontes citoplasmáticas que os conectam.

4. As pontes citoplasmáticas observadas nos espermátócitos parecem se desorganizar nos estádios precoces, ao contrário do comumente observado durante a espermiogênese de outros insetos.

5. Os núcleos das espermatídes apresentam uma sequência crescente de compactação cromatínica, alongamento e eliminação de parte do seu conteúdo, através dos bulbos nucleares. No processo de alongamento nuclear e da célula em geral, atribui-se importância às associações dos microtúbulos e, provavelmente, das membranas adjacentes.

6. Os complexos de poros nucleares congregam-se em regiões restritas do envelope nuclear, desaparecendo a seguir. A região de reunião dos complexos de poros nucleares não se volta a qualquer região específica da célula.

7. O nucléolo desorganiza-se no início da espermiogênese, provavelmente em função de ser a atividade nucleolar requerida somente nas fases imediatamente anteriores àquela fase.

8. Já nos estádios iniciais da espermiogênese, o acrossomo é organizado no pólo apical da célula pelo complexo de Golgi. Uma vez organizado, o acrossomo possui um conteúdo homogêneo, fracamente eletrodenso, e ocupa posição la-

teral à porção superior do núcleo, sendo delimitado por uma membrana acrossômica única.

9. No início da espermiogênese as mitocôndrias formam o complexo mitocondrial que, subsequentemente, dá origem a dois derivados mitocondriais. Estes são gradualmente preenchidos por um material paracristalino e são mantidos no espermatozoide.

10. O axonema tem origem a partir de um centríolo único, ao qual associa-se o adjunto do centríolo. Juntos implantam-se na porção caudal do envelope nuclear. No início da espermiogênese o adjunto do centríolo possui um aspecto fibro-granular, que se modifica, posteriormente, para uma estrutura mais ou menos compacta, interposta ao axonema. A partir do esquema básico 9+2, o axonema evolui para um esquema 9+9+2.

11. O desenvolvimento das membranas do flagelo ocorre às expensas de membranas lisas, que delimitam compartimentos citoplasmáticos a serem eliminados. Sugere-se que estas membranas sejam prolongamentos do retículo endoplasmático liso. É provável que um dictiossomo diferente daquele que organiza o acrossomo contribua para a formação das membranas do flagelo.

12. A presença de cistos com células sem qualquer organização aparente, ou com células em diferentes estádios da diferenciação espermatídica, deve ser considerada como consequência da desestruturação precoce das pontes citoplasmáticas, o que prejudicaria a diferenciação sincrônica das espermátides e o seu posicionamento ordenado no cisto.

13. A desestruturação precoce das pontes citoplasmáticas e a detecção de espermátides aberrantes, especialmente com elementos supra-numerários, podem estar indicando que as condições de manutenção das colônias não são ideais, ou que elas estão submetidas a um fator estressante.

14. O testículo desta espécie parece ser capaz de reabsorver células defeituosas.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomya megacephala*. Para isto empregou-se técnicas usuais de preparo e estudo de material biológico para a microscopia eletrônica.

Os resultados obtidos revelam que os eventos da espermiogênese em *C. megacephala* são semelhantes aos descritos para outras espécies de dípteros. As espermatídes passam por um processo de alongamento e perda de material citoplasmático e nuclear. Os núcleos passam ainda por uma crescente compactação cromatínica, revelada por mudanças ultra-estruturais que culminam em núcleos com a cromatina fortemente compactada nos espermatozoides. Um pequeno acrossomo de estrutura simples é apostado ao núcleo da espermatíde e organizado pelo complexo de Golgi justa-nuclear. Na formação do flagelo, observa-se que as mitocôndrias da espermatíde fundem-se e originam o complexo mitocondrial que, por sua vez, divide-se em dois derivados mitocondriais. Estas estruturas associam-se lateralmente ao axonema, que é organizado a partir de um centriolo único implantado em uma depressão do envelope nuclear. O axonema na célula madura possui uma estrutura no padrão 9+9+2.

Embora caracteristicamente as espermatídes desenvolvam-se sincronicamente no interior dos cistos, foram observados aspectos de desenvolvimento não sincrônico das espermatídes dentro de um mesmo cisto. Observou-se ainda a presença de espermatídes e espermatozoides aberrantes. Sugere-se que alguns fatores estressantes possam ser os responsáveis pela ocorrência destas anomalias.

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize the ultrastructural aspects of the spermiogenesis of the diptera *Chrysomya megacephala*. The normal techniques for the preparation and study of biological material for electronic microscopy were employed.

The results showed that the sequence of events which occurs during spermiogenesis in *C. megacephala* was similar to that described for other dipterans. The spermatids undergo a process of lengthening and loss of both cytoplasmic and nuclear material. In addition, the nuclei undergo a process of chromatin compactation, as shown by complex ultrastructural changes, which culminate in highly compacted chromatin in the spermatozooids. A small acrosome of simple structure is organized by the Golgi complex alongside the nucleus of the spermatid. In the formation of the flagellum, it was observed that the mitochondria of the spermatids undergo a process of fusion forming the mitochondrial complex, which in turn divides into two mitochondrial derivatives. These structures connect themselves laterally to the axoneme, which is organized starting from a single centriole imbedded in a depression of the nuclear envelope. In the mature cell, the axoneme has a structure with a 9+9+2 pattern. Characteristically the spermatids develop within the cysts in a synchronous manner. However, in some cysts the spermatid development showed non-synchronous aspects. The presence of some aberrant spermatids and spermatozooids was also observed. It is suggested that some stress factors may have influenced the appearance of these anomalies.

REFERENCIAS

- AFZELIUS, B.A. 1981. Electron-dense microtubules in the animal sperm tail. *J. submicrosc. Cytol.*, 13: 199-207.
- AFZELIUS, B.A.; DALLAI, R. & LINDSKOG, P. 1985. Spermatozoa of saiidig bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). *J. Ultrastruct. Res.*, 90: 304-312.
- ALLEN, E. D. 1988. Dissociation of annulate lamellae in P3J, a Burkitts lymphoma cell line. *J. Ultrastruct. mol. Struct. Res.*, 98: 169-183.
- ANDERSON, W.A. 1967. Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster*: The effect of elevated temperature on spermiogenesis. *Mol.gen.Genet.*, 99: 257-273.
- ARSENAULT, A.L. 1984. Changes in the nuclear envelope associated with spermatid differentiation in the shrimp, *Crangon septemspinosa*. *J. Ultrastruct. Res.*, 86: 294-308.

- AVANCINI, R.M.P. & PRADO, A.P. 1986. Oogenesis in *Chrysomya putoria* (Wiedmann)(Diptera: Calliphoridae). *Int. J. Insect Morphol Embryol.* 15: 375-384.
- BACCETTI, B. 1972. Insect sperm cells. *Adv. Insect Physiol.*, 9: 315-397.
- BACCETTI, B. & DALLAI, R. 1976. The spermatozoan of arthropoda. XXVII. Uncommon axoneme patterns in different species of the cecidomyid flies. *J. Ultrastruct. Res.*, 55: 50-69.
- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F. & AFZELIUS, B.A. 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J. Cell Biol.*, 73: 594-600.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E. & ROSATI, F. 1971. The spermatozoon of arthropoda; XIII. The cell surface. *J. Ultrastruct. Res.*, 35: 582-605.
- BALDWIN, K. M.; LOEB, M.J. & RIEMANN, J.G. 1987. A novel occluding junction which lacks membrane fusion in insect testis. *Tissue Cell*, 19: 413-421.

BALHORN, B. 1982. A model for structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 93:298-305.

BAO, S.N. Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante "olho-róseo" comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Campinas, 1987. 94 p. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

BAO, S.N. & DOLDER, J. 1990. Abnormal characteristics observed during spermiogenesis of Ka mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): spermatid cells. *Brasil. J. Gen.*, no prelo.

BAO, S.N.; QUAGLIO-GRASSIOTO, I. & DOLDER, H. 1989. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Cytobios*, 58: 93-100.

BAUNGARTNER, D.L. & GREENBERG, B. 1984. The genus *Chrysomia* (Diptera: Calliphoridae) in the new world. *J. med. Entomol.*, 21: 105-113.

BILLARD, R. 1984. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tiss. Res.*, 237: 219-220.

- BLOCH, D.P.. 1969. A catalog of sperm histones. *Genetics*, 61: 93-111.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. The male reproductive system. In: BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. *A Textbook of Hystology*. 11a. ed.. Saunders, Philadelphia, 1986. Cap. 31.
- BRICK, D.; LIFSCHITZ, E. & FRIEDLANDER, M. 1979. Mitochondria differentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. An ultrastructural analysis in the male sterile mutant ms(1)413. *J. Ultrastruct. Res.*, 66: 151-163.
- BURRINI, A.G.; MAGNANO, L.; MAGNANO, A.R.; SCALA, C. & BACCETTI, B. 1988. Spermatozoa and phylogeny of curculionoidea (Coleoptera). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 17: 1-50.
- CAETANO, F.H. 1980. Ultraestrutura de espermatoídes de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). *Naturalia*, 5: 105-111.
- CANTACUZÈNE, A.M.. L'annexe centriolare du spermatozoide des insects. In: BACCETTI, B. *Comparative spermatology*. Academic, London, 1970. p. 554-564.

- CARLSON, J.G. & HANDEL, M.A. 1988. Intercellular bridges and factors determining their patterns in the grasshopper testis. *J. Morphol.*, 196: 173-185.
- CHAUVIN, G.; EL AGOZE, M.; HAMON, C. & HUIGNARDS, J. 1988. Ultrastructure des spermatozoides des males haploides et diploides de *Diadromus pulchellus* Wesmeal (Hymenoptera; Ichneumonidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 17: 359-366.
- CLERMONT, Y. & TANG, X.M. 1985. Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat. Rec.*, 213: 33-43.
- CRUZ-LANDIM, C. 1979. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Myogryllus* sp. (Orthoptera, Gryllidae). *Rev. brasil. Biol.*, 39: 783-791.
- CRUZ-LANDIM, C. 1986. Nota sobre a formação de membranas durante a espermatogênese de *Conocephalus saltator* (Saussure)(Orthoptera, Conocephalidae). *Ciênc. Cult. S. Paulo*, 32: 479-483.
- CRUZ-LANDIM, C. & BEIG, D. 1980. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). *Int. J. Invert. Reprod.*, 2: 271-283.

DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. 1982. On zipper-lines or particle arrays within the plasma membrane of hemipteran spermatozoa (Heteroptera, Insecta). J. Ultrastruct. Res., 80: 197-205.

DOLDER, H. 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). J. Ultrastruct. mol. Struct. Res., 101: 159-164.

DUMSER, J.B. 1980. The regulation of spermatogenesis in insects. Ann. Rev. Entomol, 25: 341-369.

DUSTIN, P. 1978. Nuclear and cytoplasmic shaping in spermatogenesis. In: Dustin, P. Microtubules, 1st. ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Cap.6, p. 232-241.

DYM, M. 1981. Espermatogênese. In: Weiss, L. & Greep, R.O., Histologia, 4^a. ed.. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Cap. 26, p. 830-838.

ESCALIER, D. 1984. The cytoplasmic matrix of the human spermatozoan: cross-filaments link the various cell components. Biol. Cell, 51: 347-364.

- FINK, T.J. & YASUI, L.S. 1988. Ultrastructure of the sperm of *Dolania americana* Edmunds and Traver (Ephemeroptera: Behningiidae). Int. J. Insect Morphol Embryol., 17: 447-454.
- FONZO, S. & ESPONDA, P. 1975. The relationship between microtubules and chromatin in spermatids of acrididae. Protoplasma, 85: 193-197.
- FULKA, J. MOTLIK, J & LEFÉVRE, B. . 1989. Les cellules sexuelles. La Recherche, 213: 1020-1030.
- GAGNÉ, R.J. 1981. *Chrysomia* spp, old world blow flies (Diptera: Calliphoridae) recently established in the Americas. Bull. entomol. Soc. Am., 27: 21-22.
- GASSNER III, G.; CHILDRESS, D. & KLEMETSON, D. 1975. Spermiogenesis in boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera; Curculionidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 4: 115-125.
- GLAUERT, A.M. Pratical Methods in Electron Microscopy - Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. North-Holland, Amsterdam, 1975. 207p.

GREENBERG, B. 1988. *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) collected in North America and notes on *Chrysomya* species in the new world. J. med. Ent., 25: 199-200.

GUIMARÃES, J.H.; PRADO,, A.F. & LINHARES, A.X. 1978. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). Rev. brasil. Entomol., 22: 53-60.

GULYAS, B.J. 1971. The rabbit zygote: formation of annulate lamellae. J. Ultratruct. Res., 35: 112-126.

HACKSTEIN, J.H.P. 1987. Spermatogenesis in *Drosophila*. In: Hennig, W. Results and Problems in Cell Differentiation. A Series of Topical Volumes in Developmental Biology. 1^a. ed., Springer-Verlag, Nijmegen. Vol. 15, Cap.3.

HALENDÁ, R.M.; PRIMAKOFF, P. & MYLES, D.G. 1987. Actin filaments, localized to the region of the developing acrosome during early stages, are lost during later stages of guinea pig spermiogenesis. Biol. Reproduct., 36: 491-499.

HARWOOD, R.F. Insect structure and function. In: PFAOT, R.E. Fundamentals of Applied Entomology. 4^a. ed. McMillian, New York, 1988. Cap. 2.

HAYAT, M. A. 1970. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological applications. Vol. 1, Cap. 4. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

HOAGE, T.R. & KESSEL, R.G. 1968. 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.*, 24: 6-32.

HODGES, R.J. 1982. Ultrastructure of the somatic and germ cells of the testis of *Dermestes frischii* Kugelmann (Coleoptera: Dermestidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 2: 235-253.

HOLSTEIN, A.F. 1976. Ultrastructural observations on the differentiation of spermatids in man. *Andrologia*, 8: 157-165.

ITAYA, F.W.; THOMPSON, S.A. & HEIDGER JR., P.M. 1980. Fine structure of late stages of spermiogenesis in *Leptocoris trivittatus* Say (Hemiptera: Coreidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 9: 135-145.

KAYE, J.S. 1970. The fine structure and arrangement of microcylinders in the lumina of flagellar fibers in cricket spermatids. *J. Cell Biol.*, 45: 416-430.

- KESSEL, R.G. 1966. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. J. Ultrastruct. Res., 16: 293-304.
- KESSEL, R.G. 1981. Origin, differentiation, distribution and possible functional role of annulate lamellae during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res., 75: 72-96.
- KESSEL, R.G. 1983. Fibrogranular bodies, annulate lamellae, and polyribosomes in the dragonfly oocyte. J. Morphol., 176: 171-180.
- KESSEL, T.G. 1985. The relationship of annulate lamellae, fibrogranular bodies, nucleolus, and polyribosomes during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res., 91: 183-191.
-
- KIEFER, B.I. 1970. Development, organization, and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. J. Cell Sci., 6: 177-194.
- KONDO, T.; HASEGAWA, K. & UCHIDA, T.A. 1988. Formation of the microtubule bundle and helical shaping of the spermatid in the common finch, *Lonchura striata* var. *domestica*. J. Ultrastruct. mol. Struct. Res., 98: 158-168.

- LEE, Y.H. 1985. Spermatogenesis of the water strider, *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). J. Ultrastruct. Res., 90: 235-250.
- LINHARES, A.X. 1988. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. Rev. brasil. Entomol., 32:383-392.
- LOIR, M. & LAMNEAU, M. 1984. Structural function of the basic nuclear protein in ram spermatids. J. Ultrastruct. Res., 86: 262-276.
- LORA-LAMIA, C.; CASTELLANI-CERESA, L.; ANDREETTA, F.; COTELLI, F. & BRIVIO, M. 1986. Localization and distribution of actin in mammalian sperm heads. J. Ultrastruct. mol. Struct. Res., 96: 12-21.
- MAUL, G.G.; PRICE, J.W. & LIEBERMAN, M.W. 1971. Formation and distribution of nuclear pore complexes in interphase. J. Cell Biol., 51: 405-418.
- McINTOSH, J.R. & PORTER, K.R. 1967. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. J. Cell Biol., 35: 153-173.

- MEDEIROS, M. Caracterização ultra-estrutural dos espermatozoides eupirenes e apirenes de *Alabama argilacea* Huehner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) ao nível de testículo e das vias genitais do imago macho e fêmeas até a espermateca. Campinas, 1986. 122p. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- MIRANDA, J.C. & CAVICHIA, J.C. 1988. Junctional specializations in the seminiferous epithelium of an insect (*Triatoma infestans*): A freeze fracture and lanthanum tracer study. *Tissue Cell*, 20: 611-619.
- MIRRE, C. & KNIBIEHLER, B. 1985. Ultrastructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermiogenesis in the mouse. *Cell Diff.*, 16: 51-61.
- PAPATHANASSIOU, E. & KING, P.E. 1984. Ultrastructural studies on gametogenesis of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant) II. Spermiogenesis. *Acta Zool. (Stock.)*, 65: 33-40.
- PEROTTI, M.L. The neck region in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. In: BACETTI, B. *Comparative Spermatology*. Academic, London, 1970. p. 263-74.

- PEROTTI, M.E. 1973. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 44: 181-198.
- PHILLIPS, D.M. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44: 243-277.
- PHILLIPS, D.M. 1972. Substructure of the mammalian acrosome. *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 591-604.
- PHILLIPS, D.M. *Spermiogenesis*. Academic, New York, 1974a. 68p.
- PHILLIPS, D.M. 1974b. Nuclear shaping in the absence of microtubules in scorpion spermatids. *J. Cell Biol.*, 62: 911-917.
- PHILLIPS, D.M.; ASA, C.S. & STOVER, J. 1987. Ultrastructure of spermatozoa of the white-naped crane. *J. submicrosc. Cytol.*, 19: 489-494.
- POLVONY, D. 1971. Synanthropy. In: GREENBERG, B. *Flies and Diseases. V.1 Ecology, Classification and Biotic Associations*. Princeton University, Princeton.

- PRATT, S. Formation and differentiation of the Nebenkern in spermatids of a hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. In: BACCETTI, B. *Comparative Spermatology*. Academic, London, 1970. p. 301-310.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Citodiferenciação ultra-estrutural durante a espermiogênese normal de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Campinas, 1983. 93 p. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, H. A ultra-estrutura do espermatozoide de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). *Ciênc. Cult. S. Paulo*, 37: 2067-2071, 1985.
- RASMUSSEN, S.W. 1973. Ultrastructural studies of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Z. Zellforsch.*, 140: 125-144.
- REYES, E.A.; ALMONACID, M.E.; HERMOBILLA, I. & ANGULO, A.O. 1985. Espermiogênese em *Neta chilensis* (Walker) (Diptera: Brachycera). *Bol. Soc. Biol. Concepcion*, 56: 151-159.
- ROSATI, F.; SELMI, G. & MAZZINI, M. 1976. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *J. submicrosc. Cytol.*, 8: 51-67.

ROUSE, G.W. & JAMIESON, B.G.M. 1987. An ultrastructural study of the spermatozoa of polychaetes *Eurythoe camplanata* (Amphinomidae), *Clymenella* sp. and *Micromaldane* sp. (Maldanidae). with definition of sperm types in relation to reproductive biology. *J. submicrosc. Cytol.*, 19: 573-584.

RUSSEL, L.D.; WEBER, J.E. & VOGL, A.W. 1986. Characterization of filaments within the subacrosomal space of rat spermatids during spermiogenesis. *Tiss. Cell*, 18: 887-898.

SCHRANKEL, K.R. & SCHWALH, F.E. 1974. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tiss. Res.*, 153: 45-53.

SCHULTZ, M.C.; HERMO, L. & LEBLOND, C.P. 1984. Structure, development, and cytochemical properties of the nucleolus-associated "round body" in rat spermatocytes and early spermatids. *Am. J. Anat.*, 171: 41-57.

SHOUP, J.R. 1967. Spermiogenesis in wild type and in male sterility mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.*, 32: 662-675.

SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. 1976a. Galloyglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure and evidence for mordanting effect. J. Cell Biol., 70: 608-621.

SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. 1976b. Galloyglucoses of low molecular weight in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. J. Cell Biol., 70: 622-633.

SPRANDO, R.L. & RUSSELL, L.D. 1988. Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) : A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. J. Morphol., 198: 303-319.

STAFSTRON, J.P. & STAHELIN L.A. 1984. Are the annulate lamellae in the *Drosophila* embryo the result of overproduction of nuclear pore components? J. Cell Biol., 98: 699-708.

STANLEY, H.P.; BOWMAN, J.T.; ROMRELL, L.J.; REED, S.C. & WILKINSON, R.F. 1972. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res., 41: 433-466.

SZOLLOSI, A. 1976a. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* I. Abnormalities in differentiation of cytoplasmic organelles. J. Ultrastruct. Res., 54: 202-214.

SZOLLOSI, A. 1976b. Influence of infra-optimal breeding temperature of spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* II. Abnormalities in differentiation of the nucleus. J. Ultrastruct. Res., 54: 215-223.

SZOLLOSI, A. & MARCAILLON, C. 1977. Electron microscope study of the blood-testis barrier in an insect: *Locusta migratoria*. J. Ultrastruct. Res., 59: 158-172.

SZOLLOSI, A.; RIEMANN, J. & MARCAILLON, C. 1980. Localization of blood-testis barrier in the testis of the moth, *Anagasta kuehniella*. J. Ultrastruct. Res., 72: 189-199.

TABOGA, S.R. Estudo estrutural, ultra-estrutural e citoquímico da espermatogênese, com ênfase na espermiogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). Campinas, 1990. 172p. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

- TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. 1980. Fine-structural cytochemistry of the centriolar adjunct in grasshopper spermatids. *Mikroskopie (Wien)*, 36: 35-42.
- TANDLER, B. & HOPPEL, C. 1972. Mitochondria in spermatogenesis. In: Tandler, B. & Hoppel, C. *Mitochondria*, 1st Ed., New York and London, Academic Press. pp. 36-39.
- TOKUYASU, K.T. 1974a. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.*, 84: 239-250.
- TOKUYASU, K.T. 1974b. Dynamics of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.*, 48: 284-303.
- TOKUYASU, K.T. 1974c. Dynamics of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Head-tail alignment. *J. Ultrastruct. Res.*, 50: 117-129.
- TOKUYASU, K.T. 1975. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of "onion" Nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.*, 53: 93-112.

- TOSHIMORI, K.; IWASHITA, T. & OURA, C. 1979. Cell junctions in the cyst envelope in the silkworm testis, *Bombyx mori* Linné. *Cell Tiss. Res.*, 202: 63-73.
- WANDALL, A. 1986. Ultrastructural organization of spermatocysts in the testes of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.*, 23: 374-379.
- WARNER, F.D. 1970. New observations on flagellar fine structure. The relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. *J. Cell Biol.*, 47: 159-182.
- WARNER, F.D. 1971. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, 35: 210-232.
- WERNER, G. 1986. Changes in the Golgi apparatus during spermiogenesis in the backswimmer, *Notonecta glauca*. *Biol. Cell*, 57: 169-180.
- WERNER, G.; AFZELIUS, B.A. & MOSLER, B. 1988. Acrosome formation during spermiogenesis in *Notonecta glauca* L. (Heteroptera) *J. submicrosc. Cytol. Pathol.*, 20: 123-135.

- WILKINSON, R.F.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J. 1975. The effect of vinblastine on spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: Evidence for two functional classes of cytoplasmic microtubules. *J. Ultrastruct. Res.*, 53: 354-365.
- WITALINSKI, W. & AFZELIUS, B.A. 1987. Spermatogenesis in an itch mite, *Sarcoptes scabiei* (L.) (Acari, Sarcoptidae). *J. submicrosc. Cytol.*, 19: 615-625.
- XIA, L.; CLERMONT, Y.; LALLI, M & BUCKLAND, R.B. 1986. Evolution of the Endoplasmic Reticulum During Spermiogenesis of the Rooster: An Electron Microscopic Study. *Am. J. Anat.*, 177: 301-312.
- YASUZUMI, G. 1974. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. *Int. Rev. Cytol.*, 37: 53-120.
- YIN, W.; YANG, Y.; XUE, L. & DALLAI, R. 1985. A 13+0 axonemal pattern in the spermatozoon of *Neocondellum dalichotarsum* (Insecta, Protura). *J. Ultrastruct. Res.*, 93: 179-185.

ZUMPT, F. The myiasis-producing diptera recorded from the old world. In: Zumpt, F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Text Book for Physicians, Veterinarians and Zoologists. Butterworths, London, 1965.p. 89-99.