

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
José Lino Neto
e aprovada pela Comissão Julgadora. $\frac{01}{10}$
93

M. Dolder



José Lino Neto 619

**Estudo Ultra-estrutural da Espermiogênese e dos
Espermatozóides de *Cosmopolites sordidus* Germar
(Coleoptera: Curculionidae)**

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

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder $\frac{1}{10}$
Orientadora

Campinas
1993



619

Agradecimentos

- À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pela amizade, orientação e participação durante todas as fases deste trabalho;
- Aos membros da pré-banca, Dr. Hernandes F. de Carvalho, Dra. Marina Silveira e Dra. Sônia N. Bão, pelo cuidado que tiveram ao lerem a Tese e pelas sugestões que conduziram ao aprimoramento da mesma. Ao Prof. Hernandes também pela diagramação e impressão da Tese
- Aos professores, funcionários e colegas do Depto. de Biologia Celular (UNICAMP), pela amizade, apoio e convívio;
- Aos professores Carlos Roberto, Elza Fernandes, Jorge L. Coelho, Silvia Pompolo, João Marcos, Dejair Message, Everaldo e Carlota do Depto. de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, pela indispensável colaboração ao assumirem minha carga de ensino. À Sílvia Pompolo também por representar-me como procuradora;
- À Dra. Marina Silveira, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP, pelo auxílio na preparação do material para Microscopia Eletrônica de Varredura e ao Depto. de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP pelo uso dos Microscópios Eletrônicos de Varredura e de Transmissão;
- À coordenação e aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP, especialmente à Antonia M. Ferreira Lima e Adriane C. Sarti-Sprogis, pela cooperação indispensável;
- Ao Prof. Dr. Evaldo Vilela do Depto. de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, pelo fornecimento dos besouros para a realização deste trabalho;
- À CAPES, pelo suporte financeiro;
- Aos Amigos, Irani Quagio-Grassiotto e Lúcio A.O. Campos, pela colaboração e sincera amizade;
- Aos amigos de "mesa", Carmen, Heidi, Lúcia, Ronaldo, Tereza, Urara, Helenice, Angelo e Estela, pela amizade e bate-papo;
- Ao meu pai e meus irmãos Lilia, Francisca, Lula, Dezinho, Naninha e Luordinha, pela amizade que nos uni;
- À Zezé, pela compreensão e carinho;
- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Conteúdo

1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1 Características gerais dos testículos de insetos	7
4.2 Características gerais dos espermatozóides dos insetos	8
5 OBJETIVOS	10
6 MATERIAL E MÉTODOS	11
6.1 Material	11
6.2 Métodos	11
6.2.1 Processamento dos Testículos para a Microscopia de Luz	11
6.2.2 Processamento dos Testículos para a Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.	12
6.2.3 Processamento dos Espermatozóides para Coloração Negativa	13
6.2.4 Preparo dos Espermatozóides para Microscopia Eletrônica de Varredura	14
7 RESULTADOS	15
7.1 A Organização dos Espermatocistos no Testículo	15
7.2 Estádios da Diferenciação das Espermátides	15
7.3 Eventos Específicos da Espermiogênese	17
7.3.1 As Transformações Nucleares	17
7.3.2 A Formação do Acrossomo	19
7.3.3 A Formação dos Derivados Mitocondriais	19
7.3.4 O Centríolo	20
7.3.5 O Adjunto do Centríolo	21
7.3.6 A Formação do Axonema	21
7.3.7 A Formação dos Corpos Acessórios	22
7.4 A Morfologia dos Espermatozóides e a Organização do Flagelo.	22
8 DISCUSSÃO	42
8.1 As Alterações Nucleares	42
8.2 A Formação do Acrossomo	44
8.3 Os Derivados Mitocondriais	45
8.4 O Centríolo	49
8.5 A Formação do Adjunto do Centríolo	49
8.6 A Formação do Axonema	50
8.7 A Formação dos Corpos Acessórios.	51
8.8 A Morfologia do Espermatozóide e a Organização do Flagelo	52
9 CONCLUSÕES	54
10 REFERÊNCIAS	56

1 RESUMO

O estudo da espermiogênese foi desenvolvido a partir de cortes ultrafinos de testículos e preparações como coloração negativa e microscopia eletrônica de varredura de espermatozóides obtidos de espermatecas e testículos, respectivamente. A espermiogênese em *Cosmopolites sordidus*, como nos insetos em geral, caracteriza-se pela formação do flagelo e acrossomo, condensação da cromatina, alongamento nuclear e eliminação do citoplasma. As espermátides jovens apresentam características de células somáticas: núcleo esférico cromatina predominantemente frouxa, complexo de Golgi típico e muitas mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma. Estas mitocôndrias fundem-se, a seguir, originando um complexo mitocondrial formado por duas estruturas bem distintas e enroladas uma na outra. Nas primeiras fases da espermiogênese a cromatina, a partir da periferia nuclear, torna-se condensada e, a seguir, assume a forma de filamentos. Estes filamentos, por associações, são convertidos em cordões espessos, os quais, novamente por associações, resultam, inicialmente, em uma cromatina semi-compactada com muitos espaços pequenos e elétrons transparentes em arranjo hexagonal e, finalmente, em uma cromatina homogeneamente compactada característica dos espermatozóides. Simultaneamente a compactação da cromatina o núcleo passa de redondo para alongado e, durante este processo, inúmeros microtúbulos citoplasmáticos formam uma camada simples em torno do núcleo. O acrossomo começa a ser formado já no início da espermiogênese a partir do complexo de Golgi e, nos espermatozóides, é formado por três estruturas, o perforatorium, a vesícula acrossomal e uma camada de material extra-acrossomal. O complexo mitocondrial diferencia-se em dois derivados mitocondriais. No espermatozóide estes derivados são desiguais, onde o maior tem aproximadamente o dobro do menor, em diâmetro, e é quase totalmente preenchido por material paracristalino. O menor é basicamente ocupado por cristas mitocondriais regularmente dispostas em ângulo reto relativo ao seu maior eixo. O axonema do flagelo origina-se do único centríolo observado na espermátide e, inicialmente, possui o arranjo básico de dois microtúbulos centrais e nove duplas de microtúbulos periféricos, formando-se a seguir, os nove microtúbulos acessórios. Durante a alteração do

núcleo de esférico para alongado, observa-se o adjunto do centríolo, uma estrutura eletrondensa em forma de anel que circunda a extremidade anterior do corpúsculo basal. Antes da espermiogênese completar-se, este adjunto centriolar já não é mais observado. Em fases bem adiantadas da espermiogênese os dois corpos acessórios começam a ser formados, um de cada lado do axonema. No espermatozóide, estes corpos acessórios são aproximadamente triangulares, em secção transversal, e envolvem parcialmente o axonema. Cada corpo acessório possui uma expansão constituída de material menos compacto, sendo esta bem mais desenvolvida em um deles. Durante este processo de diferenciação da espermátide, grande parte do citoplasma juntamente com os microtúbulos e demais organelas tais como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e polissomos livres são eliminados, resultando em um espermatozóide muito longo e fino, medindo aproximadamente 160µm de comprimento.

2 SUMMARY

The spermiogenesis of *Cosmopolites sordidus* was investigated with the use of thin sections, negative staining preparations, and scanning electron microscopy of spermatid cells obtained from the testicles or spermathecae. In this species as with insects in general, this process is characterized by the following events: flagellar formation, chromatin condensation, nuclear elongation and shearing of excess cytoplasm. Early spermatids are similar to somatic cells in that they have spherical nuclei with predominantly loose chromatin, a typical Golgi complex and many scattered mitochondria. These mitochondria fuse to form a mitochondrial complex made up of two distinct mitochondrial structures which curl around each other. In the first stages of spermiogenesis, chromatin begins to condense at the nuclear periphery and from this dense mass, regular filaments are formed. These filaments fuse into thick cords which, in turn, associate laterally, resulting in semi-compact chromatin with hexagonally arranged clear spaces. Finally, with the disappearance of these spaces, an homogeneously compact nucleus is obtained, typical of spermatozoa. The nuclear shape changes, simultaneously with chromatin condensation, from spherical to cylindrical, and is surrounded by a single layer of microtubules. The proacrosomic vesicle appears already at early stages of spermiogenesis, through Golgi vesicle fusion and develops into a triple structure, consisting in the perforatorium, the acrosomic vesicle and a layer of extra-acrosomic material. The mitochondrial complex divides into two elongated mitochondrial derivatives. In the spermatozoa, these derivatives are not equal; the larger reaches twice the diameter of the smaller and is almost totally filled with material in a paracrystalline arrangement. The smaller derivative is mostly taken up by regularly spaced cristae, arranged perpendicularly to its greater axis. The flagellar axoneme originates from a single centriole observed in the early spermatid. The axoneme, typical for insects, consists in two central microtubules surrounded by nine doublets, from which nine accessory microtubules are later formed. During nuclear elongation, the centriolar adjunct appears, consisting in an electron dense ring which surrounds the centriole. This centriolar adjunct disappears before spermiogenesis is completed. In later stages, the accessory bodies are formed on each side of the axoneme.

In the mature flagellum, these structures, observed in transverse section, are triangular and partially surround the axoneme. Each dense, accessory body has a less compact extension which is considerably larger for one of them. During spermatid differentiation, most of the cytoplasm, together with the microtubules, Golgi complex, endoplasmic reticulum and free polysomes are eliminated, resulting in a long, thin spermatozoon, about 160 μ m in length.

3 INTRODUÇÃO

O moleque-da-bananeira, também conhecido como gorgulho, broca-do-rizoma ou broca-da-bananeira, é um curculionídeo da subfamília Rhynchophorinae que, segundo MONTELLANO (1954, apud VIANA, 1991), foi descrito por E.F.GERMAR em 1824 como *Calandra sordida*. Segundo SARAIVA (1964), o gênero *Cosmopolites* foi criado por Chevrolat em 1885 quando, então, este coleóptero passou a ser conhecido como *Cosmopolites sordidus* (Germar).

O *C. sordidus* é nativo do sudeste da Ásia (CUILLÉ, 1950) e atualmente este distribui-se por toda a Ásia e ainda pelas Américas, África e Oceania (CUILLÉ, 1950; MONTELLANO, 1954, apud VIANA, 1991; SIMMONDS, 1966; BECCARI, 1967a e 1967b; FEAKIN, 1975). Sua ocorrência no Brasil foi registrada por Chevrolat em 1885 (CUILLÉ, 1950).

Este curculionídeo é considerado a principal praga da bananeira. Estima-se que a produção brasileira dos bananais reduza-se em até 30%, devido ao ataque desta praga (ARLEU & SILVEIRA-NETO, 1984). As fêmeas colocam seus ovos no pseudocaule da bananeira em orifícios feitos com o rostro (FONSECA (1936) e MONTELLANO (1954), apud VIANA, 1991). Ao alimentarem-se, as larvas fazem galerias no rizoma e na porção inferior do pseudocaule, matando o sistema radicular da planta. Em consequência, as plantas tombam por não resistirem ao peso do cacho ou pela ação do vento (MOREIRA, 1979). Outros sintomas são o amarelecimento das folhas que morrem prematuramente e a redução no peso dos cachos com frutos curtos e finos.

Desde a descrição deste besouro como praga da bananeira na Somália (BECCARI, 1967a e 1967b), este curculionídeo figura entre os insetos mais estudados do ponto de vista biológico e fitopatológico. O principal método de controle do *Cosmopolites sordidus*, assim como da grande maioria dos insetos pragas, ainda é feito com o uso de inseticidas. Este método de controle, além de causar problemas ao homem e ao meio ambiente como um todo, pode ocasionalmente perder sua efetividade com o inevitável aparecimento de indivíduos resistentes.

Visto que para o desenvolvimento de um controle populacional mais específico e compatível com o meio ambiente, a morfologia e a fisiologia do sistema reprodutivo dos indivíduos devem ser conhecidas, neste trabalho foram descritas a estrutura dos espermatozoides bem como a espermiogênese do besouro *Cosmopolites sordidus*, um inseto de considerável importância econômica.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Características gerais dos testículos de insetos

A maioria das espécies de insetos possui um par de testículos e cada testículo é formado por um ou vários folículos (PHILLIPS, 1970). O número e a forma dos folículos variam bastante de um grupo de insetos para outro (IMMS (1948), WIGGLESWORTH (1953) e ROSS (1961), apud PHILLIPS, 1970). Cada folículo contém muitos cistos, cada qual constituído por clones de células germinativas revestidas por uma camada de células epiteliais não germinativas (BACCETTI & BAIRATI, 1964). Como é típico dos insetos, as divisões e o desenvolvimento das células germinativas dentro de um dado cisto ocorrem sincronicamente. As pontes citoplasmáticas que resultam das citocineses incompletas fazem de cada clone um sincício funcional (BACCETTI & BAIRATI, 1964; HOAGE & KESSEL, 1968). O número de espermátides por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como 2^n onde "n" é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8. Parece ser comum para a maioria dos besouros, borboletas e mariposas os cistos contendo 256 (ou 2^8) espermátides (PHILLIPS, 1970). Os cistos contendo espermatogônias, espermatócitos ou espermátides jovens são em geral aproximadamente esféricos. Conforme as espermátides se tornam alongadas, os cistos também se alongam e as espermátides tornam-se alinhadas paralelamente ao longo de seus comprimentos. Em estádios mais tardios o alinhamento das espermátides no mesmo cisto é, em muitos casos, quase perfeito. Deste modo um corte transversal deste cisto seccionaria todas as espermátides aproximadamente no mesmo nível (PHILLIPS, 1970). As cabeças dos espermatozóides maduros situam-se geralmente embricadas no citoplasma das células císticas, enquanto suas caudas ou parte destas, ficam livres na luz do cisto (PHILLIPS, 1970).

4.2 Características gerais dos espermatozóides dos insetos

A cabeça dos espermatozóides dos insetos é geralmente muito delgada e longa. Na superfamília Curculionoidea seu comprimento varia de 17 a 83µm ou mais (BURRINI *et alii*, 1988). Esta é formada por um complexo acrossomal anterior, seguido pelo núcleo. O acrossomo em insetos, como para todos os animais, é derivado do complexo de Golgi. As primeiras evidências foram fornecidas, em vários insetos, por BEAMS *et alii* (1956), CLAYTON *et alii* (1958), ITO (1960), GATENBY & TAHMISIAN (1959) entre outros (apud BACCETTI, 1972). O complexo acrossomal típico dos insetos é formado por 3 camadas justapostas ou concêntricas. A camada mais externa, camada extra-acrossomal, é formada pela agregação de grânulos citoplasmáticos e é revestida pela membrana plasmática (BACCETTI, 1972). O acrossomo propriamente dito situa-se imediatamente abaixo da camada extra-acrossomal, tem origem a partir do complexo de Golgi e possui sua própria membrana, a mesma que originalmente revestia o grânulo pró-acrossomal derivado do Golgi (KAYE, 1962). A terceira camada é uma estrutura compacta situada internamente ao acrossomo e que possui uma forma geralmente cônica. Ela as vezes é chamada de "cone interno" e é formada durante a espermiogênese no espaço entre o grânulo acrossomal e o envoltório nuclear (BACCETTI, 1972), independentemente do próprio acrossomo ou do complexo de Golgi (KAYE, 1962).

O núcleo do espermatozóide dos insetos é bastante alongado, com a extremidade anterior afilada e a posterior truncada (BACCETTI, 1972). Durante a espermiogênese as fibrilas de cromatina de 30-40Å de espessura são rapidamente convertidas em fibras de 100-200Å que se arranjam paralelamente ao eixo maior do núcleo (WERNER, 1966; CHEVAILLIER, 1970). Estas fibras fundem-se e formam lâminas que, mais cedo ou mais tarde, condensam-se resultando no núcleo compacto e homogêneo do espermatozóide maduro. A condensação da cromatina não é morfológicamente uniforme durante a espermiogênese, algumas vezes a região central do núcleo é a primeira a se condensar; em outras a condensação inicia-se pela periferia (CHEVAILLIER, 1970). Em *Psyllidae*, somente metade do núcleo é ocupada pela cromatina mesmo no espermatozóide maduro (LE MENN, 1966, apud BACCETTI, 1972). No início da espermiogênese forma-se em volta do núcleo uma camada de microtúbulos, a qual provavelmente tem a função de comprimi-lo e alonga-lo (BACCETTI, 1972). Esta camada de microtúbulos não é observada no espermatozóide maduro (KESSEL, 1966).

Na base do núcleo do espermatozóide encontra-se uma estrutura denominada de adjunto do centríolo, segundo nomenclatura sugerida por GATENBY & TAHMISIAN (1959, apud BACCETTI, 1972). Esta é uma estrutura compacta que envolve a região anterior do axonema e é característica dos espermatozoides

de quase todos os insetos. BRELAND et alii (1966) demonstraram, para várias espécies de mosquitos, que o adjunto do centríolo é bastante grande na espermatíde jovem, diminui muito durante a espermiogênese e no espermatozóide maduro é relativamente pequeno. Já em algumas outras espécies de insetos, o adjunto do centríolo desaparece completamente durante a espermiogênese (PHILLIPS, 1970). Alguns autores propuseram que esta estrutura poderia ter a função de manter o flagelo unido à cabeça do espermatozóide (BRELAND et alii (1966) e FAWCETT & PHILLIPS (1969), apud PHILLIPS, 1970).

O flagelo dos espermatozoides dos insetos é, em geral, muito longo, possui um axonema ou filamento axial flanqueado por duas estruturas acessórias. O axonema origina-se a partir do corpúsculo basal e este corpúsculo basal resulta de transformações sofridas pelo centríolo distal durante a espermiogênese (PEROTTI, 1970). Para a grande maioria dos insetos o axonema possui o padrão de "9 + 9 + 2" (2 microtúbulos centrais rodeados por 9 duplas de microtúbulos, que por sua vez são circundados por mais 9 microtúbulos acessórios). Segundo BACCETTI (1972), este padrão foi primeiro observado por ROTHSCHILD (1955) em abelha e por YASUZUMI (1956) em *Drosophila*. As duas estruturas acessórias, denominadas de derivados mitocondriais, têm origem a partir de transformações que ocorrem nas mitocôndrias destes animais durante a espermiogênese. Dependendo do grupo de insetos, estes dois derivados mitocondriais podem ser iguais ou um deles exceder o outro em comprimento e largura (PHILLIPS, 1970). Ainda, para algumas espécies de insetos, somente um derivado mitocondrial é encontrado no espermatozóide maduro (BACCETTI, 1972).

Outra característica dos espermatozoides de insetos é a presença, em algumas espécies, de uma ou duas estruturas alongadas de textura paracristalina situadas paralelamente ao axonema. Estas estruturas foram denominadas de corpos acessórios (BACCETTI, 1972). A origem e a função estes corpos acessórios ainda não foram determinadas.

5 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo principal caracterizar a estrutura e ultra-estrutura da espermiogênese e dos espermatozoides do inseto *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material

Os espécimes de *Cosmopolites sordidus* (Germar), machos e fêmeas adultos, foram obtidos do laboratório do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde estes animais, coletados nos bananais do Estado do Espírito Santo, são mantidos para o estudo da biologia de sua reprodução.

6.2 Métodos

6.2.1 Processamento dos Testículos para a Microscopia de Luz

6.2.1.1 Fixação - Os testículos foram dissecados sob microscópio estereoscópico. Cada um foi dividido em duas partes, cada uma com cerca de 1mm e colocados em solução fixadora de Karnovsky (1965). Após 2 a 3 horas, à temperatura ambiente, os fragmentos foram lavados por uma hora em tampão fosfato 0,1M a pH 7,2.

6.2.1.2 Desidratação - O material foi desidratado em uma série etanólica de concentração crescente: álcool 45% (quinze minutos), álcool 75% (quinze minutos), dois banhos de 10 minutos cada em álcool 95% e três, também de 10 minutos cada, em álcool absoluto. Toda a desidratação foi feita à temperatura ambiente.

6.2.1.3 Pré-infiltração - Esta foi feita à temperatura ambiente, com dois banhos de 30 minutos cada, em uma mistura da solução A (Kit JB-4, Polysciences) e álcool absoluto (1:1 e 2:1, respectivamente).

6.2.1.4 Infiltração - A infiltração foi feita a 4°C, com 3 banhos de 45 minutos cada, em uma mistura da solução A (30ml) e catalisador C (0,27g). Foi também adicionado à esta solução 0,7ml de metilmetacrilato.

6.2.1.5 Inclusão - A resina de inclusão foi preparada com 10ml da solução de infiltração (30ml de solução A e 0,27g de catalisador C) e 0,5ml da solução B (do Kit JB-4). Antes da inclusão propriamente dita, os espécimes foram mantidos por 30 minutos nesta resina a 4°C. A seguir, os fragmentos foram transferidos para cápsulas de gelatina, as quais foram totalmente preenchidas com a resina. Para a polimerização da resina, as cápsulas foram mantidas à temperatura ambiente e no vácuo (o oxigênio impede a polimerização) por uma hora. Após este tempo, elas foram transferidas para estufa a 60°C por uma noite.

6.2.1.6 Obtenção de Cortes Semifinos - Cortes de 0,5 e 1,0µm de espessura foram obtidos em ultramicrotomo LKB ULTRATOME III, com navalhas de vidro. Os cortes foram coletados com pinça fina e colocados sobre uma gota de água em uma lâmina de vidro. Logo após os cortes distenderem-se, o excesso de água era removido com papel de filtro e as lâminas transferidas para estufa a 37°C, por uma hora, para melhor aderência dos cortes.

6.2.1.7 Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) - Antes da coloração, os cortes foram hidratados em uma série etanólica de concentração decrescente: álcool absoluto 10 minutos, álcool 95% por 5 minutos, mais 5 minutos em álcool 75% e, por último, em água destilada por 5 minutos.

Os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por 20 minutos, lavados por 10 minutos em água corrente e corados pela eosina por 12 minutos. Depois de passado rapidamente em água destilada, para retirar o excesso de corante, e secos à temperatura ambiente, o material foi diafanizado em xilol por 5 minutos e montados em bálsamo do Canadá.

As microfotografias foram feitas em filme preto e branco T MAX da Kodak em microscópio Zeiss.

6.2.2 Processamento dos Testículos para a Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.

Os testículos foram dissecados sob microscópio estereoscópico e cada testículo foi dividido em 2 partes com aproximadamente 1mm cada. A dissecação foi efetuada em solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0.1M a pH 7.2, adicionado de sacarose 0.1M e de algumas gotas de cloreto de cálcio 0.1M.

6.2.2.1 Fixação - O material permaneceu na solução fixadora acima referida por 2 a 3 horas e foi então, lavado no mesmo tampão durante 1 hora, efetuando-se 2 trocas. A pós-fixação foi efetuada em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0.1M a pH 7.2, por uma hora (GLAUERT, 1975). Depois de osmificados, os fragmentos foram lavados no tampão fosfato e submetidos ao tratamento por ácido tânico 2% em tampão fosfato por 1 hora. Toda a fixação foi feita a 4°C.

6.2.2.2 Desidratação - Após ter sido lavado em água destilada, o material foi submetido à desidratação em uma série de concentração crescente de álcool etílico, começando com um banho de 15 minutos em álcool 45%, seguido de 15 minutos em álcool 75% e 45 minutos no álcool 95%, em 3 trocas. Até este passo, a desidratação foi feita a 4°C. O álcool 95% foi substituído por álcool absoluto, onde o material permaneceu por 30 minutos, em 3 banhos de 10 minutos cada, à temperatura ambiente. Após a desidratação, efetuou-se a substituição do etanol pela acetona. Primeiro desprezou-se o álcool absoluto e adicionou-se acetona e álcool absoluto na proporção de 1:1, deixando o material nesta solução por 5 minutos. Depois o material foi imerso em acetona pura por 5 minutos, à temperatura ambiente. Esta última etapa foi repetida mais uma vez.

6.2.2.3 Infiltração e Inclusão - Depois de desidratados e embebidos em acetona, os fragmentos de testículos foram transferidos para a solução de infiltração. Esta consistia de uma mistura de Epon e acetona na proporção de 1:1. Nesta solução os espécimes permaneceram por uma noite ou 12 horas, à temperatura ambiente, em frascos abertos. A seguir procedeu-se à inclusão do material em Epon 812 (LUFT, 1961). Os blocos foram transferidos para estufa a 60°C, onde permaneceram por 3 dias, para a polimerização completa da resina.

6.2.2.4 Obtenção dos Cortes Ultrafinos - Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo LKB ULTRATOME III, com navalhas de vidro e de diâmetro. Os cortes foram coletados em telas de cobre de malha 300 e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 2% (WATSON, 1958), por 20 minutos, à temperatura ambiente; e a seguir em solução de citrato de chumbo a 0,2% em solução 0,1N de hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965), por 8 minutos, à temperatura ambiente.

As observações foram feitas em microscópios eletrônicos de transmissão ZEISS EM9S e EM902, operado a 60 e 80kV, respectivamente, e as micrografias foram feitas em filme Kodolith.

6.2.3 Processamento dos Espermatozóides para Coloração Negativa

As espermatecas de fêmeas adultas de *C. sordidus*, foram dissecadas e colocadas em tampão cacodilato 0,1M a pH 7,2, em uma pequena placa de Petri. As espermatecas foram comprimidas suavemente com uma pinça de forma a liberar os espermatozóides para o tampão. Com uma pipeta Pasteur os espermatozóides foram dissociados e a suspensão transferida para um pequeno tubo de ensaio. O material foi submetido ao ultra-som por 2 minutos. Depois de sonicado, pequenas gotas de material foram colocadas em tela de cobre de malha 300 com filme de colódio recobertos com carbono. Após 3 minutos o excesso de tampão foi retirado com papel de filtro. O material foi então tratado com solução de ácido fosfotúngstico a pH 7,0 com hidróxido de potássio (KPT). Passados 2 minutos, o excesso de KPT foi também retirado com papel de

filtro. Após as telas secarem, foram observadas e os espermatozóides fotografados em filme Kodalith em microscópios eletrônicos de transmissão ZEISS EM9S e EM902.

6.2.4 Preparo dos Espermatozóides para Microscopia Eletrônica de Varredura

Os testículos foram dissecados e colocados sobre lamínula, em 2 gotas de fixador I (ácido acético glacial/etanol absoluto/água destilada - 3:3:4). O material foi dissociado o mais rápido possível com estiletos e, em seguida, pingou-se sobre o material, 2 gotas do fixador II (ácido acético glacial/etanol absoluto - 1:1). O fixador II espalha-se por toda a lamínula, empurrando o fixador I para a periferia, de onde ele é removido com papel de filtro. Após 2 a 3 minutos (antes do fixador II secar) acrescentou-se 2 gotas de fixador III (ácido acético glacial). Antes que o fixador III evaporasse totalmente, foi colocada, sobre o material uma solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0.1M a pH 7.2. Após 30 minutos, o material foi lavado no mesmo tampão fosfato, desidratado em álcool 75%, álcool 95% e álcool absoluto, por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. O material foi seco em aparelho de ponto crítico, com CO₂ e recoberto com ouro. As observações e micrografias foram feitas em microscópio eletrônico de varredura Jeol T300.

7 RESULTADOS

7.1 A Organização dos Espermatocistos no Testículo

O *Cosmopolites sordidus* (Figs. 1A e B) possui um par de testículos, cada um formado por dois lóbulos (Fig. 1C), sendo cada lóbulo formado por folículos fundidos (Fig. 1D). As espermátides desenvolvem-se em cistos dentro dos folículos. Em um mesmo folículo são encontrados cistos em diferentes estádios de diferenciação. Entretanto, as espermátides diferenciam-se sincronicamente em um mesmo cisto (Figs. 2A-E). Em estádios bem iniciais da espermiogênese, as espermátides arredondadas encontram-se distribuídas por todo o cisto e seu volume é quase todo ocupado pelo núcleo e pelas mitocôndrias ou complexo mitocondrial (Fig. 2B). Em seguida, devido à formação do flagelo, o citoplasma começa a alongar-se em direção ao centro do cisto, levando os núcleos, ainda esféricos, a ocuparem a periferia deste (Figs. 2C e D). Em fase subsequente, o núcleo passa de redondo a fusiforme (cisto **d** e inserto, Fig. 2C). Conforme a espermiogênese continua, estas espermátides passam por um processo de alongamento bastante acentuado do núcleo e do flagelo, resultando em espermatozóides muito longos e finos (Fig. 2E). O alongamento de todos os núcleos dentro do cisto ocorre na mesma direção, de forma que os espermatozóides dispõem-se em feixes, com a maioria dos núcleos na mesma altura e todos os espermatozóides com a mesma orientação (Fig. 2E).

7.2 Estádios da Diferenciação das Espermátides

Para facilitar a compreensão da espermiogênese em *C. sordidus*, este processo foi dividido em 10 estádios com base nas principais alterações em nível de núcleo e flagelo. Esta classificação será apresentada de forma sumária.

Estádio 1. As espermátides jovens são células esféricas de núcleo também esférico, com cromatina predominantemente frouxa (Fig. 3A). As mitocôndrias agrupam-se em uma região do citoplasma e iniciam o processo de fusão (Figs. 3A, 10A e B). O complexo de Golgi localiza-se próximo ao núcleo e às mitocôndrias agrupadas (Fig. 3A).

Estádio 2. Neste estágio tem-se um aumento da área de cromatina condensada distribuída pelo núcleo (Fig.3B). O complexo de Golgi apresenta-se mais desenvolvido e, a característica mais marcante é a presença de um complexo mitocondrial ou "Nebenkern" típico, formado após a fusão das mitocôndrias (Figs. 3B e 10C).

Estádio 3. A formação do flagelo começa neste estágio e, em consequência, o citoplasma deste lado alonga-se. O complexo mitocondrial localizado ao lado do axonema de padrão 9 + 2 também começa a alongar-se e, em consequência, o número de camadas diminui. A cromatina em processo de condensação passa a ocupar a periferia do núcleo e, no citoplasma, observa-se grande quantidade de lamelas lisas (Figs. 3C e 11A)

Estádio 4. Nesta fase toda a cromatina está condensada, tem aspecto granular e não preenche todo o volume nuclear. A característica mais marcante deste estágio é a formação dos dois derivados mitocondriais a partir do complexo mitocondrial. No final desta fase é formado o adjunto centriolar e os microtúbulos acessórios do axonema (Fig. 4A).

Estádio 5. A característica deste estágio é a mudança de forma do núcleo, de redonda para fusiforme, e o aparecimento de uma camada simples de microtúbulos associada à face citoplasmática do envoltório nuclear. No final deste estágio a cromatina tem aspecto finamente fibrilar, a base do núcleo é ocupada pelo centríolo e seu adjunto e o ápice, pela vesícula pró-acrossômica (Figs. 4B e C).

Estádio 6. Neste estágio, as células apresentam núcleo em alongamento. A cromatina tem aspecto grânulo-fibrilar grosseiro e muitas áreas elétricas transparentes. Pode-se ainda observar o adjunto do centríolo. No flagelo, os dois derivados mitocondriais passam a possuir diâmetros desiguais, iniciando-se a cristalização de material no derivado maior. O axonema passa a exibir o padrão "9 + 9 + 2" (Figs. 4D, E e 5A).

Estádio 7. O núcleo alongado tem formato oval, em secção transversal, e exibe duas concavidades de um mesmo lado, onde a camada de microtúbulos é descontínua. Durante esta fase a cromatina torna-se filamentosa (Figs. 5B-F) e, no flagelo, começa a cristalização de material no derivado mitocondrial menor e a formação dos dois corpos acessórios (Fig. 12D). O adjunto do centríolo não é mais observado (Fig. 15C).

Estádio 8. A principal característica deste estágio é a associação entre si dos filamentos cromatínicos em cordões espessos e a coalescência destes em massas cromatínicas. Entre os cordões e as massas

cromatínicas existem grandes áreas elétricas transparentes. As concavidades nucleares estão bastante reduzidas e o núcleo, em secção transversal, reassume o contorno arredondado (Figs. 6A-E). No final desta fase todos os cordões cromatínicos coalescem, as áreas elétricas transparentes desaparecem e o núcleo, com diâmetro menor, tem o seu volume todo ocupado pela massa cromatínica. Nesta massa cromatínica observam-se muitos espaços finos e elétricos transparentes, regularmente distribuídos (Figs. 7A-C). No flagelo, continua a aumentar o material paracristalino dos derivados mitocondriais, especialmente no maior, e inicia-se a formação das expansões dos corpos acessórios (Fig. 12E).

Estádio 9. Neste estágio a cromatina apresenta-se totalmente compactada e o núcleo tem formato arredondado, em secção transversal. Os microtúbulos associados ao envoltório nuclear e aos derivados mitocondriais ainda estão presentes. As expansões dos corpos acessórios estão bastante desenvolvidas e o citoplasma é reduzido (Figs. 7D, E e 12F).

Estádio 10. Espermatozóides. Nesta fase final, o citoplasma residual é perdido e com ele, os microtúbulos. O núcleo apresenta cromatina fortemente compactada e homogênea (Figs. 8A-C). O flagelo, em secção transversal, assume forma oval e o derivado mitocondrial maior torna-se quase completamente preenchido por material paracristalino (Figs. 13A-C).

7.3 Eventos Específicos da Espermiogênese

7.3.1 As Transformações Nucleares

O núcleo das espermátides, no primeiro estágio, logo após a 2ª divisão meiótica, é esférico, tem diâmetro em torno de 6,3µm e a cromatina, dispersa, ocupa todo o volume nuclear (Fig. 3A). No segundo estágio observa-se um aumento nas áreas de cromatina condensada espalhadas pelo núcleo (Fig. 3B). No terceiro estágio, aproximadamente metade do volume nuclear está ocupado pela cromatina condensada, mas, esta agora se restringe à periferia do núcleo (Fig. 3C). No quarto estágio, toda a cromatina torna-se condensada, passando a ocupar um menor volume dentro do núcleo, ficando este com uma área de nucleoplasma elétrico transparente (Figs. 3D e 4A). Nesta fase a cromatina tem aspecto granular e, aparentemente, a espermátide ainda possui nucléolo (Fig. 4A). Após esta condensação cromatínica, durante o quinto estágio, o núcleo sofre mudança de formato, passando de esférico à fusiforme (Figs. 4B e C). Esta alteração nuclear coincide com o aparecimento, no citoplasma, de microtúbulos orientados longitudinalmente, em fila única e paralelos ao envoltório nuclear (Fig. 4C). No final desta fase, a área elétrica transparente desaparece e a cromatina passa a apresentar um aspecto finamente fibrilar (Fig. 4C). Nas fases seguintes da espermiogênese as

principais alterações nucleares correspondem ao alongamento do núcleo e a simultânea compactação da cromatina. No sexto estágio a cromatina condensada começa a sofrer rearranjo, passando a exibir aspecto grosseiramente grânulo-fibrilar, sendo circundada por muitas regiões elétrons transparentes. Nesta fase, o núcleo ainda se apresenta arredondado, em secção transversal (Fig. 4D).

No sétimo estágio, a cromatina de aspecto grânulo-fibrilar torna-se filamentososa. Estes filamentos são perfeitamente regulares em diâmetro, medindo aproximadamente 30nm (Figs. 5C-F). Nesta fase o núcleo, em corte transversal, mostra-se ovalado com os eixos X e Z desiguais (Fig. 5B). De um lado do eixo maior (X), o núcleo apresenta-se uniformemente convexo, enquanto do outro forma-se duas concavidades (Figs. 5B-D). A camada de microtúbulos associada ao núcleo e as lamelas lisas que separam estes do restante do citoplasma, são descontínuas nestas duas regiões côncavas (Figs. 5C e D). O processo de formação dos filamentos a partir da cromatina condensada, inicia-se do lado nuclear uniformemente convexo e progride em direção ao lado do núcleo que tem as duas concavidades. No final desta fase, toda a cromatina encontra-se na forma de filamentos de aproximadamente 30nm e estes filamentos, aparentemente, encontram-se associados ao envoltório nuclear de um lado do núcleo (Fig. 5F).

No oitavo estágio, os filamentos cromatínicos começam a se associar, formando cordões de aproximadamente 70nm de diâmetro (Figs. 6B-D). Ao mesmo tempo, estes cordões vão coalescendo em massas cromatínicas, inicialmente na periferia do núcleo (Fig. 6B). Entre os cordões não coalescidos e as massas cromatínicas, têm-se áreas nucleoplasmáticas elétrons transparentes relativamente grandes. Quando todos os cordões cromatínicos coalescem, estas áreas nucleoplasmáticas elétrons transparentes não são mais observadas e o núcleo reduz-se em diâmetro (Figs. 7A-C).

A associação entre filamentos de 30nm para formar os cordões de 70nm, ocorre de tal forma que, no centro destes últimos permanece um espaço elétron transparente de aproximadamente 15nm. Da mesma forma, quando os cordões de 70nm coalescem, entre eles também surgem espaços iguais, de modo a torná-los indistinguíveis dos espaços dos cordões. Estes pequenos espaços elétrons transparentes, na massa cromatínica, têm distribuição bastante regular, formando hexágono, e distância de 35nm entre si (inseto, Fig. 6D).

Durante o nono estágio, a cromatina sofre uma maior compactação, desaparecem os pequenos espaços elétrons transparentes e o diâmetro do núcleo é bastante reduzido (Fig. 7D). Nesta fase, ainda estão presentes a camada de microtúbulos, mais próximos entre si, e as duas regiões que anteriormente formavam as concavidades nucleares (Fig. 7D). Em corte longitudinal, observam-se pequenas estruturas eletrondensas regularmente distribuídas entre os microtúbulos e o núcleo (Fig. 7E). As lamelas lisas que separavam os microtúbulos do resto de citoplasma não são mais observadas (Figs. 7D e E).

Finalmente, no espermatozóide, décimo estágio, o núcleo é bastante longo e fino e a cromatina alcança a sua compactação máxima. O restante de citoplasma juntamente com a camada de microtúbulos desaparece completamente (Figs. 8A-C).

7.3.2 A Formação do Acrossomo

A formação do acrossomo inicia-se já no segundo estágio. Uma vesícula de eletrondensidade média, situada entre o núcleo e o complexo de Golgi é vista na figura 9A. Aparentemente esta vesícula é derivada do complexo de Golgi e dará origem ao acrossomo. No quarto estágio, esta vesícula pró-acrossômica torna-se justaposta ao núcleo e a região de contato com o envoltório nuclear é relativamente plana e mais eletrondensa (Fig. 9B, inserto). No quinto estágio, durante a alteração na forma do núcleo, a vesícula pró-acrossômica move-se anteriormente, alcançando o ápice deste e assume a forma de calota (Figs. 9C e D). Em fase da espermiogênese correspondente ao oitavo estágio, o acrossomo, já bastante desenvolvido, apresenta suas três estruturas: o perforatorium, a vesícula acrossômica e o material extra-acrossomal (Fig. 9E). Nas fases finais da espermiogênese, a redução no diâmetro do núcleo é acompanhada pela do acrossomo e o menor diâmetro do acrossomo se deve à redução na espessura da parede da vesícula acrossômica. O material extra-acrossomal também aumenta, localizando-se mais anteriormente (compare as Figs. 9E e G). A vesícula acrossomal assemelha-se a um cone invertido revestindo o perforatorium (Fig. 9G). Também nestas fases finais forma-se uma cavidade de aproximadamente 100nm, na extremidade anterior do núcleo, a qual é ocupada pela base do perforatorium (Fig. 9G).

7.3.3 A Formação dos Derivados Mitocondriais

Na espermátide jovem, logo após a segunda divisão meiótica, primeiro estágio, as numerosas mitocôndrias, agrupam-se em uma determinada região do citoplasma ao lado do núcleo e iniciam o processo de fusão (Figs. 10A e B). No segundo estágio, a espermátide exibe um complexo mitocondrial ou "Nebenkern" típico, resultante da fusão destas mitocôndrias (Fig. 10C). Este complexo mitocondrial, em corte transversal, tem aproximadamente 4µm de diâmetro e é formado por duas estruturas mitocondriais planas e enroladas uma na outra. Cada estrutura tem 160nm de espessura e entre elas há um distanciamento perfeitamente regular de 40nm, onde já existem microtúbulos (Fig. 10C).

No terceiro estágio, conforme o citoplasma da espermátide se alonga, o complexo mitocondrial, já posicionado ao lado do axonema em crescimento, também se alonga (Fig. 11A). Em consequência, o número de camadas vai sendo reduzido e os microtúbulos tornam-se mais próximos entre si (Figs. 10D e E). Observe na figura 10D as camadas enumeradas de 1 a 6 onde os números ímpares indicam camadas de uma mesma

mitocôndria do complexo enquanto os números pares representam camadas da outra. No final deste estágio o número de camadas reduz-se para 4 (Figs. 11B e C). No próximo estágio, as duas estruturas se separam, formando os dois derivados mitocondriais (Figs. 11D e E). Estes dois derivados se dispõem próximos e paralelos entre si e ao lado do axonema. Em seguida estes derivados são separados um do outro e do citoplasma adjacente por uma camada de microtúbulos (Fig. 12A). Em determinadas fases, observam-se lamelas lisas separando microtúbulos e derivados do restante de citoplasma e do axonema (Figs. 12A e C). Inicialmente, os dois derivados possuem diâmetros similares (Figs. 12A e B), mas logo se diferenciam. Concomitantemente a esta diferenciação, dá-se a deposição de um material paracristalino no seu interior, o que ocorre primeiro no maior (Fig. 12C), onde se tornará bem mais desenvolvido. Este material é formado por numerosos bastões em arranjo hexagonal ao longo da face interna da membrana dos derivados, adjacente ao axonema (Fig. 12D). No derivado mitocondrial maior, este material paracristalino continua a aumentar até preencher praticamente todo este derivado (Figs. 12E-F, 13A-C e 17A-D). O derivado mitocondrial menor acumula bem menos material paracristalino (Fig. 12E e 16C), sendo ele tomado quase que totalmente pelas cristas mitocondriais que se dispõem em ângulo reto relativo ao seu maior eixo (Figs. 16D e 17E). A distância entre estas cristas é regular e mede aproximadamente 40nm (Fig. 18E). No derivado mitocondrial maior as cristas mitocondriais têm a mesma disposição e espaçamento, mas são bem curtas e limitam-se à periferia de um dos lados deste derivado (Figs. 12G e 17C).

No espermatozóide, em secção transversal, o derivado mitocondrial menor é elíptico com dimensões de 0,18 e 0,23 μ m, enquanto o maior tem secção arredondada com diâmetro por volta de 0,30 μ m (Figs. 13A-C). A extremidade anterior deste derivado encontra-se inserida em uma cavidade na base do núcleo (Fig. 15G). Nesta fase a camada de microtúbulos que circundava cada derivado não é mais observada.

7.3.4 O Centríolo

Em *C. sordidus* a espermátide retém, aparentemente, um único centríolo, o qual dará origem ao axonema. Na espermátide jovem este centríolo se posiciona em uma depressão lateral do núcleo e apresenta uma estrutura centriolar típica de 9 trincas de microtúbulos (Fig. 14A). No quinto estágio, concomitantemente com a transformação do formato nuclear, o centríolo alcança sua posição posterior definitiva (Fig. 15B). No espermatozóide a configuração centriolar inicial de 9 trincas de microtúbulos não é mais mantida, os microtúbulos apresentam-se organizados, como no axonema, em duplas mais um microtúbulo acessório para cada dupla. Obviamente, não possui os dois microtúbulos centrais (Fig. 15H).

7.3.5 O Adjunto do Centríolo

Na espermatíde jovem, logo que o centríolo se associa ao envoltório nuclear, observa-se entre estes uma pequena estrutura eletrondensa que, presumivelmente, irá contribuir para a formação do adjunto do centríolo (Fig. 14A). Nas primeiras fases da espermiogênese, durante todas as alterações das mitocôndrias até a formação dos derivados mitocondriais, início do terceiro estágio, o adjunto do centríolo não apresenta desenvolvimento significativo, restringindo-se à pequena estrutura eletrondensa inicial (Fig. 11E). Entretanto, antes de qualquer alteração significativa nos derivados e na forma do núcleo, ocorre uma rápida deposição de material eletrondenso em torno da porção anterior do centríolo, formando assim o adjunto do centríolo (Figs. 14B-E). Este adjunto tem a forma de um anel que circunda o centríolo (Fig. 14D) por uma extensão de aproximadamente 400nm (Fig. 14E).

No quinto estágio, durante a transformação nuclear, o adjunto do centríolo aumenta (Fig. 15A) e, no final desta fase ele, juntamente com a extremidade anterior do centríolo, ocupam toda a base do núcleo (Fig. 15B). Este adjunto centriolar tem aspecto finamente granular e apresenta áreas elétrons transparentes (Figs. 14E e 15B). Observe que o adjunto do centríolo não impede que a extremidade anterior do centríolo se aproxime da membrana nuclear, onde esta se apresenta mais espessa. Isto não acontece com os derivados mitocondriais, que permanecem afastados do envoltório nuclear (Figs. 14E e 15B).

A partir do sétimo estágio, fase em que toda a cromatina se encontra na forma de filamentos de 30nm de diâmetro, o adjunto centriolar desaparece completamente e os derivados mitocondriais aproximam-se do envoltório nuclear (Fig. 15C).

7.3.6 A Formação do Axonema

O axonema começa a ser formado em fases bem iniciais da espermiogênese. Ele origina-se a partir do centríolo situado na depressão do envoltório nuclear (Fig. 14A). No segundo estágio da espermiogênese, já se observa o axonema em formação ao lado do complexo mitocondrial (Fig. 10C).

Durante o terceiro estágio, simultaneamente ao alongamento do citoplasma, tem-se o crescimento do axonema (Fig. 11A). No final do quarto estágio ocorre a formação dos microtúbulos acessórios, a partir dos microtúbulos B das duplas periféricas (Figs. 4A e 12A). Após esta fase o axonema encontra-se organizado na sua configuração definitiva, sendo formado por dois microtúbulos centrais, nove duplas periféricas e nove microtúbulos acessórios, padrão "9 + 9 + 2" (Fig. 12B).

No sétimo estágio, fase da espermiogênese em que se inicia a formação dos corpos acessórios, ocorre deposição de material eletrondenso no interior dos nove microtúbulos acessórios e em um dos microtúbulos

centrais (Fig. 12D). É provável que seja também nesta fase que ocorra a formação das fibras densas associadas às duplas de microtúbulos (Fig. 12F).

7.3.7 A Formação dos Corpos Acessórios

A formação dos dois corpos acessórios inicia-se no sétimo estágio da espermiogênese. Estes surgem inicialmente como duas pequenas estruturas eletrondensas, situadas em lados opostos do axonema, de tal modo que cada uma posiciona-se no vértice de um ângulo reto entre o axonema e o derivado mitocondrial do mesmo lado (Fig. 12D). Desde o início estas estruturas já estão associadas a microtúbulos, exceto na face voltada para o axonema (Fig. 12D). No nono estágio observa-se, em cada corpo acessório uma expansão formada de material menos eletrondenso. Estas expansões localizam-se entre o corpo acessório e o derivado mitocondrial do mesmo lado. A camada de microtúbulos que envolve parcialmente cada corpo acessório em formação, aumenta e passa a envolver também as expansões pelo lado adjacente à membrana plasmática (Fig. 12F). O crescimento destas expansões faz com que os derivados mitocondriais distanciem-se do axonema (compare as figuras 12E e 12F). Este crescimento é bem mais acentuado na expansão do corpo acessório situado do mesmo lado do derivado mitocondrial maior (Fig. 12F). Durante a última fase da espermiogênese, os corpos acessórios, em corte transversal, adquirem a forma aproximadamente triangular e suas expansões passam a ocupar cerca de 1/3 da área transversal do flagelo (Fig. 13B-C).

7.4 A Morfologia dos Espermatozóides e a Organização do Flagelo.

Os espermatozóides de *C. sordidus*, como na maioria dos Curculionoidea, são bastante longos e finos, medindo cerca de 160µm de comprimento (Fig. 18A). A cabeça é fina e longa, com 20µm de comprimento e, a partir da metade, vai afinando levemente em direção à extremidade anterior (Figs. 16A e 18A). O flagelo de *C. sordidus*, é assimétrico e é formado pelo axonema de padrão "9 + 9 + 2", por dois derivados mitocondriais diferentes e por dois corpos acessórios (Figs. 13A-C, 16B e D). Em corte transversal, o flagelo possui forma oval, com o axonema e o derivado mitocondrial maior ocupando extremidades opostas (Figs. 13A-C). Os dois corpos acessórios são estruturas eletrondensas, de secção transversal aproximadamente triangular, que flanqueiam o axonema de forma a circundar aproximadamente metade deste, separando-o dos derivados mitocondriais (Figs. 13A-C). Cada corpo acessório possui uma expansão formada por um material menos compacto, sendo ela bem mais desenvolvida em um deles (Fig. 13B e C). O axonema tem diâmetro constante e é o elemento mais longo do flagelo, seguido pelo derivado mitocondrial maior (n^{os} 1 e 2, Fig. 13A), mesmo embora todos os quatro elementos sejam, quase tão longos quanto o axonema (Fig. 16C). A figura 18D mostra uma região mediana do flagelo, onde são observados dois

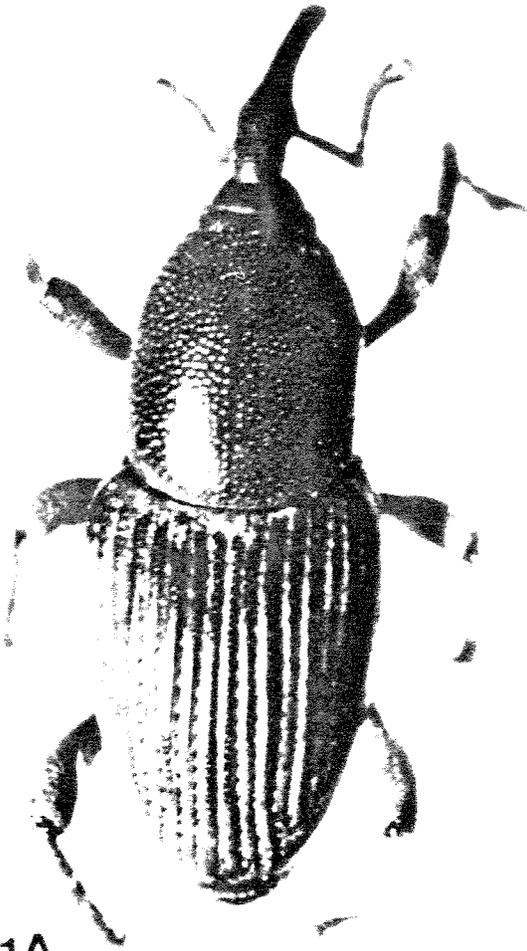
filamentos, um linear e o outro ondulado. Em corte longitudinal, observa-se que o filamento linear corresponde ao derivado mitocondrial maior e que o filamento ondulado é formado pelo axonema, pelo derivado mitocondrial menor e pelos dois corpos acessórios (Fig. 18E).

Prancha 1

Figs. 1A e B. Aspectos dorsal e ventral, respectivamente, do inseto *C. sordidus*. 9X.

Fig. 1C. Fotografia de um dos testículos de *C. sordidus*, formado por 2 lóbulos (lb). Vesícula seminífera (vs). 32X.

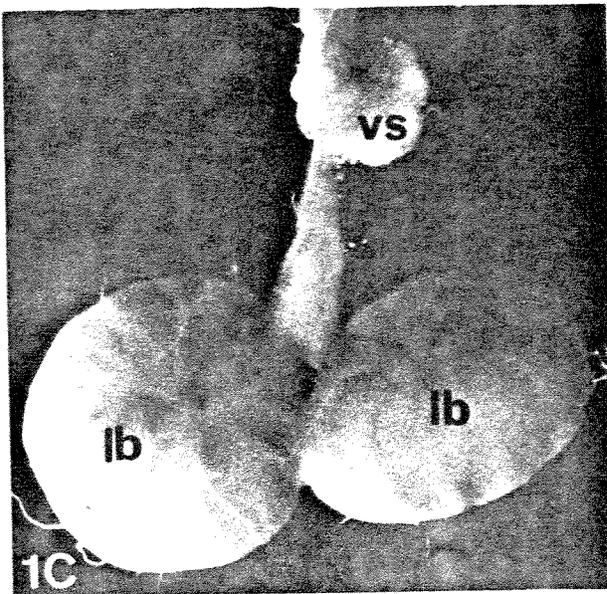
Fig. 1D. Corte transversal de um lóbulo testicular. Notar que o lóbulo é formado por folículos (fc) unidos por tecido conjuntivo (setas). 58X.



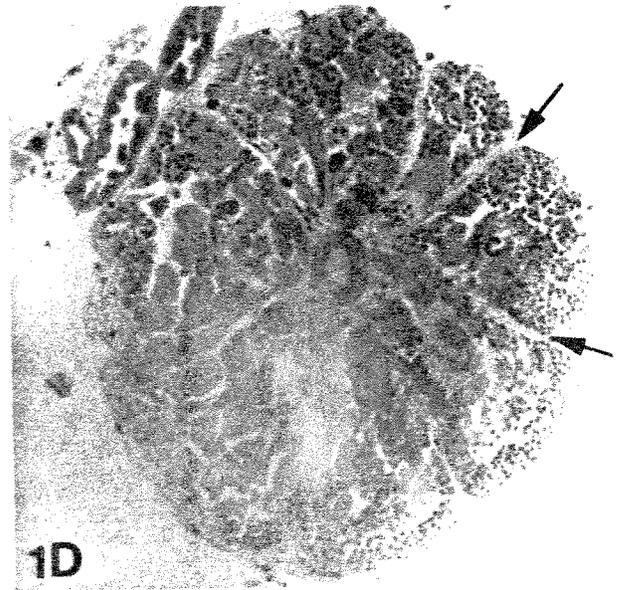
1A



1B



1C



1D

Prancha 2

Figs. 2 A-E. Cortes semifinos de testículos incluídos em historesina e corados pela Hematoxilina e Eosina.

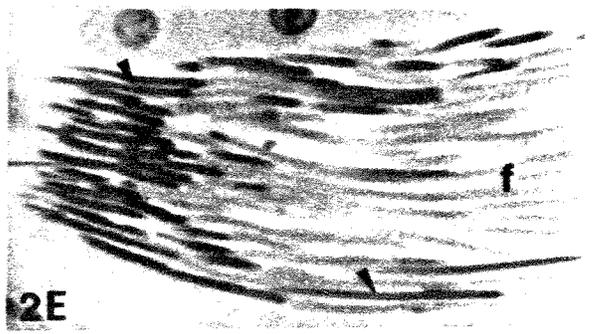
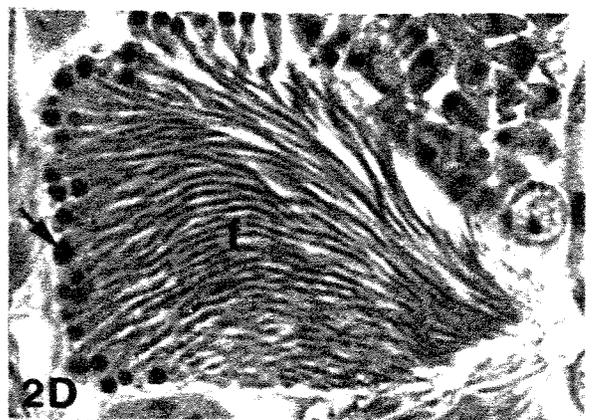
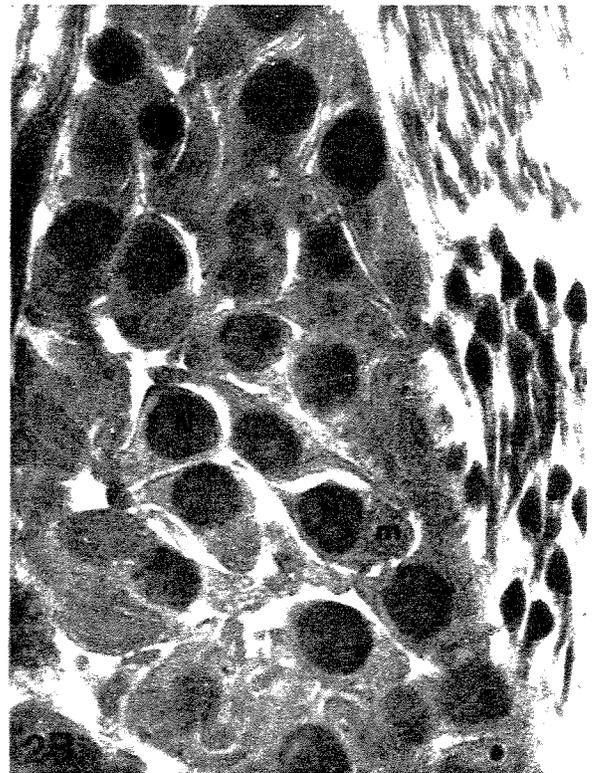
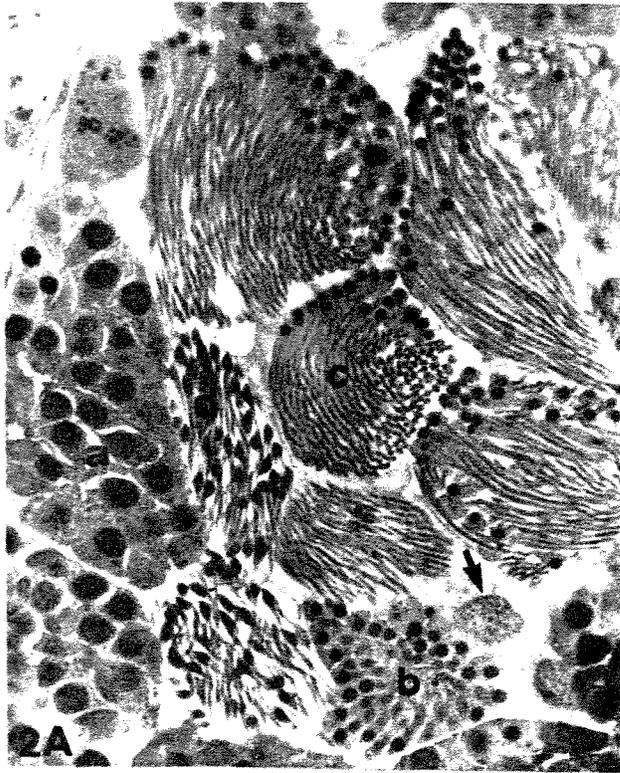
Fig. 2A. Corte transversal do testículo mostrando uma região folicular com vários cistos em diferentes estádios da espermiogênese. As letras **a**, **b**, **c** e **d** indicam cistos em estádios progressivos de maturação. A seta mostra o núcleo de uma célula cística. 580X.

Fig. 2B. Cisto **a** da figura anterior mostrando espermatídes em estágio inicial da espermiogênese. Os núcleos (N) apresentam-se distribuídos por todo o cisto e as mitocôndrias (m) já se encontram agrupadas em uma região do citoplasma. 1.440X.

Fig. 2C. Cistos indicados por **c** e **d** na figura 2A. Observar os núcleos das espermatídes do cisto **d** em fase inicial de alongamento. Adjunto do centríolo (cabeça de seta); flagelos em formação (f). 1.830X. O detalhe mostra um núcleo em fase de alongamento mais adiantada. 3.980X.

Fig. 2D. Cisto com espermatídes em estágio idêntico ao do cisto **c** da figura anterior. As células polarizam-se com disposição periférica dos núcleos (seta), enquanto os flagelos ocupam praticamente todo o cisto. 800X.

Fig. 2E. Corte longitudinal de um feixe de espermatozóides. Notar as cabeças (ponta de seta) bastante longas e finas e todas com a mesma orientação. 840X.



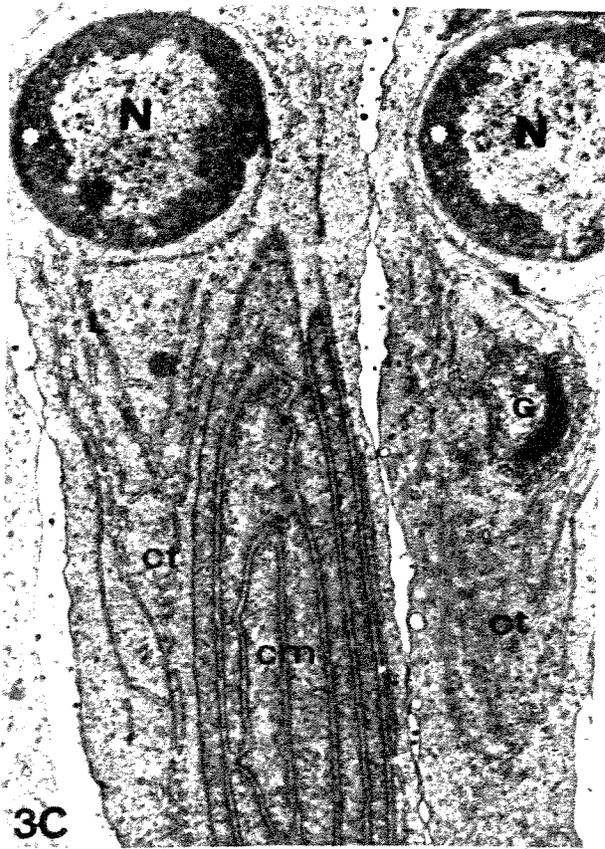
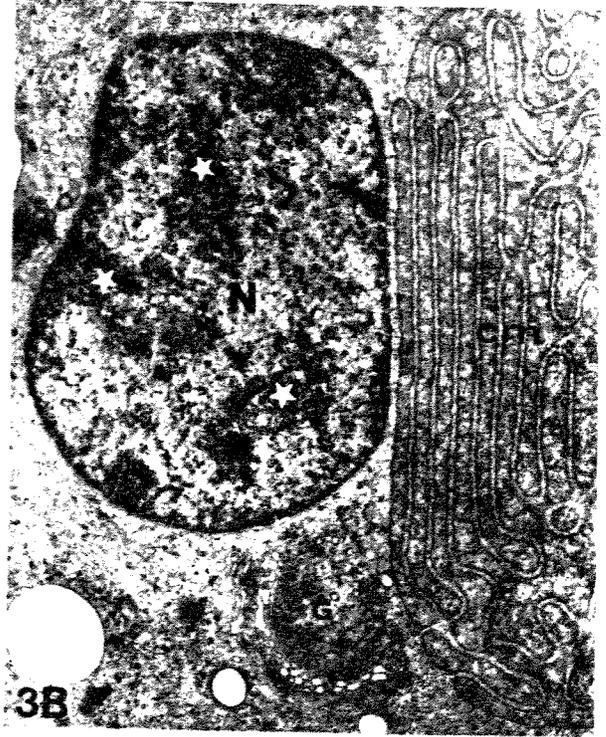
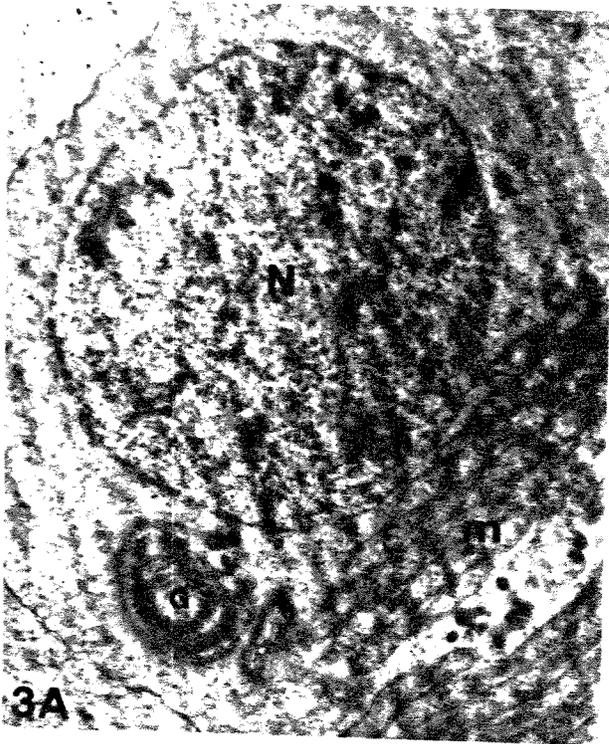
Prancha 3

Fig. 3A. Espermátide bastante jovem, no primeiro estágio da espermiogênese. Notar o núcleo (N) esférico com cromatina predominantemente frouxa. Mitocôndrias (m) agrupadas de um lado do núcleo; complexo de Golgi (G). 7.040X.

Fig. 3B. Espermátide no segundo estágio da espermiogênese. Observar o aumento na quantidade de cromatina condensada (estrelas) espalhada pelo núcleo (N). Complexo mitocondrial (cm); complexo de Golgi (G). 11.680X.

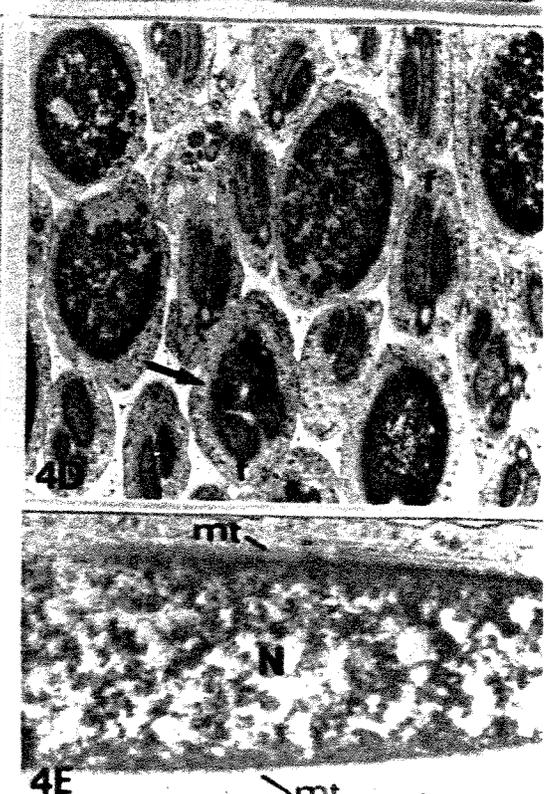
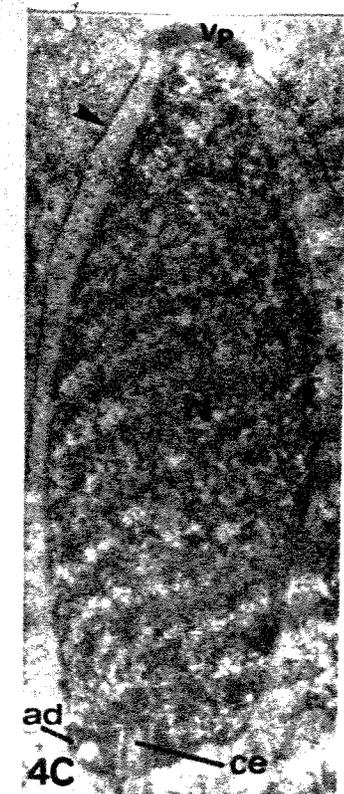
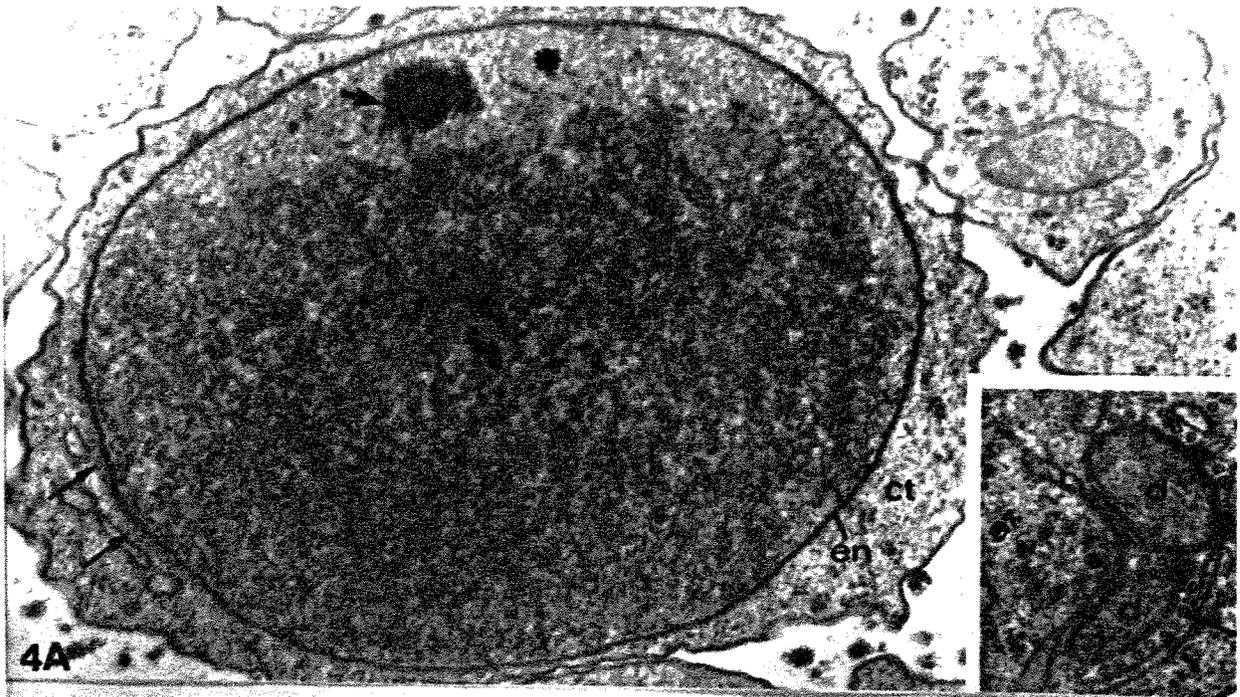
Fig. 3C. Espermátide em começo de alongamento do citoplasma (ct), correspondente ao terceiro estágio. Notar que o diâmetro do núcleo (N) foi muito reduzido e a cromatina condensada (asterisco) passa a ocupar a periferia do núcleo. Lamelas lisas (l); complexo mitocondrial (cm); complexo de Golgi (G). 10.300X

Fig. 3D. Espermátide no início do quarto estágio. Nesta fase toda a cromatina encontra-se condensada. Núcleo (N); área elétron transparente (estrela); derivados mitocondriais (dm); centríolo (seta); ponte citoplasmática (p). 13.000X



Prancha 4.

- Fig. 4A.** Espermátide no final do quarto estágio da espermiogênese. Observar o aspecto granular da cromatina. A seta maior mostra um provável nucléolo. Nucleo (N); área elétrica transparente (asterisco); microtúbulos (setas); citoplasma (ct); envoltório nuclear (en). 43.000X. No detalhe, o flagelo de uma espermátide na mesma fase, mostrando: os derivados mitocondriais (dm), o axonema (ax) e as lamelas lisas (l). 59.870X.
- Fig. 4B.** Espermátide no quinto estágio. Observar o núcleo (N) em transformação, passando de esférico à fusiforme. Vesícula pró-acrossomal (vp); flagelo (f); poros nucleares (setas). 15.560X.
- Fig. 4C.** Corte longitudinal de uma espermátide no final do quinto estágio. Observar que nesta fase o núcleo é fusiforme e a cromatina exibe aspecto finamente fibrilar. Vesícula pró-acrossômica (vp); adjunto do centríolo (ad); centríolo (ce); membrana plasmática (cabeça de seta). 18.290X.
- Fig. 4D.** Espermátide no sexto estágio da espermiogênese, em corte oblíquo, mostrando núcleos (N) e flagelos (f). A cromatina possui aspecto grânulo-fibrilar mais grosseiro e o nucleoplasma áreas de menor densidade. A seta mostra uma espermátide seccionada ao nível da transição núcleo-flagelo. 8.600X.
- Fig. 4E.** Corte longitudinal da região nuclear (N) de uma espermátide em estágio igual ao da figura anterior. Microtúbulos (mt). 25.510X.



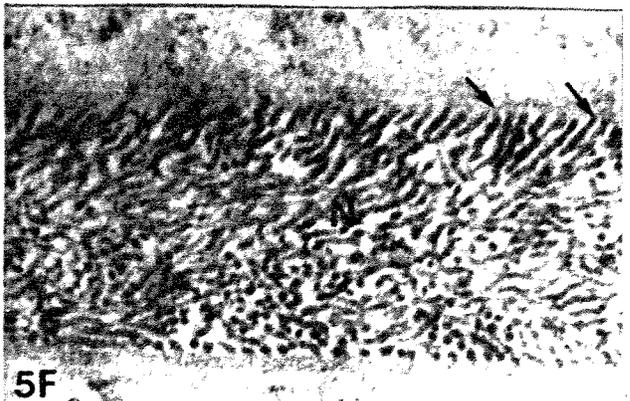
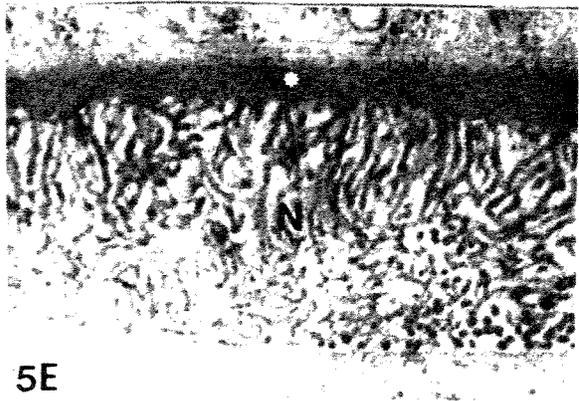
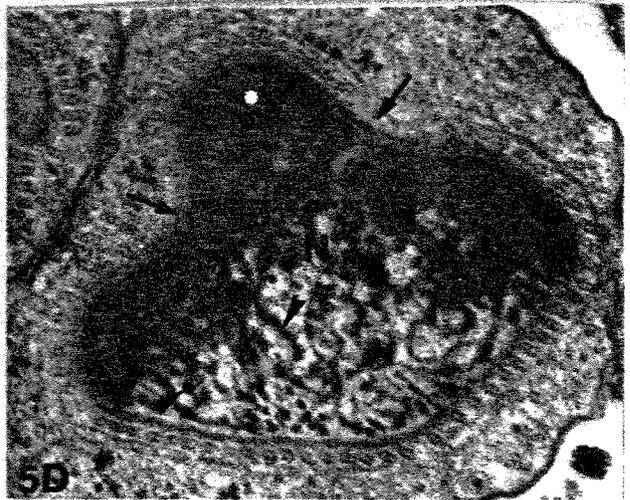
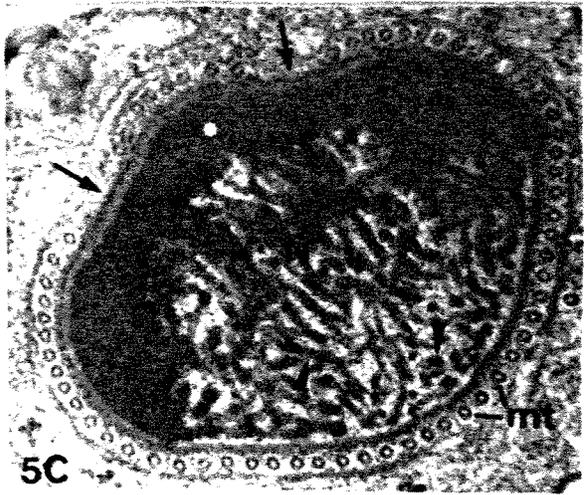
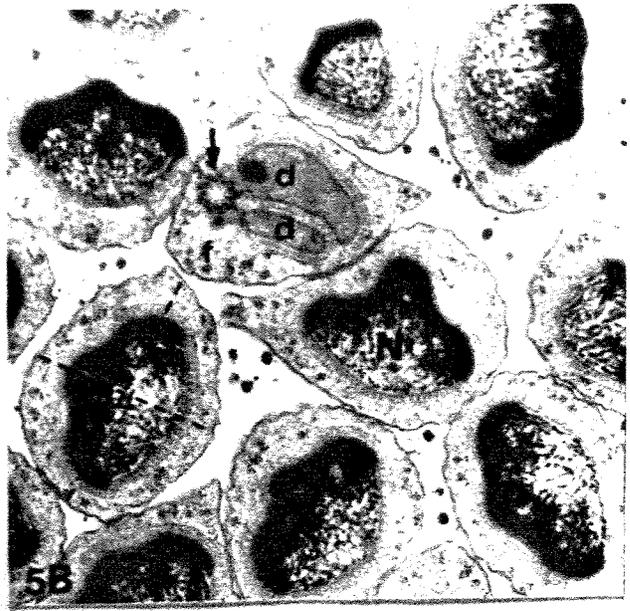
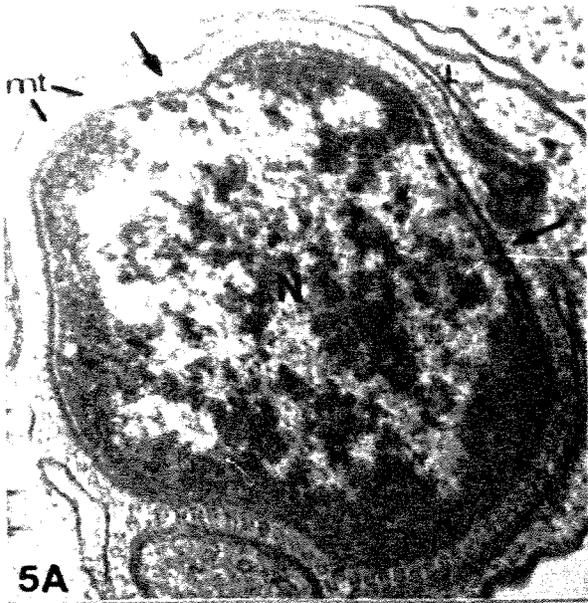
Prancha 5

Fig. 5A. Corte transversal de uma espermatíde no sexto estágio da espermiogênese. O núcleo (N) em secção transversal apresenta-se arredondado e envolvido por uma camada simples de microtúbulos (mt). As setas mostram as duas regiões onde a camada de microtúbulos e as lamelas lisas (L) são descontínuas. 55.100X.

Fig. 5B. Corte transversal de espermatídes no sétimo estágio da espermiogênese. Nesta fase, grande parte da cromatina encontra-se em forma de filamentos e o núcleo (N), em secção transversal, é aproximadamente ovalado com dois eixos representados por X (maior eixo) e Z (menor eixo). Flagelo (f); derivados mitocondriais (d); axonema (seta). 19.640X.

Figs. 5C e D. Maior aumento de duas espermatídes da figura 5B. Observar que as duas regiões onde a camada de microtúbulos (mt) e as lamelas lisas são descontínuas, formam-se concavidades nucleares bastante acentuadas (setas). As cabeças de setas mostram os filamentos cromatínicos e os asteriscos a cromatina condensada ainda não filamentosa. Núcleo (N). C = 68.890X e D = 62.000X

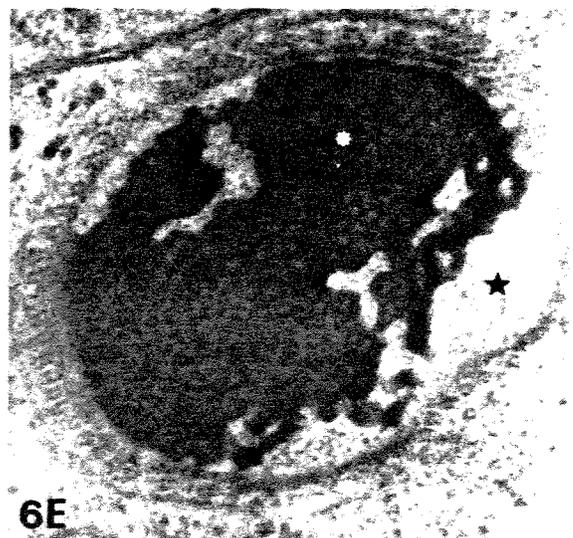
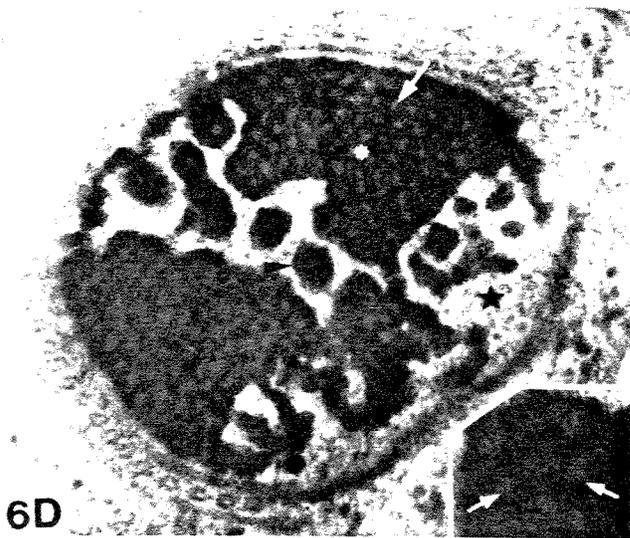
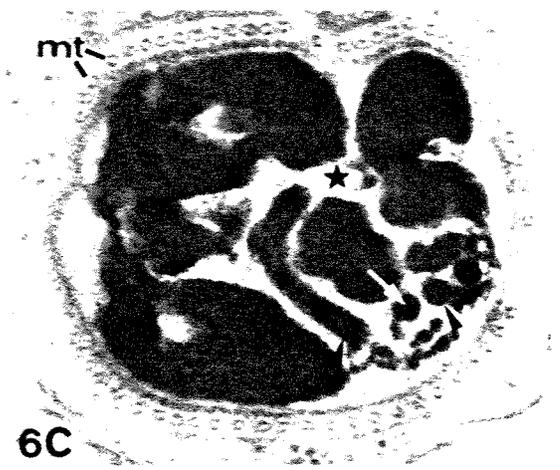
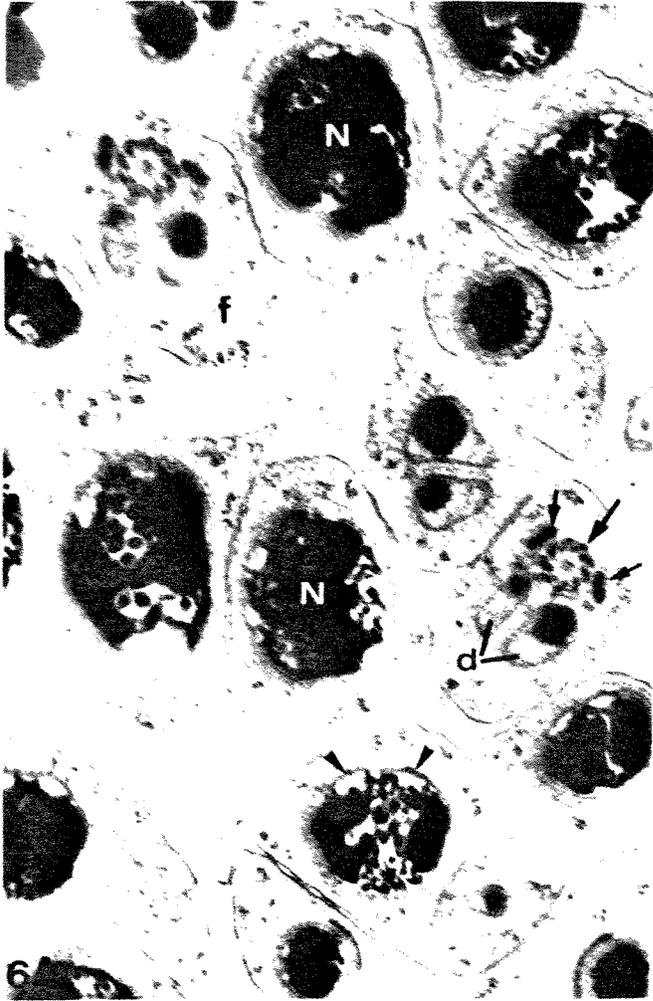
Figs. 5E e F. Cortes longitudinais de espermatídes em estágio igual ao da figura 5B. Observar que todos os filamentos cromatínicos possuem o mesmo diâmetro, aproximadamente 30nm, e que aparentemente estão ligados (setas) à cromatina condensada (asterisco em E) ou ao envoltório nuclear quando não existe mais cromatina condensada (em F). Núcleo (N). 36.920X.



Prancha 6

Fig. 6A. Espermátides no oitavo estágio. Observar que os núcleos (N) reassumiram o perfil arredondado em corte transversal. Quase toda a cromatina se encontra compactada e a maioria dos poucos cordões ainda existentes são espessos (comparar com a Fig. 5B). As cabeças de setas mostram as duas regiões correspondentes às concavidades nucleares da fase anterior. Flagelo (f); derivados mitocondriais (d); axonema (seta maior), corpos acessórios (setas menores). 21.740X.

Figs. 6B-E. Cortes transversais de núcleos de espermátides em estágio igual ao da figura 6A. Observar que tanto na cromatina compactada (asterisco branco) quanto nos cordões cromatínicos espessos (cabeças de setas) existem pequenos espaços elétron transparentes (setas brancas). Na região compactada estes espaços encontram-se regularmente distribuídos (detalhe, Fig. 5D). As regiões nucleoplasmáticas elétron transparentes estão indicadas pelas estrelas. Microtúbulos (mt). B=52.120X, C=57.700X, D=81.000X, inserto=186.130 e E=72.590X.



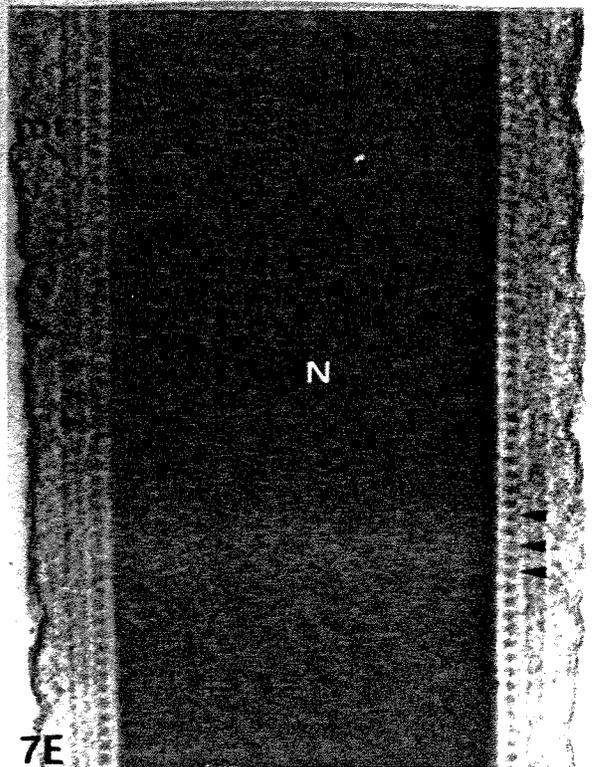
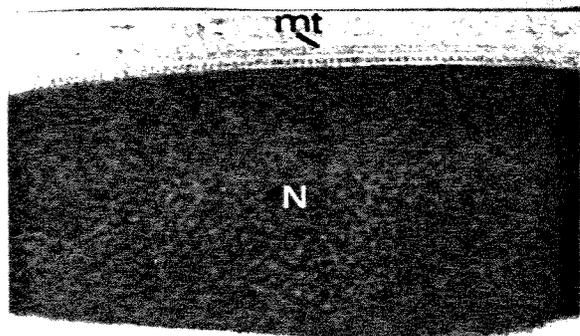
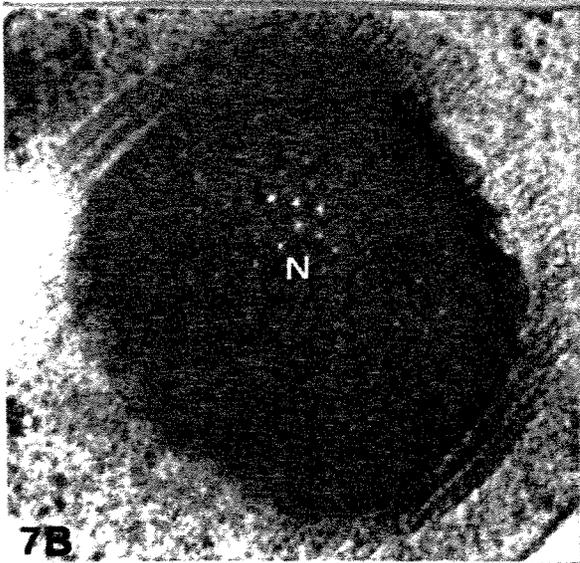
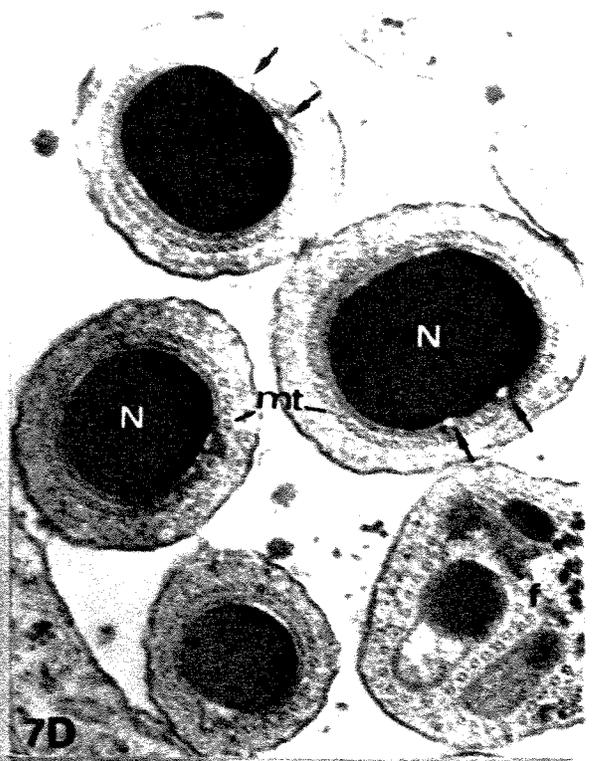
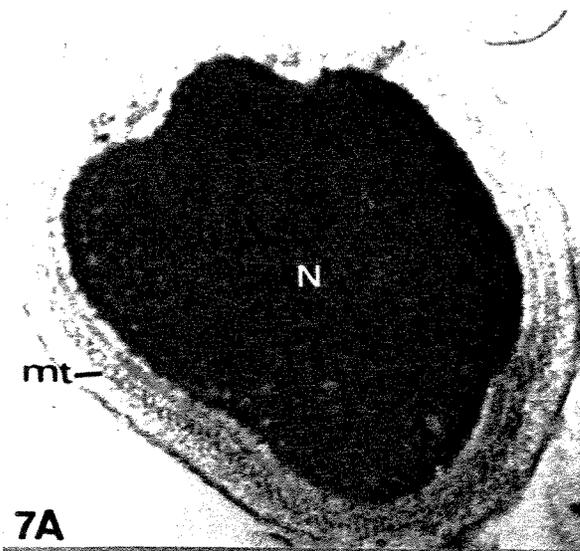
Prancha 7

Fig. 7A. Corte transversal de espermatíde no final do oitavo estágio. Todo o núcleo (N) está tomado pela massa cromatínica, resultante da fusão dos cordões espessos de cromatina e as regiões elétricas transparentes já não existem mais. Microtúbulos (mt). 80.680X.

Figs. 7B e C. Cortes oblíquo e longitudinal, respectivamente, de espermatídes em estágio da espermiogênese igual ao da figura 7A. B=103.000X e C=52.450X.

Fig. 7D. Corte transversal de espermatídes no nono estágio. Observar a cromatina fortemente compactada e os núcleos (N), com secção transversal circular. As setas mostram as membranas nucleares abauladas nas regiões em que os núcleos apresentavam as concavidades. Flagelo (f); microtúbulos (mt). 48.640X.

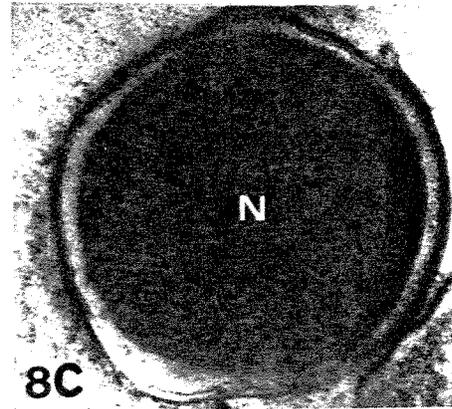
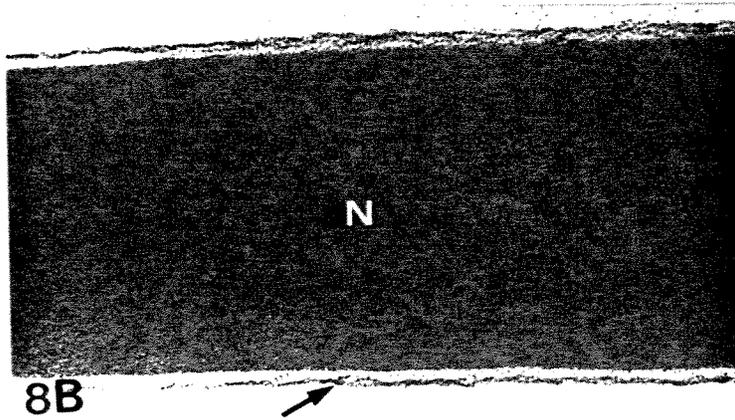
Fig. 7E. Corte longitudinal de uma região do núcleo (N) de uma espermatíde em estágio da espermiogênese igual ao da figura 7D. As cabeças de setas mostram estruturas eletrondensas regularmente dispostas entre os microtúbulos (mt) e o núcleo. 111.280X.



Prancha 8

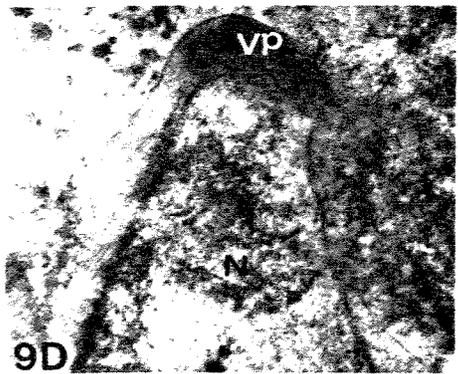
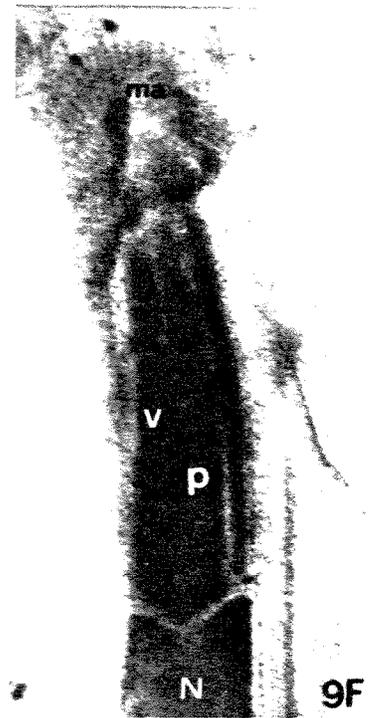
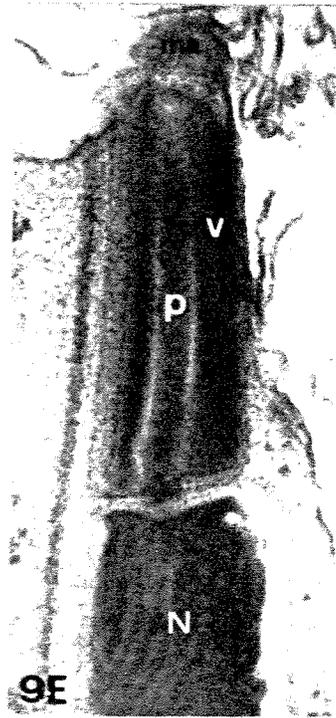
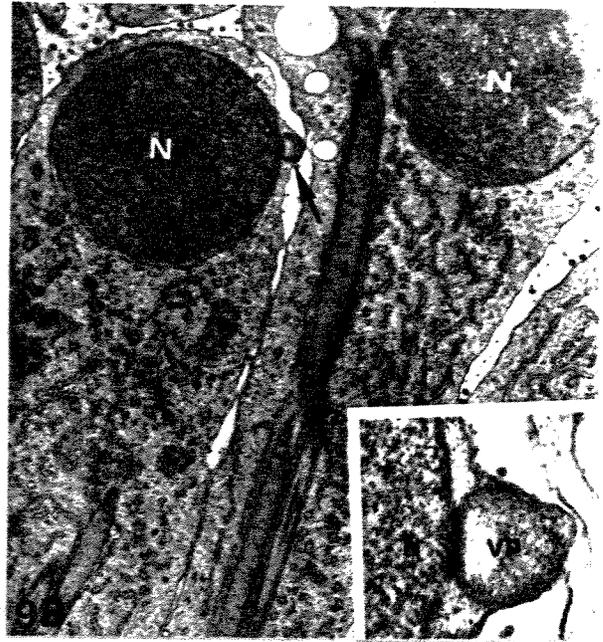
Fig. 8A. Corte transversal de vários núcleos (N) e de um acrossomo (seta) de espermatozóides. Observar que os núcleos apresentam diâmetros diferentes quando seccionados em diferentes alturas, sendo mais anteriores os diâmetros menores. A cabeça de seta indica um núcleo seccionado muito próximo ao acrossomo (seta). 44.400X.

Figs. 8B e C. Cortes longitudinal e transversal, respectivamente, de espermatozóides ao nível de núcleo (N). Notar que o citoplasma foi completamente eliminado. A seta mostra a membrana plasmática. B e C=140.000X



Prancha 9

- Fig. 9A.** Espermátide no segundo estágio, mostrando vesícula pró-acrossômica (vp) situada entre o núcleo (N) e o complexo de Golgi (G). Complexo mitocondrial (cm). 29.850X.
- Fig. 9B.** Espermátide no início do quarto estágio. Vesícula pró-acrossômica (seta) justaposta ao envoltório nuclear. Núcleo (N). 12.130X. Detalhe, maior aumento de uma vesícula pró-acrossômica na mesma fase. 48.400X.
- Fig. 9C.** Espermátide no quinto estágio da espermiogênese. A vesícula pró-acrossômica (vp) assumiu a forma de calota e se posiciona na extremidade anterior do núcleo (N). 34.670X
- Fig. 9D.** Espermátide no final do quinto estágio, mostrando a vesícula pró-acrossômica (vp) que reveste praticamente toda a extremidade anterior do núcleo (N). 34.670X.
- Fig. 9E.** Corte longitudinal de uma espermátide no oitavo estágio da espermiogênese. Observar que nesta fase o acrossomo já possui as suas 3 estruturas, denominadas: perforatorium (p), vesícula acrossômica (v) e material extra-acrossomal (ma). Núcleo (N); 84.000X.
- Fig. 9F.** Corte longitudinal da região anterior de uma espermátide no nono estágio da espermiogênese. O material extra-acrossomal (ma) e o perforatorium (p) estão mais desenvolvidos e a cavidade na extremidade anterior do núcleo (N) começa a ser formada. Vesícula acrossômica (v). 72.610X
- Fig. 9G.** Corte longitudinal de um espermatozóide ao nível de acrossomo. A cavidade na extremidade anterior do núcleo (N) é ocupada pelo perforatorium (p). Material extra-acrossomal (ma); vesícula acrossômica (v); núcleo (N). 75.180X.



Prancha 10

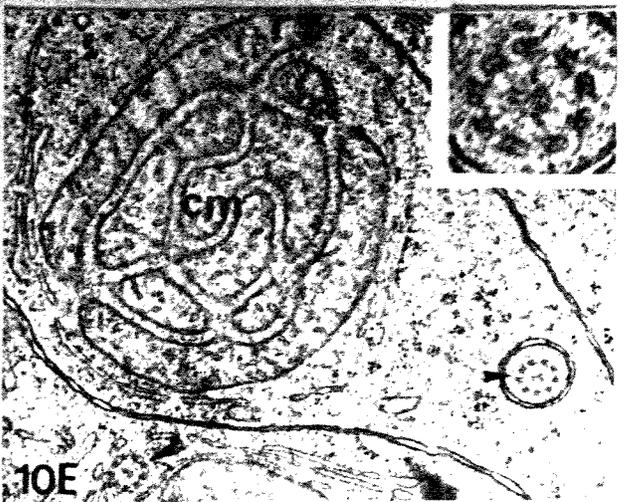
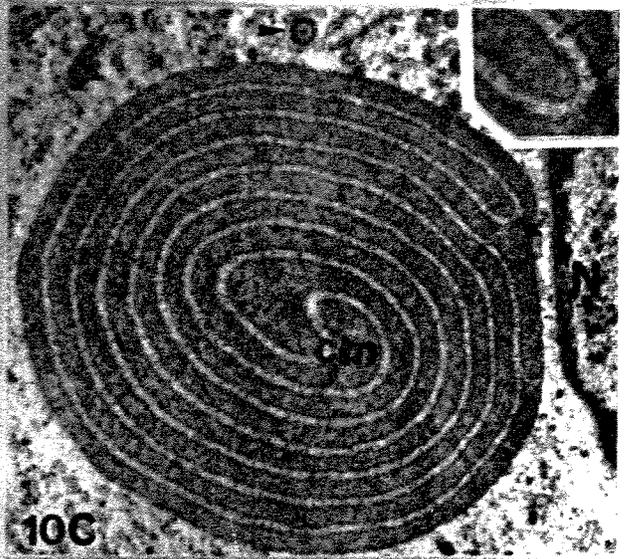
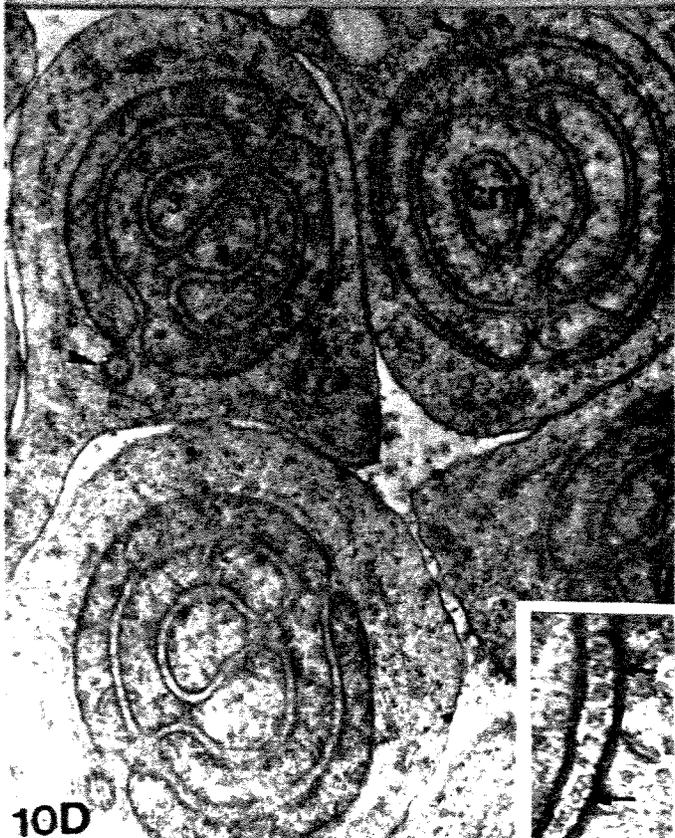
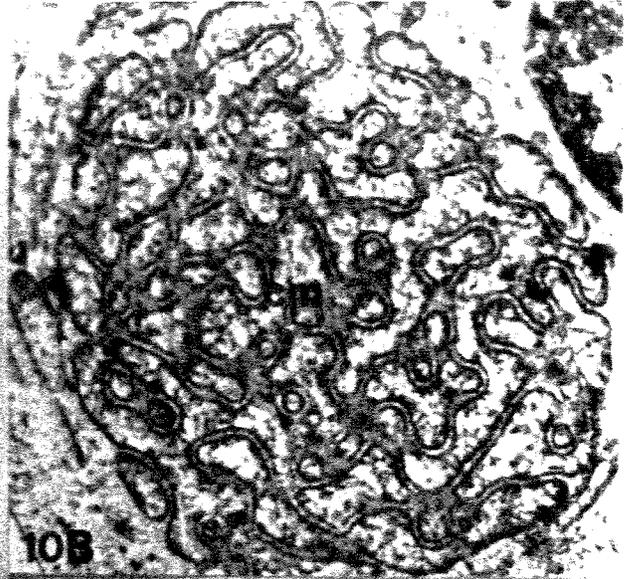
Fig. 10A. Espermátide do primeiro estágio, mostrando mitocôndrias (m) agrupadas em uma região do citoplasma. Núcleo (N); complexo de Golgi (G). 12.760X.

Fig. 10B. Micrografia de um complexo mitocondrial (cm) ou "Nebenkern" em fase de formação. 14.380X.

Fig. 10C. Corte transversal de um complexo mitocondrial (cm) já formado. Observar que o mesmo é constituído de duas estruturas mitocondriais bem definidas e enroladas sobre si mesmas. A cabeça de seta indica o axonema e, no detalhe, as setas pequenas mostram microtúbulos no espaço entre as duas estruturas mitocondriais. Núcleo (N). 16.620X, detalhe=40.000X.

Fig. 10D. Corte transversal de complexos mitocondriais em fase de diferenciação. Observar a redução no número de camadas para seis. 17.520X. O detalhe mostra que os microtúbulos (setas) do espaço entre as mitocôndrias, tornaram-se mais próximas entre si. Axonema (cabeça de seta). 74.000X.

Fig. 10E. Complexo mitocondrial (cm) em fase igual aos da figura anterior. Axonema (cabeça de seta). 22.800X. O detalhe mostra o axonema em maior aumento. 74.000X

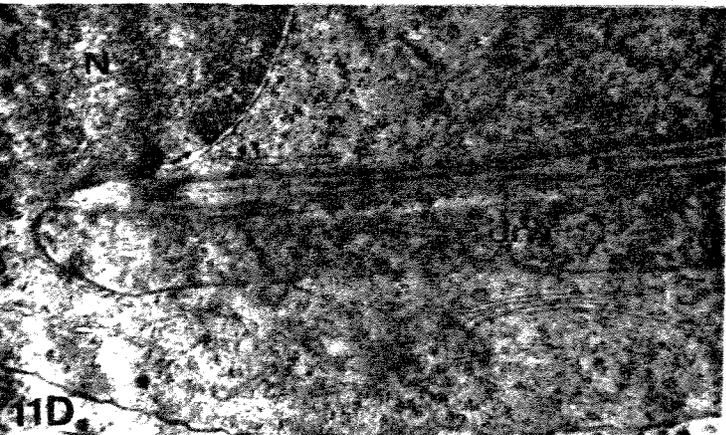
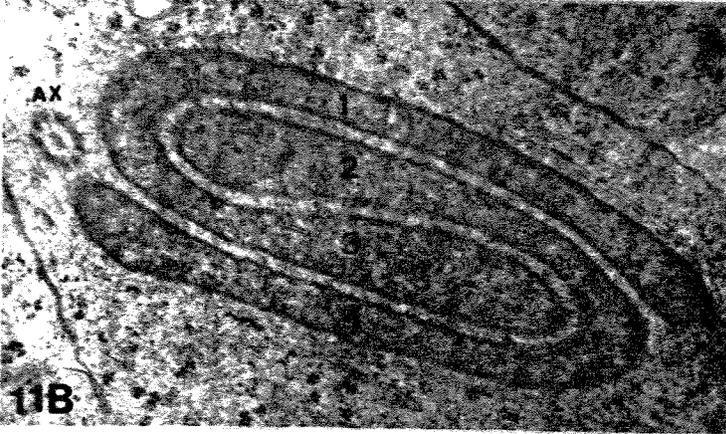
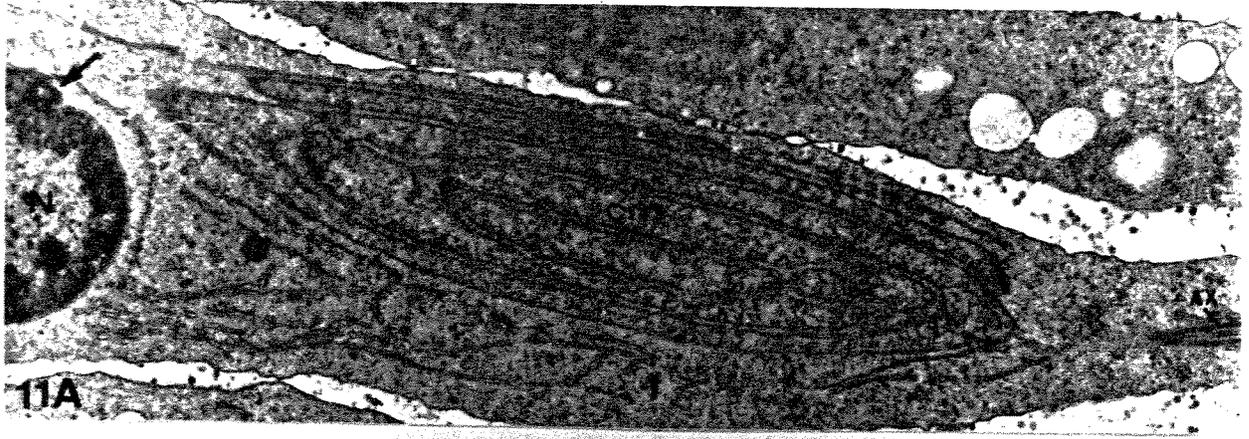


Prancha 11

Fig. 11A. Corte longitudinal de espermátide no terceiro estágio da espermiogênese, exibindo o complexo mitocondrial (cm) em seis camadas, igual aos da figura 10D. Observar a disposição deste em relação ao núcleo (N) e o axonema (ax). Centríolo (seta); flagelo (f). 10.100X.

Figs. 11B e C. Cortes oblíquo e transversal, respectivamente, de complexos mitocondriais (cm) em fase final de diferenciação. Note que o número de camadas reduziu-se para 4 e que as cristas mitocondriais encontram-se distribuídas ao acaso. Núcleo (N); axonema (ax). B=21.370X e C=28.640X.

Figs. 11D e E. Espermátides em início do quarto estágio. Observar que os complexos mitocondriais diferenciaram-se em derivados mitocondriais (dm). Núcleo (N); centríolo (ce); adjunto do centríolo inicial (seta); axonema (ax). D=22.223X e E=25.270X.



Prancha 12

Figs.12A-F. Cortes transversais de flagelos em diferentes estádios da espermiogênese.

Fig. 12A. Final do quarto estágio. As setas mostram os microtúbulos acessórios do axonema (ax) em formação. A cabeça de seta indica o braço de dineína do microtúbulo A de uma das nove duplas. Microtúbulos (mt); lamelas lisas (l); derivados mitocondriais (dm). 78.580X.

Fig. 12B. Quinto estágio. O axonema já se encontra em sua forma final com todos os microtúbulos. Derivados mitocondriais (dm). 45.110X.

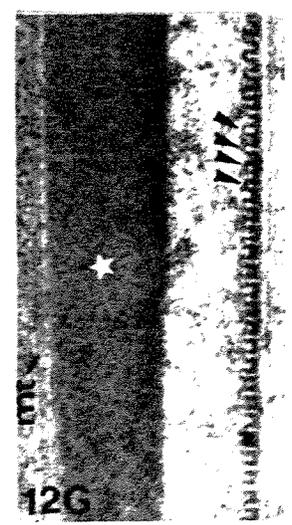
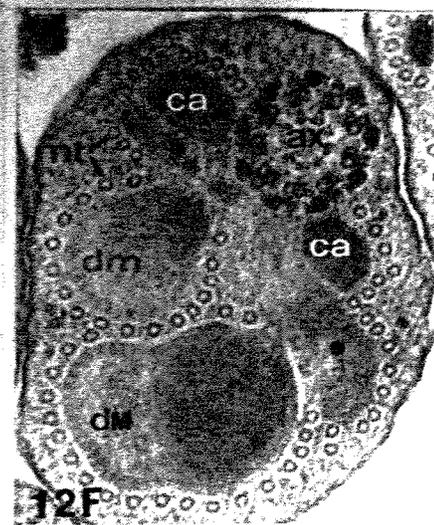
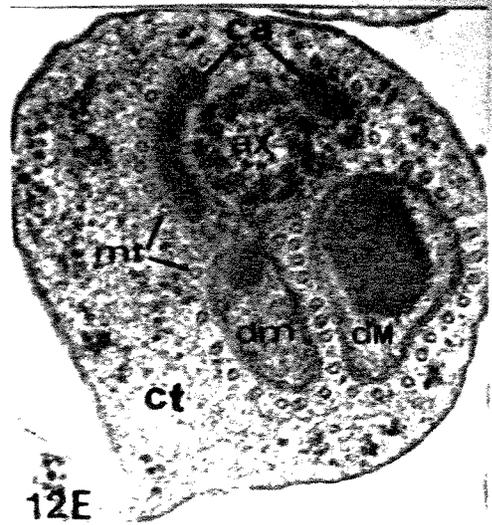
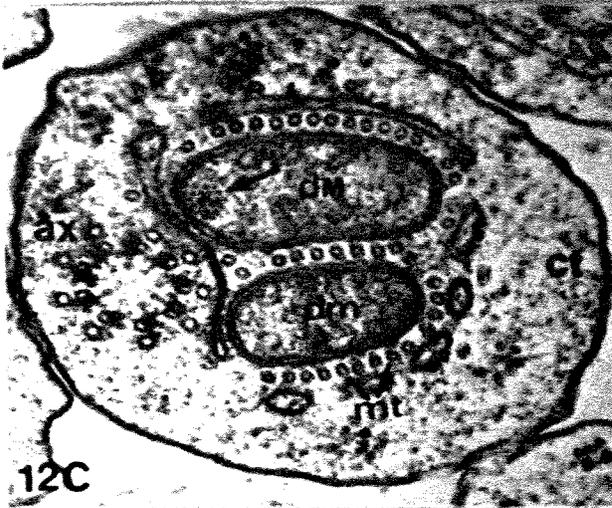
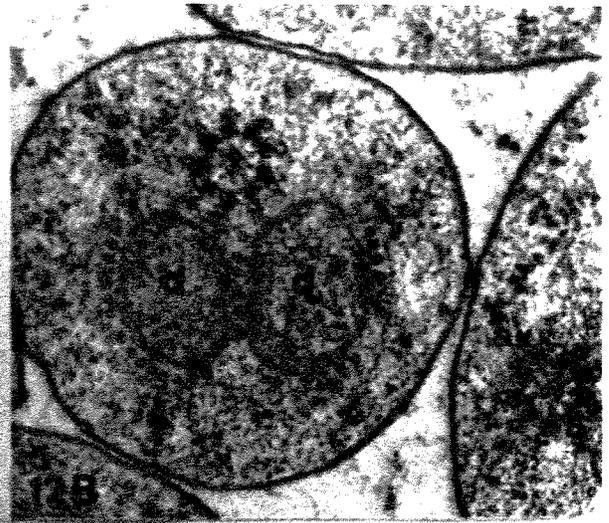
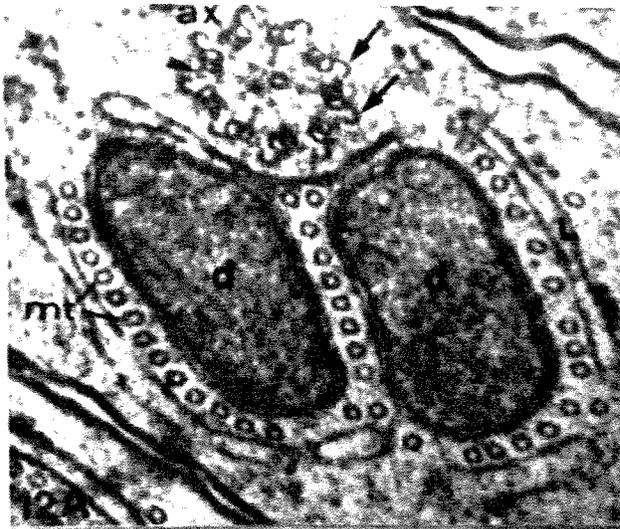
Fig. 12C. Sexto estágio. Observar a diferenciação dos derivados mitocondriais em maior (dM) e menor (dm) e o início da cristalização de material no primeiro (seta). Citoplasma (ct); axonema (ax). 63.250X.

Fig. 12D. Sétimo estágio. Notar o início da formação dos dois corpos acessórios (ca) e da cristalização (cabeça de seta) do derivado mitocondrial menor (dm). A seta mostra o material paracristalino do derivado mitocondrial maior (dM) já bastante desenvolvido. Axonema (ax); corpos acessórios (ca); microtúbulos (mt); citoplasma (ct). 48.070X.

Fig. 12E. Oitavo estágio. O diâmetro do flagelo já foi bastante reduzido. Axonema (ax); derivados mitocondriais maior (dM) e menor (dm); corpos acessórios (ca); microtúbulos (mt); citoplasma (ct). 59.570X.

Fig. 12F. Nono estágio. Surgem as expansões (asteriscos) dos corpos acessórios (ca) concomitante à redução do citoplasma. Axonema (ax); derivados mitocondriais (dm e dM); microtúbulos (mt). 66.560X.

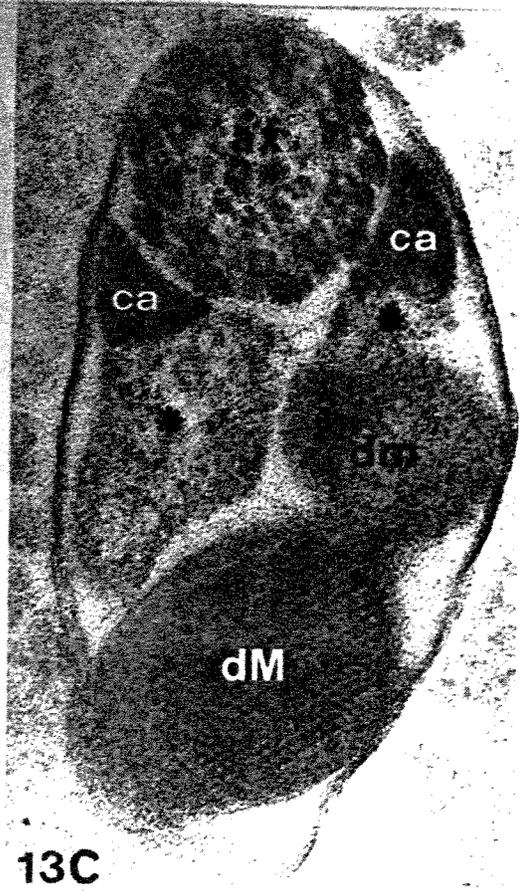
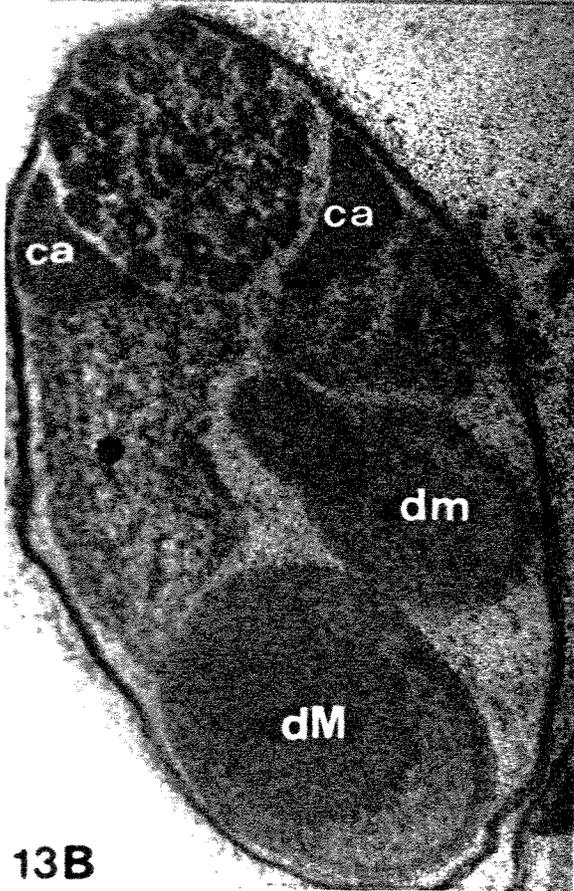
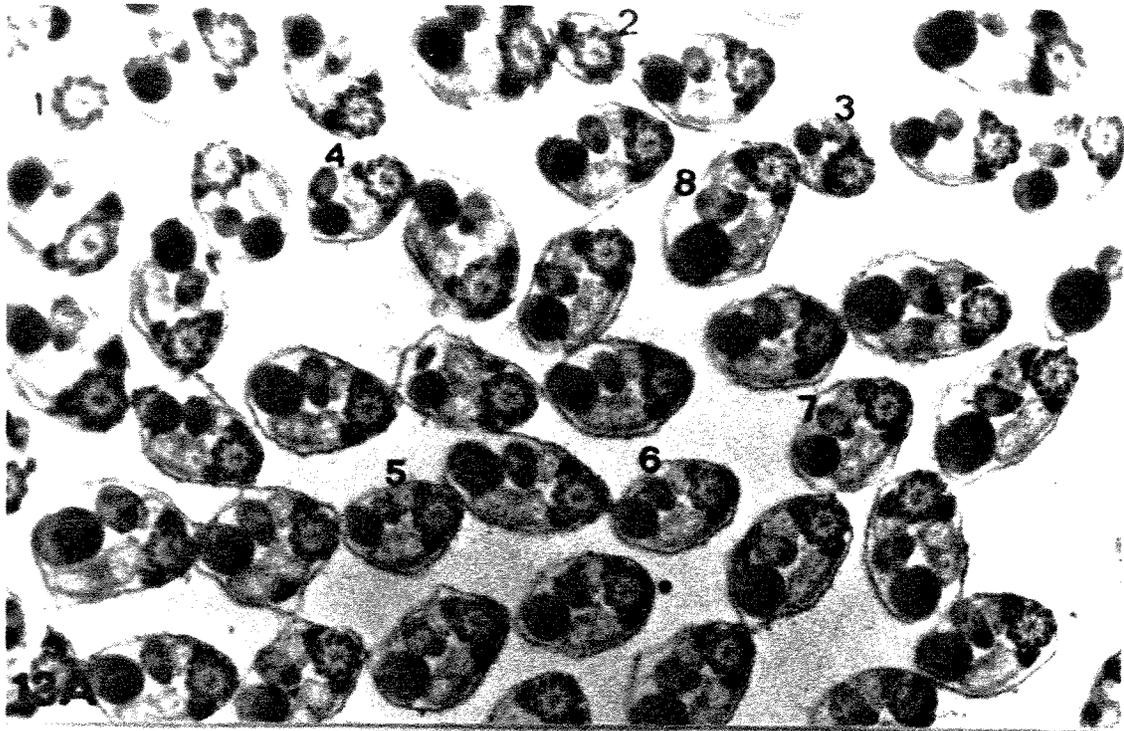
Fig. 12G. Corte longitudinal do derivado mitocondrial maior. No lado oposto à região cristalizada (estrela) são observadas cristas mitocondriais (cabeças de setas). Microtúbulos (mt). 60.090X.



Prancha 13

Fig. 13A. Região de um cisto mostrando vários flagelos de espermatozóides em corte transversal. Alguns flagelos seccionados em diferentes alturas foram enumerados em sentido póstero-anterior, de 1 a 8. Observar que o axonema tem diâmetro constante e é o último elemento presente na extremidade distal do flagelo (nº 1), seguido pelo derivado mitocondrial maior (nº 2). 32.590X.

Figs. 13B e C. Cortes transversais de flagelos de espermatozóides, mostrando os 5 elementos que os constituem, são eles: o axonema (ax), os derivados mitocondriais maior (dM) e menor (dm) e os dois corpos acessórios (ca) com as suas respectivas expansões (asterisco). B e C = 168.000X.



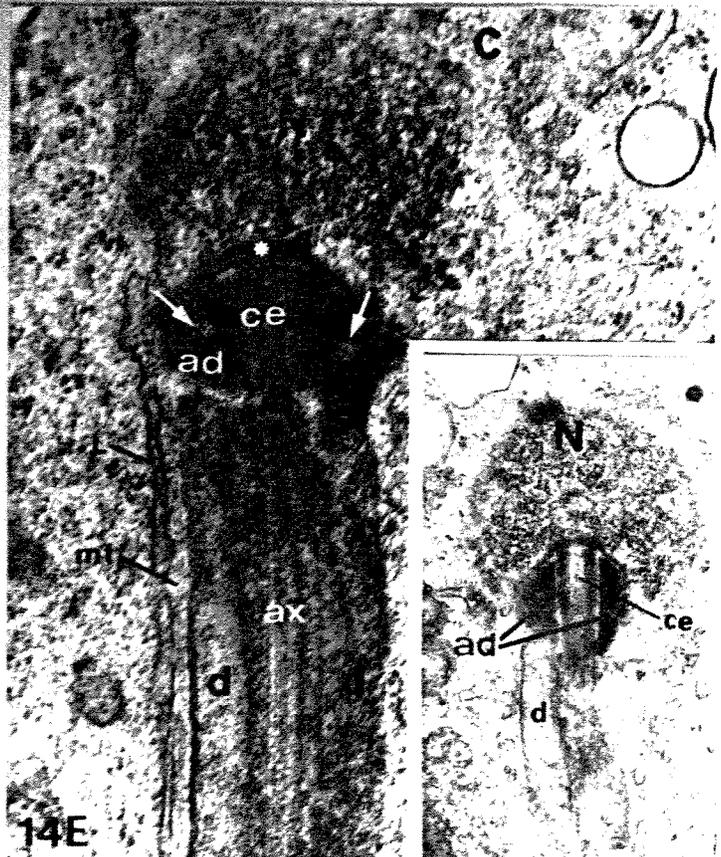
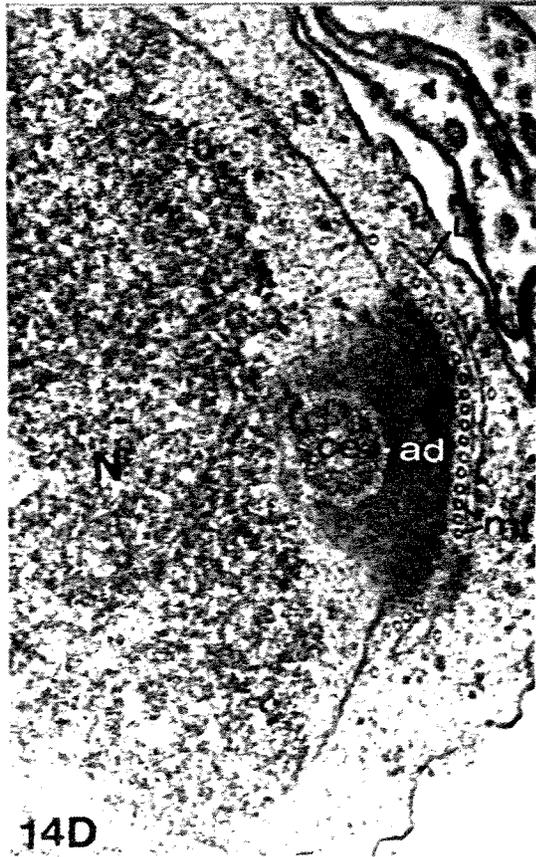
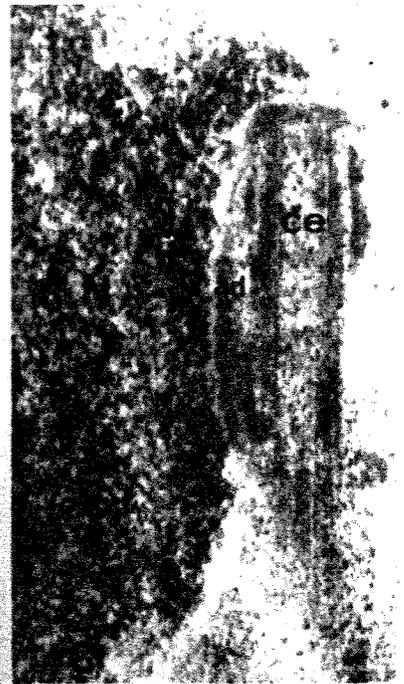
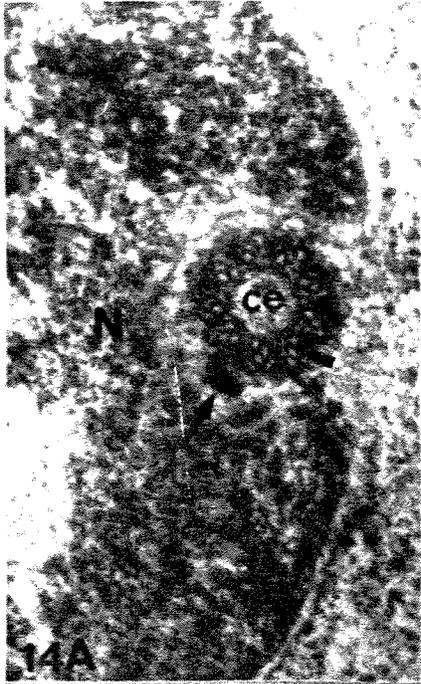
Prancha 14

Fig. 14A. Espermátide em estágio inicial da espermiogênese, mostrando o centríolo (ce) localizado em uma depressão do núcleo (N). A seta mostra material eletrondenso que, provavelmente, fará parte do adjunto do centríolo e a cabeça de seta indica uma das nove trincas de microtúbulos do centríolo. 87.350X.

Figs. 14B e C. Cortes longitudinais de espermátides em estádios posteriores ao da figura 14A. Observar que o axonema (ax) e o adjunto do centríolo (ad) já se encontram em formação. Núcleo (N); centríolo (ce). B=32.710X e C=48.720X.

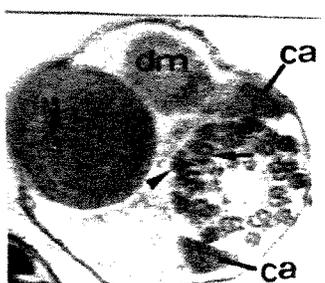
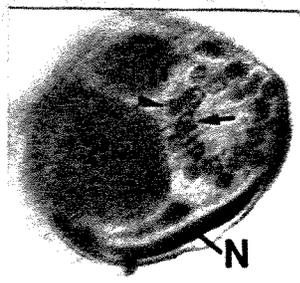
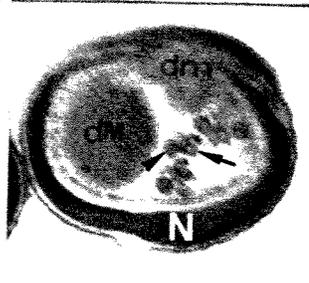
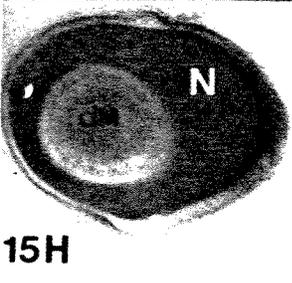
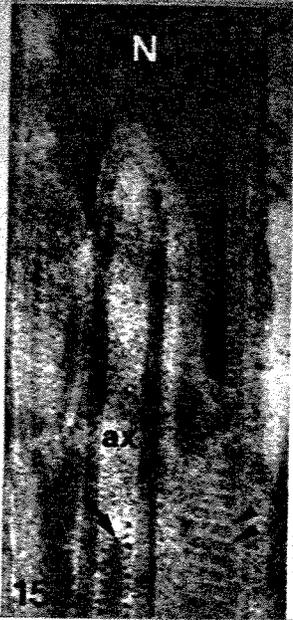
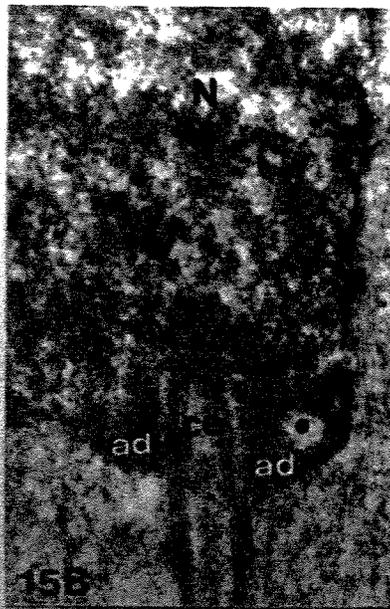
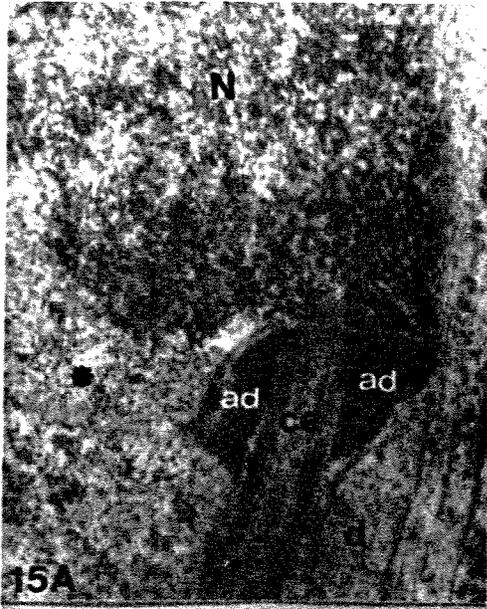
Fig. 14D. Corte transversal de uma espermátide no final do quarto estágio. Observar o adjunto do centríolo (ad) bastante desenvolvido e circundando o centríolo (ce) ainda de configuração típica. Microtúbulos (mt); lamela lisa (L); núcleo (N). 61.150X.

Fig. 14E. Corte tangencial de uma espermátide em estágio da espermiogênese igual ao da figura anterior. Observar a relação entre derivados mitocondriais (d), adjunto do centríolo (ad), centríolo (ce) e núcleo (N). As setas mostram áreas elétricas transparentes no interior do adjunto centriolar, enquanto o asterisco indica o espessamento do envoltório nuclear na região associada ao centríolo. Axonema (ax); Citoplasma (ct); lamela lisa (L); microtúbulos (mt). E=44.270X e detalhe=21.800X.



Prancha 15

- Fig. 15A.** Corte longitudinal de espermátide no quinto estágio da espermiogênese. Núcleo (N); centríolo (ce); adjunto do centríolo (ad); região nuclear elétron transparente (asterisco); derivado mitocondrial (d). 42.600X.
- Fig. 15B.** Espermátide no final do quinto estágio. Observar, nesta fase, a posição e a orientação do centríolo (ce) em relação ao núcleo (N). A seta mostra o espessamento do envoltório nuclear na região de contato com o centríolo. O asterisco indica a região elétron transparente no adjunto do centríolo. 42.600X.
- Fig. 15C.** Espermátide no sétimo estágio. Não se observa mais o adjunto do centríolo. As cabeças de setas mostram as cristas de um dos derivados mitocondriais (d); Núcleo (N); axonema (ax). 42.600X.
- Fig. 15D.** Espermátide no final do oitavo estágio. A cavidade na base do núcleo começa a ser formada. A lamela lisa (L) é contínua entre a cabeça e o flagelo. Microtúbulo (mt); Núcleo (N); Axonema (ax) e derivado mitocondrial (d). 33.750X.
- Figs. 15E e F.** Cortes longitudinais de espermátides no nono estágio. Observar a posição do axonema (figura E) e do derivado mitocondrial maior (dM, figura F) em relação ao núcleo (N). A seta indica o início do par central de microtúbulos do axonema (ax). Derivado mitocondrial menor (dm); microtúbulos (mt); cristas mitocondriais (cabeças de setas). 42.600X.
- Fig. 15G.** Corte longitudinal de espermatozóide, ao nível da junção cabeça-flagelo. Observar que os microtúbulos do axonema (ax) terminam anteriormente em diferentes níveis e que apenas o derivado mitocondrial maior (dM) ocupa a cavidade na base do núcleo (N). 45.810X.
- Fig. 15H.** Cortes transversais em diferentes níveis na região de transição núcleo-flagelo. As setas mostram as duplas de microtúbulos do axonema e as cabeças de setas indicam os microtúbulos acessórios. Núcleo (N); derivados mitocondriais maior (dM) e menor (dm); corpos acessórios (ca). 64.100X.



Prancha 16

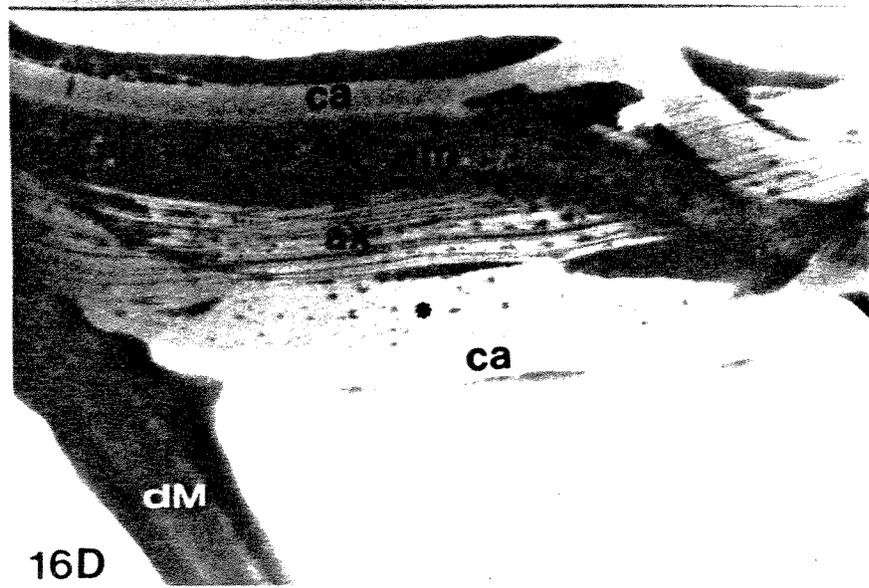
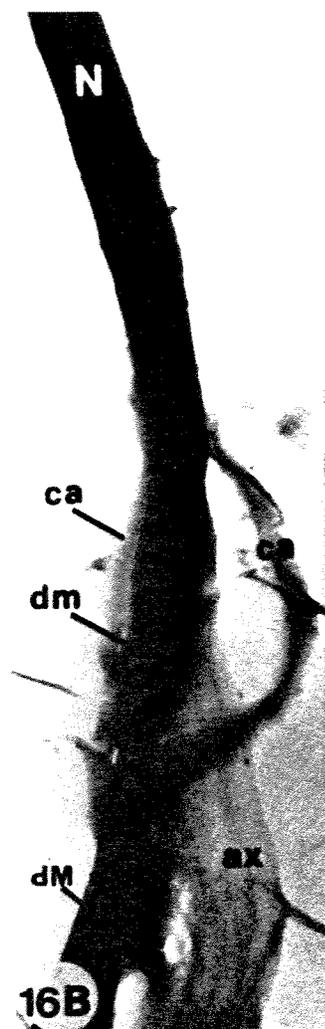
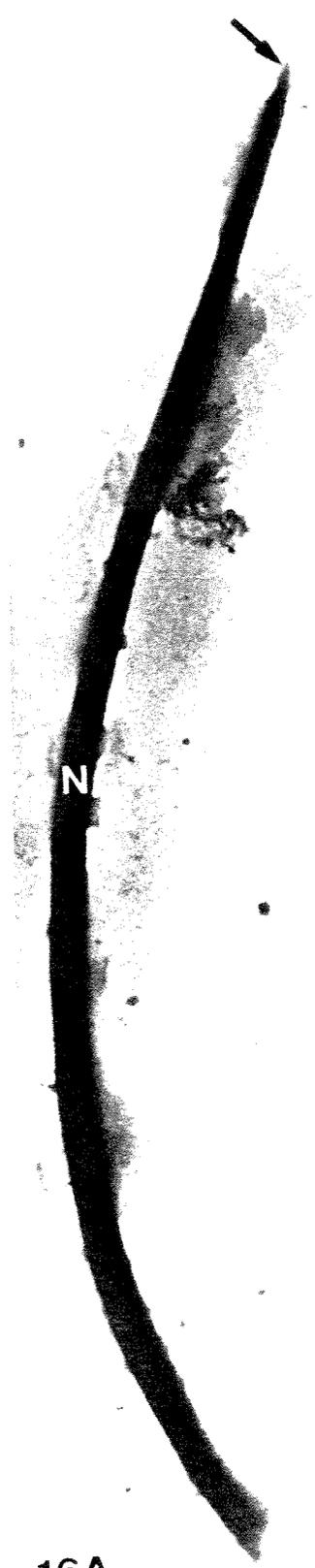
Figs. 16A-D. Coloração negativa de espermatozóides oriundos de espermateca.

Fig. 16A. Região da cabeça. Notar a forma do núcleo (N), destacado de seu flagelo, e a proporção, em tamanho, entre este e o acrossomo (seta). 9.700X.

Fig. 16B. Região de transição entre núcleo (N) e os cinco elementos do flagelo, sendo eles os dois derivados mitocondriais (dM e dm), o axonema (ax) e os dois corpos acessórios (ca). 22.090X.

Fig. 16C. Extremidades distais de 4 dos 5 elementos do flagelo. Observar que todos eles terminam, aproximadamente, juntos. A região cristalizada do derivado mitocondrial menor (dm) está indicada pela seta. Axonema (ax); corpos acessórios (ca). 19.250X. O detalhe mostra a extremidade do axonema envolvida por material fibrilar. 66.000X.

Fig. 16D. Região intermediária do flagelo mostrando os 5 elementos. Observar a tendência de um dos corpos acessórios (ca) manter-se junto ao derivado mitocondrial menor (dm). O asterisco indica a expansão do outro corpo acessório. Axonema (ax); derivado mitocondrial maior (dM). 31.840X.



Prancha 17

Figs. 17A-E. Coloração negativa dos derivados mitocondriais de espermatozóides maduros.

Figs. 17A e B. Região distal e proximal, respectivamente, do derivado mitocondrial maior. O diâmetro da região distal (em **A**), diferentemente da proximal (em **B**), diminui gradualmente e termina com uma extremidade bastante fina. 170.000X.

Figs. 17C e D. Regiões intermediárias do derivado mitocondrial maior. Em **C** a membrana mitocondrial está presente e as setas indicam as cristas. **D** é uma região do derivado sem a membrana mitocondrial. Notar o padrão da cristalização. C=255.000X, D=270.000X.

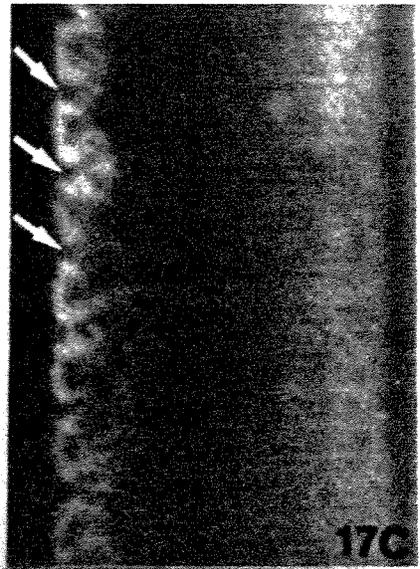
Fig. 17E. Derivado mitocondrial menor. Notar a orientação e o espaçamento regulares das cristas mitocondriais (setas). 155.000X.



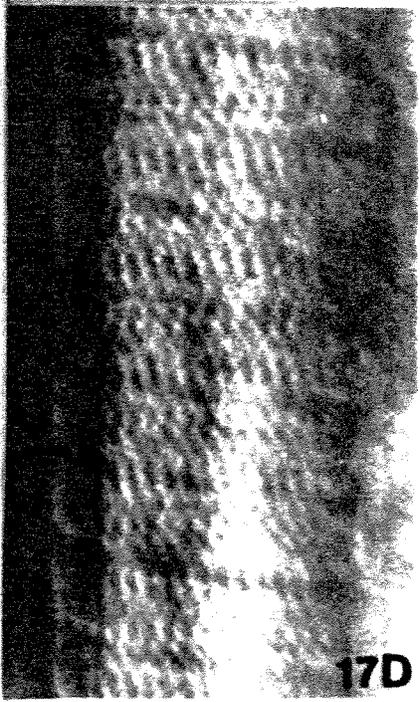
17A



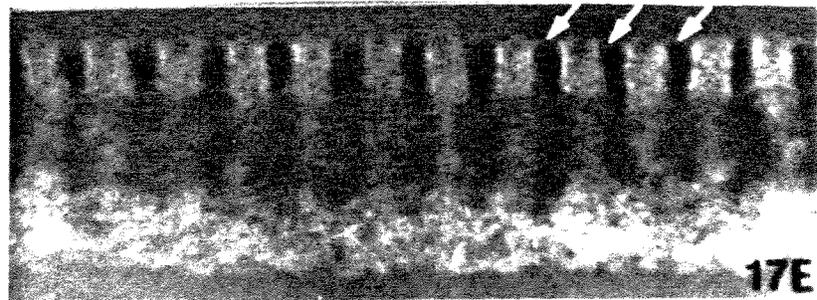
17B



17C



17D



17E

Prancha 18

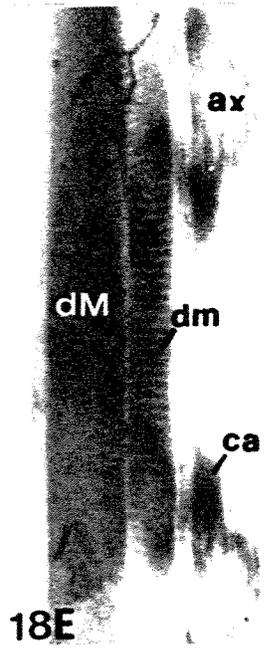
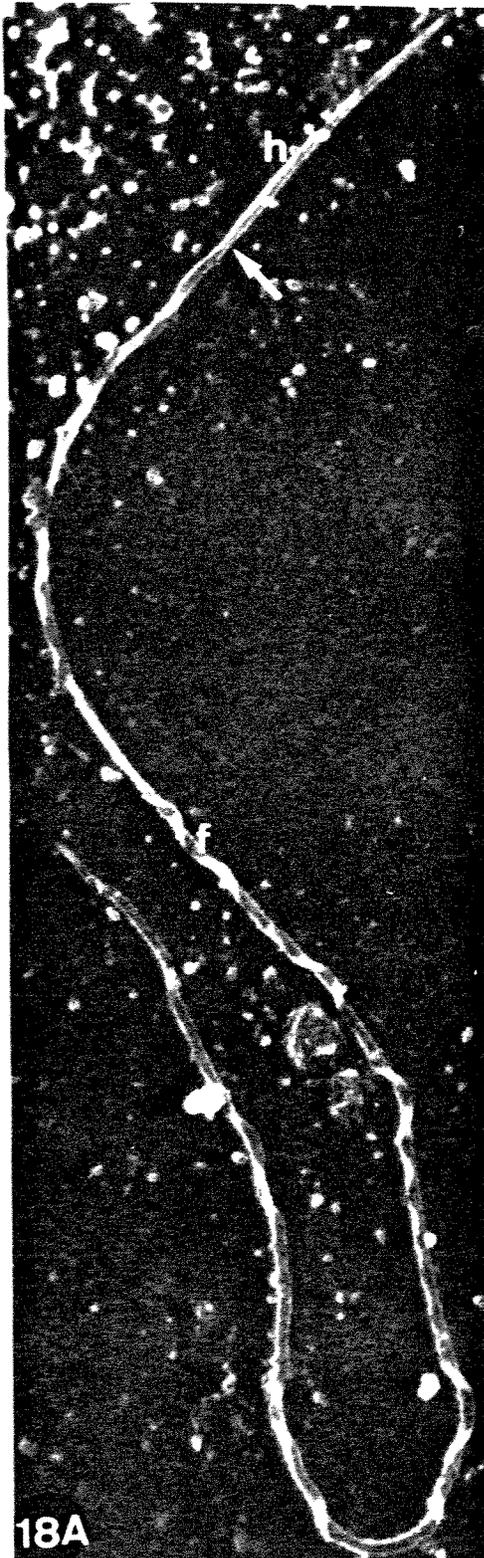
Fig. 18A. Micrografia eletrônica de varredura de um espermatozóide maduro. A seta indica o limite entre a cabeça (h) e o flagelo (f). 2.080X.

Fig. 18B. Região da cabeça do espermatozóide da figura anterior. A seta indica o limite entre a cabeça (h) e o flagelo (f). 7.130X

Fig. 18C. Extremidade posterior do flagelo do espermatozóide da figura 18A. 7.820X.

Fig. 18D. Detalhe da região mediana do flagelo de um espermatozóide maduro. Observar que o filamento ondulado (seta menor) é paralelo e não espiralado em torno do filamento não ondulado (seta maior). 13.760X.

Fig. 18E. Corte longitudinal de uma região mediana do flagelo de um espermatozóide maduro. Comparando esta figura com a anterior nota-se que o derivado mitocondrial maior (dM) forma o filamento não ondulado e que o filamento ondulado é formado pelo axonema (ax), pelo derivado mitocondrial menor (dm) e pelos dois corpos acessórios (ca). 36.110X.



8 DISCUSSÃO

8.1 As Alterações Nucleares

As alterações nucleares durante a espermiogênese em *Cosmopolites sordidus* de modo geral seguem aquelas conhecidas para outros coleópteros, como *Anthonomus grandis* (GASSNER *et alii*, 1975), *Dermestes frischii* (HODGES, 1982) e *Scolytus multistriatus* (JUMPER & CANNON, 1975), bem como para vários outros insetos (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972). Entretanto, em algumas fases, observam-se características próprias ou ainda não descritas para outras espécies.

Na espermátide jovem o núcleo tem a aparência de núcleo interfásico de células somáticas. Durante a espermiogênese, toda a cromatina passa por um processo de reorganização e assume a forma filamentosa. Por associações (KIERSZENBAUM & TRES, 1978), estes filamentos são convertidos em cordões espessos, os quais coalescem posteriormente resultando em uma massa cromatínica altamente compacta, contida em um núcleo longo e fino, característico para a maioria das espécies de insetos (BACCETTI, 1972; PHILLIPS, 1970). Em Orthoptera (SZÖLLOSI, 1975) e Hemiptera (FONZO & ESPONDA, 1975 e ITAYA *et alii*, 1980), a cromatina apresenta-se lamelar antes da compactação. BLOCH & BRACK (1964, apud PHILLIPS, 1970), KAYE (1969, apud FONZO & ESPONDA, 1975) e FAWCETT *et alii* (1971), denominaram esta característica de "padrão lamelar de compactação". Em *Drosophila melanogaster* não foi observada a formação de cordões ou lamelas durante o processo de compactação da cromatina (STANLEY *et alii*, 1972; TOKUYASU, 1974b). Em *C. sordidus*, toda a cromatina se torna fortemente condensada contra um lado do núcleo e desta massa formam-se os filamentos cromatínicos, observação esta não descrita para outras espécies. Outra característica observada em *C. sordidus* e ainda não observada em outras espécies de insetos, são os pequenos espaços elétrons transparentes em arranjo hexagonal na cromatina compactada e no interior dos cordões espessos, formados pela associação dos filamentos. Acreditamos que estes pequenos espaços elétrons transparentes sejam análogos aos espaços em forma

poligonal descritos para Orthoptera (SZÖLLOSI, 1975) e Hemiptera (FONZO & ESPONDA, 1975 e ITAYA, 1980). Em *D. melanogaster* (STANLEY et alii, 1972; TOKUYASU, 1974b) a cromatina não apresenta, durante a compactação, nem os pequenos espaços observados em *C. sordidus* nem os poligonais descritos para Orthoptera e Hemiptera. Com base nestas observações, propomos que as características dos espaços formados, ou a sua ausência, são dependentes do padrão de compactação da cromatina.

Em *C. sordidus*, como para a maioria dos insetos, a compactação cromatínica ocorre a partir da periferia nuclear e resulta em um espermatozóide com núcleo de aparência compacta e homogênea. Em alguns insetos, a região central do núcleo é a primeira a se condensar e, entre os *Psyllidae*, somente metade do núcleo é ocupado pela cromatina, até mesmo no espermatozóide maduro (LE MENN, 1966, apud BACCETTI, 1972). Em *Sitophilus oryzae*, membro da subfamília Rhynchophorinae, a qual pertence o *C. sordidus*, BURRINI et alii (1988) descreveram a existência de uma porção lateral não condensada no núcleo. Entretanto, observando as micrografias 25 e 26 publicadas por estes autores, a região nuclear não condensada parece corresponder na verdade à porção anterior do derivado mitocondrial maior, que se localiza lateralmente à extremidade posterior do núcleo.

Simultaneamente à condensação da cromatina em *C. sordidus*, assim como em outros insetos, ocorre a transformação do núcleo, que passa de esférico para alongado e fino. No início deste processo de alongamento, numerosos microtúbulos formam uma camada simples em torno do envelope nuclear. A função destes microtúbulos é muito discutida e acredita-se estarem relacionados com o fenômeno de alongamento nuclear, embora muitos autores diverjam neste ponto. KESSEL (1966 e 1967) e WILKINSON et alii (1974, apud BÁO, 1987) acreditam que estes microtúbulos sejam diretamente responsáveis por este processo de alongamento. Já FAWCETT et alii (1971) acreditam que a forma do núcleo seja determinada por um padrão específico de associação do DNA e proteínas durante a condensação da cromatina, sendo esta associação geneticamente determinada. Portanto os microtúbulos não teriam relação direta com este fenômeno. BRICK et alii (1979, apud BÁO, 1987) propuseram que a distribuição dos diferentes componentes celulares que parecem estar envolvidos no alongamento e formato do núcleo das células espermáticas seria dependente do envoltório nuclear. Ainda outros autores têm sugerido que os microtúbulos podem estar envolvidos no processo de condensação da cromatina. Estes baseiam-se principalmente na coexistência dos microtúbulos com o fenômeno de periferização da cromatina (ANDERSON et alii, 1967; LANZAVECCHIA & DONIN, 1972; TOKUYASU, 1974b). Foi demonstrado por STANLEY et alii (1972) e TOKUYASU (1974b), associações morfológicas entre os microtúbulos e a cromatina nuclear em espermátides de *D. melanogaster*, enquanto FONZO & ESPONDA (1975) sugeriram que os microtúbulos podem desempenhar um papel no arranjo dos cordões ou lamelas de cromatina.

Nós acreditamos que nenhum destes fatores acima mencionados poderia, individualmente, responder pelas transformações que levam à estrutura final do núcleo dos espermatozoides. Portanto, cremos que estas transformações sejam decorrentes da interação entre o padrão de agregação da cromatina, os microtúbulos e elementos do envoltório nuclear. Esta mesma linha é discutida por TOKUYASU (1974b) para *D. melanogaster*, por QUAGIO-GRASSIOTTO (1987) e BÁO (1987) para *Ceratitidis capitata* e por MESSIAS JR. (1990) para *Chrysomya megacephala*.

Em corte transversal da espermátide de *C. sordidus*, no estágio 7, o núcleo apresenta de um lado duas concavidades, onde a camada de microtúbulos e as lamelas lisas são descontínuas. Concavidades semelhantes podem ser notadas na figura 15 publicada por GASSNER *et alii* (1975) sobre espermiogênese do curculionídeo *A. grandis*. A formação de concavidades nucleares durante determinadas fases da espermiogênese, parece ser comum em insetos. Entretanto, dependendo da espécie podem existir variações quanto ao número, localização e, aparentemente, função. Em *C. megacephala* (MESSIAS JR., 1990) e *C. capitata* (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987 e BÁO, 1987) os núcleos das espermátides apresentam duas concavidades. Estas, porém, localizam-se uma de cada lado do núcleo. Já as espermátides de *D. melanogaster* (TOKUYASU, 1974b) apresenta uma única e grande concavidade. Para esta última espécie, segundo TOKUYASU (1974b), a formação destas concavidades estaria relacionada com a distribuição definitiva da cromatina. Entretanto, em *C. sordidus*, parece-nos que estas concavidades nucleares estão relacionadas, preferencialmente, com a eliminação de nucleoplasma e de envoltório nuclear, principalmente em estádios mais avançados da espermiogênese.

8.2 A Formação do Acrossomo

Vários estudos de revisão do processo de espermiogênese estabeleceram que o acrossomo em insetos, como em outros animais, é um produto do complexo de Golgi (BACCETTI, 1972; PHILLIPS, 1970; VIRKKI, 1969).

Em muitos aspectos o desenvolvimento do acrossomo em *C. sordidus* é semelhante ao da maioria dos insetos já investigados (KAYE, 1962; PHILLIPS, 1970; GASSNER *et alii*, 1975; HODGES, 1982; BÁO *et alii*, 1989). Inicialmente uma vesícula esférica, chamada de vesícula pró-acrossômica, aparece a partir da região trans do complexo de Golgi, que posiciona-se nas proximidades do núcleo. Esta vesícula pró-acrossômica torna-se associada ao envoltório nuclear e, em fase subsequente, modifica sua forma e, no final da espermiogênese, alcança seu perfil definitivo. Em *C. sordidus* o início da formação do acrossomo é observado a partir do segundo estágio da espermiogênese, quando se nota uma pequena vesícula esférica,

situada entre o complexo de Golgi e o núcleo. Em fase subsequente esta vesícula encontra-se justaposta ao envoltório nuclear e, durante a transformação nuclear, ela se move, alcançando a região apical do núcleo. Nesta fase a vesícula pró-acrossômica tem a forma de uma calota e encontra-se aposta à extremidade anterior do núcleo. Em fase correspondente a esta, para o curculionídeo *A. grandis* (GASSNER et alii, 1975), a vesícula ainda é esférica e se localiza em uma leve depressão na extremidade anterior do núcleo. Somente em fases mais adiantadas é que a mesma assume a forma de calota. A partir disto, acreditamos que o processo de formação do acrossomo seja igual para estas duas espécies. O acrossomo no espermatozóide de *C. sordidus* é semelhante ao da maioria dos Curculionoidea (GASSNER et alii, 1975; BURRINI et alii, 1988), localizando-se em uma pequena cavidade na extremidade anterior do núcleo. O acrossomo é constituído por um perforatorium, uma vesícula acrossomal revestindo o perforatorium e um material extra-acrossomal. Como exceção, no curculionídeo *Lixus*, o acrossomo localiza-se ao longo de toda cabeça do espermatozóide (NATH, 1956, apud JUMPE e CANNON, 1975).

O acrossomo do espermatozóide de *C. sordidus*, entretanto, difere em dois aspectos daqueles descritos por BURRINI et alii (1988) para a maioria das espécies de Curculionoidea: (1) a cavidade do núcleo, que é ocupada pelo perforatorium em *C. sordidus*, é bem menor ou praticamente inexistente para a maioria daquelas espécies e (2) a lamela subacrossomal localizada entre o acrossomo e o núcleo, descrita por estes autores, não foi observada nos espermatozóides do *C. sordidus*.

Embora PHILLIPS (1972) tenha descrito que as enzimas hidrolíticas do acrossomo possuem arranjos paracristalinos em várias espécies de mamíferos e que arranjos paracristalinos também têm sido descritos para acrossomos de várias espécies de insetos (WARNER, 1971; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987; BÁO et alii, 1989), não observamos arranjos paracristalinos em qualquer das estruturas que formam o acrossomo do espermatozóide do *C. sordidus*.

8.7 Os Derivados Mitocondriais

Para *C. sordidus* a formação do complexo mitocondrial e sua posterior diferenciação em dois longos derivados mitocondriais, assemelham-se ao processo observado para a maioria dos insetos, como já foi descrito pormenorizadamente em *Murgantia histrionica* (PRATT, 1970) e resumido nas revisões feitas por BACCETTI (1972) e PHILLIPS (1970). Nas espermátides jovens, as mitocôndrias agrupam-se em uma determinada região do citoplasma e posteriormente se fundem, formando o complexo mitocondrial. Em *M. histrionica*, PRATT (1970) descreveu que o complexo mitocondrial recém-formado é constituído por uma única peça. Mas, logo constitui duas redes completamente entrelaçadas. Para *C. sordidus*, acreditamos que

as mitocôndrias ao se fundirem já resultam em um complexo mitocondrial formado por duas estruturas mitocondriais distintas, e não uma, e regularmente enroladas uma na outra (para melhor compreensão observar a figura 10C). Outra característica do complexo mitocondrial de *C. sordidus* é a existência de microtúbulos no espaço entre as duas estruturas do complexo mitocondrial recém-formado. Em *D. melanogaster*, STANLEY et alii (1972) observaram que o espaço entre "a rede complexa de corpos mitocondriais" é bastante regular e, como em *C. sordidus*, mede 40nm. Entretanto, organelas citoplasmáticas nunca foram identificadas neste espaço.

Pouco tem sido descrito sobre o processo de diferenciação do complexo mitocondrial em derivados mitocondriais. A única hipótese existente foi formulada por PRATT (1970), quando estudou este fenômeno em *M. histrionica*. A sua hipótese é de que a diferenciação se dê através de quebras, retrações e fusões entre os vários segmentos mitocondriais a partir dos mais externos. Como consequência o número de segmentos ou dobras diminuem até tornarem-se dois derivados mitocondriais.

Para *C. sordidus*, acreditamos que este processo seja diferente daquele proposto por PRATT (1970). Neste inseto o início da diferenciação do complexo mitocondrial coincide com o alongamento do citoplasma e este alongamento citoplasmático é acompanhado pelo alongamento do complexo mitocondrial. Portanto, acreditamos que o alongamento citoplasmático exerça uma força mecânica sobre o complexo mitocondrial de modo que este se alonga e para isto o número de voltas vai diminuindo, de fora para dentro, até as duas estruturas mitocondriais desenrolarem-se completamente e passarem a ser chamadas de derivados mitocondriais. Todo este processo é orientado pelos microtúbulos existentes no espaço entre as duas estruturas mitocondriais do complexo. É como se as duas estruturas mitocondriais fossem sendo desenroladas e ao mesmo tempo esticadas no sentido do alongamento citoplasmático.

Em *C. sordidus*, quando o complexo mitocondrial, seccionado transversalmente, é observado em diferentes fases da diferenciação, nota-se que o seu diâmetro vai diminuindo conforme a diferenciação ocorre e que todas as camadas têm a mesma espessura. Os derivados mitocondriais recém-formados são longos, com diâmetros reduzidos e não existem massas citoplasmáticas no seu interior. Quando se observa as micrografias publicadas por PRATT (1970), nota-se que em todas as fases da diferenciação o complexo mitocondrial apresenta, aproximadamente, o mesmo diâmetro. Também, observando-se as micrografias 6 e 18 publicadas por SZÖLLOSI (1975) em seu estudo com *Locusta migratoria*, nota-se que conforme a diferenciação do complexo mitocondrial ocorre, a camada mais externa vai tornando-se bem maior em diâmetro do que as demais camadas. Os derivados mitocondriais recém-formados em *Euschistus* (PHILLIPS, 1970), *L. migratoria* (SZÖLLOSI, 1975), *D. melanogaster* (STANLEY et alii, 1972), *C. capitata* (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987 e BÁO, 1987), *C. megacephala* (MESSIAS Jr., 1990) e *Triatoma infestans* (DOLDER, comunicação pessoal) têm formas ovaladas e massas citoplasmáticas no seu interior.

Com base nestas observações, é razoável propor que o processo de diferenciação do complexo mitocondrial não seja o mesmo para todas as espécies.

Em *C. sordidus*, assim como em *A. grandis* (GASSNER et alii, 1975), em algumas fases da espermiogênese, observam-se lamelas lisas envolvendo os derivados mitocondriais e os microtúbulos a eles associados. Para outras ordens de insetos, por exemplo, Diptera (TOKUYASU, 1975; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987; MESSIAS JR., 1990) e Hemiptera (DOLDER, comunicação pessoal), estas lamelas lisas envolvem o axonema. Segundo TOKUYASU (1975) estas lamelas teriam a finalidade de manter a integridade deste axonema durante a sua formação. Da mesma maneira, em *C. sordidus* e *A. grandis* (GASSNER et alii, 1975), a finalidade destas lamelas lisas talvez seja a de manter a integridade do conjunto formado pelos derivados mitocondriais e microtúbulos, porém esta função não pode ser generalizada.

No espermatozóide de *C. sordidus*, assim como em *Cicindela campestris* (WERNER, 1965), *A. grandis* (GASSNER et alii, 1975), *S. multistriatus* (JUMPER & CANNON, 1975) e *D. frischii* (HODGES, 1982), os derivados mitocondriais são em número de dois com dimensões diferentes. Como é comum para os insetos, estes derivados passam por dois fenômenos marcantes durante a sua reorganização e diferenciação. As cristas mitocondriais se orientam formando uma série de lamelas regularmente espaçadas e dispostas perpendicularmente ao eixo maior do derivado e, dentro da matriz mitocondrial, surge um material em bastonetes com arranjo paracristalino semelhante ao já descrito para outras espécies de insetos (ROSATI et alii, 1976; BAIRATI & PEROTTI, 1970; BACCETTI et alii, 1977b). Como observado em *S. multistriatus* (JUMPER & CANNON, 1975) e em várias famílias de Curculionoidea (BURRINI et alii, 1988), o derivado mitocondrial maior no *C. sordidus* é quase totalmente preenchido pelo material paracristalino e as cristas mitocondriais são muito curtas, limitando-se à sua periferia em um dos lados. O derivado mitocondrial menor é praticamente desprovido de material paracristalino e as cristas se estendem de um lado a outro da organela.

Nos espermatozóides do *C. sordidus*, como para os demais Curculionoidea, entre os elementos do flagelo, é o derivado mitocondrial maior que se inicia mais anteriormente. Este encontra-se perfeitamente encaixado em uma cavidade na base do núcleo. Exceção feita, aparentemente, para o *S. oryzae* (BURRINI et alii, 1988), membro da mesma subfamília do *C. sordidus*. Nesta espécie, parece-nos que a extremidade anterior do derivado mitocondrial maior posiciona-se lateralmente à extremidade posterior do núcleo, diferente, portanto, dos demais Curculionoidea.

Em montagem total de espermatozóides submetidos à coloração negativa, nas regiões do derivado mitocondrial maior, em que a membrana mitocondrial ainda está presente, observa-se tanto as cristas mitocondriais, na periferia em um dos lados, como uma periodicidade de aproximadamente 25nm, no

restante do derivado. Entretanto, quando a região é desprovida de membrana, as cristas não são mais observadas e o material paracristalino exibe periodicidade de 45nm. ROSATI et alii (1976) observaram em quatro outras espécies de coleópteros, periodicidade igual a 25nm, sendo que nestes casos os derivados poderiam estar ainda associados com sua membrana. BACCETTI et alii (1977), estudando este material paracristalino em *Notonecta glauca*, descreveram que o mesmo, provavelmente desprovido de sua membrana, apresentava uma periodicidade principal de 45nm subdividida em duas subperiodicidades de 20nm cada. BACCETTI et alii (1977) descreveram ainda que o material paracristalino é formado por dois polipeptídeos principais de 52.000 e 55.000 daltons.

Diversas funções têm sido atribuídas para este material protéico de arranjo paracristalino depositado nos derivados mitocondriais dos insetos. Segundo BAIRATI & PEROTTI (1970) este material resultaria da reorganização das proteínas das cristas mitocondriais. Já YASUZUMI (1974) acredita que os derivados mitocondriais estão relacionados com o suprimento de energia para a motilidade do flagelo. PEROTTI (1977) descreveu este material como constituindo uma reserva a ser utilizada pelo embrião. Para TOKUYASU (1974a) e ROSATI et alii (1976) a forma e a natureza dos derivados mitocondriais do flagelo dos insetos estão relacionados com o padrão de movimento dos espermatozóides.

Nossa opinião é que, em *C. sordidus*, os derivados mitocondriais podem estar relacionados tanto com o suprimento de energia como com o padrão de batimento do flagelo dos espermatozóides. No primeiro caso estaria envolvido principalmente o derivado mitocondrial menor, por ser praticamente todo preenchido por cristas mitocondriais, estruturas estas diretamente envolvidas no processo de fosforilação oxidativa em mitocôndrias típicas. Com o padrão de movimento estaria envolvido o derivado mitocondrial maior. Esta opinião é baseada em sua grande quantidade de material paracristalino, o que conferiria rigidez ao batimento, e na sua relação com o núcleo, que proporcionaria apoio ao flagelo. Este derivado mitocondrial também poderia funcionar como um propagador dos movimentos gerados pelo axonema, para todo o espermatozóide, especialmente à cabeça. Outra função que poderia ser desempenhada por este derivado, seria a de estabilizar a união núcleo-flagelo, função esta geralmente atribuída ao adjunto do centríolo em espécies onde esta estrutura é mantida. Ainda, a hipótese de PEROTTI (1977) também parece ser viável, uma vez que, sendo a natureza do material paracristalino protéica, o mesmo poderia servir como fonte de nutrientes para o embrião.

8.4 O Centríolo

Em *C. sordidus* as espermátides retém, aparentemente, um único centríolo, o qual dará origem ao axonema. Na célula germinativa do coleóptero *Cicindela flavopunctata rectilatera*, BRELAND et alii (1968) demonstraram a existência de dois centríolos. HODGES (1982) descreveu que espermátides jovens de insetos possuem tipicamente dois centríolos e que é o centríolo distal e em ângulo reto em relação ao envoltório nuclear que forma o corpúsculo basal do axonema. Como este autor observou somente um centríolo na espermátide do coleóptero *D. frischii*, ele acredita que seja porque o centríolo proximal desaparece tão logo as espermátides sejam formadas. Entretanto, no Lepidoptera *Ephestia kuehniella*, WOLF & KYBURG (1989) demonstraram a existência de um único centríolo nas espermátides.

Nas espermátides ainda bastante jovens de *C. sordidus*, bem como em *D. frischii* (HODGES, 1982), o centríolo posiciona-se em uma depressão lateral do núcleo com seu eixo maior paralelo ao envoltório nuclear e, durante o quinto estágio, quando o núcleo passa de esférico à fusiforme, este centríolo migra para a região posterior do núcleo e torna-se perpendicular ao envoltório nuclear desta região. No curculionídeo *A. grandis* (GASSNER et alii, 1975), assim como em Hemiptera (DOLDER, comunicação pessoal), Diptera (MESSIAS JR., 1990) e Orthoptera (SZÖLLOSI, 1975) o centríolo já no início se posiciona na região posterior do núcleo e perpendicular ao envoltório nuclear.

Em *C. sordidus*, até o quarto estágio da espermiogênese, o centríolo apresenta a configuração clássica de nove trincas de microtúbulos arranjadas helicoidalmente, como já observado para vários outros insetos (ANDRÉ & BERNHARD (1964) e FAWCETT (1966), apud BACCETTI (1972); ROSS, 1968; HODGES, 1982). Entretanto, esta configuração encontra-se totalmente alterada no espermatozóide, sendo difícil reconhecer esta região do axonema como centríolo. Estas mesmas características já foram descritas por PHILLIPS (1970) para Homoptera, Hemiptera e outros Coleoptera.

8.5 A Formação do Adjunto do Centríolo

Em *C. sordidus*, como já descrito para várias outras espécies de insetos (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972), o centríolo torna-se envolto por um material eletrondenso e finamente granular denominado adjunto do centríolo. Nesta espécie, o adjunto do centríolo aparece no quarto estágio, durante a transformação do núcleo de esférico para fusiforme. No quinto estágio, esta estrutura cresce consideravelmente e, no sétimo

estádio, fase em que o núcleo encontra-se em alongamento, este adjunto centriolar já desapareceu completamente. Comportamento semelhante foi descrito para *A. grandis* (GASSNER *et alii*, 1975), algumas espécies de Lepidoptera e alguns Trichoptera (PHILLIPS, 1970). Enquanto que para *C. capitata* (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987; BÁO, 1987), *C. megacephala* (MESSIAS JR., 1990) e várias espécies de mosquitos (BRELAND *et alii*, 1966) o adjunto do centríolo permanece no espermatozóide maduro como uma estrutura pequena, compacta e bastante eletrondensa.

O adjunto do centríolo, para WERNER (1965) tem origem nuclear e CANTACUZÉNE (1970) descreveu sua síntese como sendo induzida pelo centríolo da espermátide. Vários autores, usando técnicas histoquímicas (BACCETTI *et alii* (1969), YASUZUMI *et alii* (1970) e GASSNER (1970), apud BACCETTI, 1972), autoradiografia (BACCETTI *et alii* (1970), apud BACCETTI, 1972) e citoquímica combinada com digestão enzimática (TAFFAREL & ESPONDA, 1980), demonstraram que o adjunto do centríolo é composto principalmente por ribonucleoproteínas.

A função do adjunto do centríolo ainda não é bastante clara. GATENBY e TAHMISIAN (1959) e GATEMBY (1961) apud BACCETTI (1972), propuseram que o adjunto do centríolo tem a função de manter o flagelo junto ao núcleo. Esta proposta também é compartilhada por BRELAND *et alii* (1966) e FAWCETT & PHILLIPS (1969). Já BACCETTI (1972) acredita que se o segmento inicial do axonema dos espermatozóides dos insetos encontra-se alojado dentro do adjunto do centríolo e, sendo este segmento aparentemente o responsável pelo início do movimento do axonema (BACCETTI *et alii*, 1977b), uma função mecânica para o adjunto do centríolo seja a mais provável. Nós acreditamos que para as espécies tais como o *C. sordidus*, onde este adjunto centriolar deixa de existir já nas fases intermediárias da espermiogênese, as funções propostas acima não sejam as mais plausíveis. Para *C. sordidus*, é possível supor que o adjunto do centríolo tenha como função principal, manter o centríolo associado ao envoltório nuclear e garantir que este alcance a região basal do núcleo, durante a alteração do formato nuclear, visto que nesta espécie o adjunto centriolar só está presente nas fases da espermiogênese onde ocorrem estas alterações. Acreditamos que a função proposta para o adjunto do centríolo, de manter o flagelo junto ao núcleo nos espermatozóides, seja desempenhada nesta espécie pelo derivado mitocondrial maior, através de sua extremidade anterior que se encontra inserida na cavidade da base do núcleo.

8.6 A Formação do Axonema

No axonema dos espermatozóides de *C. sordidus* os microtúbulos estão organizados no padrão clássico de dois microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios,

como descrito para os espermatozoides da grande maioria dos insetos (BACCETTI, 1972; SHAY *et alii*, 1969; BURRINI *et alii*, 1988; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987; BÁO, 1987; MESSIAS JR., 1990). A sequência de eventos na formação do axonema neste inseto, também não difere daquela descrita para a maioria de diferentes espécies de insetos (BACCETTI, 1972; KIEFER, 1970; PEROTTI, 1969; PHILLIPS, 1970; SHAY *et alii*, 1969; STANLEY *et alii*, 1972; SZÖLLOSI, 1975; TOKUYASU *et alii*, 1972; WARNER, 1970 e 1971; HODGES, 1982; GASSNER *et alii*, 1975). A princípio, o axonema possui o arranjo básico de nove duplas de microtúbulos e dois microtúbulos centrais. Em estádios subsequentes ocorre a formação dos nove microtúbulos acessórios e, entre estes, das fibras eletrondensas. Os nove microtúbulos acessórios e um dos microtúbulos centrais, tornam-se preenchidos por material eletrondenso. Características semelhantes foram descritas para vários outros insetos (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1987; BÁO, 1987; MESSIAS Jr., 1990). Entretanto, nestes insetos ocorre material eletrondenso nos nove microtúbulos acessórios e nos dois microtúbulos centrais e não somente em um como em *C. sordidus*. Para BACCETTI (1972) este material eletrondenso é constituído por proteínas e polissacarídeos tipo glicogênio. Recentemente CRAVEIRO & BÁO (1997) demonstraram a presença de carboidratos nos nove microtúbulos acessórios e em apenas um dos microtúbulos centrais em *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae).

Os microtúbulos na extremidade proximal do axonema, em *C. sordidus*, já se encontram organizados em duplas, mais um microtúbulo acessório para cada dupla. Entretanto, não existem os dois microtúbulos centrais. Ainda, nesta região proximal os microtúbulos iniciam-se em níveis diferentes, de forma que somente alguns alcançam o início da cavidade na base do núcleo. Característica semelhante foi descrita para o curculionídeo *Tenebrio molitor* por BACCETTI (1977a, apud JAMIESON, 1987).

8.7 A Formação dos Corpos Acessórios.

Os corpos acessórios dos espermatozoides de *C. sordidus* são duas estruturas eletrondensas e aproximadamente triangulares, em secção transversal, que flanqueam o axonema de forma a envolver aproximadamente a metade deste, aquela voltada para o centro do flagelo. Estas mesmas características são observadas para todas as espécies de Curculionoidea estudadas por BURRINI *et alii* (1988). Entretanto, para outros coleópteros, variam bastante, podendo até mesmo não existirem, como ocorre em *D. frischii* (HODGES, 1982). Em *Divales bipustulatus* (MAZZINI, 1976), estes corpos acessórios, em secção transversal, são aproximadamente arredondados, de diâmetro bem maior do que o axonema e apresentam

regiões cortical e medular bem distintas. Esta última apresenta-se com pequenos espaços elétron transparentes em forma de favo-de-mel.

Cada corpo acessório, na face voltada para os derivados mitocondriais, possui uma expansão formada de material menos compacto e de menor eletrondensidade. A expansão em um dos corpos acessórios, para todos os Curculionoidea, é bem mais desenvolvida e, às vezes, apresenta a forma de U, como por exemplo em *S. multistriatus* (JUMPE & CANNON Jr., 1975) e *Curculio elephas* (BURRINI et alii, 1988). Estas expansões também podem não existir, como para o coleóptero *D. bipustulatus* (MAZZINI, 1976).

Durante a espermiogênese, em *C. sordidus*, o início da formação dos dois corpos acessórios ocorre no sétimo estágio e as suas expansões aparecem no oitavo estágio. No curculionídeo *A. grandis*, GASSNER et alii (1975) descreveram que primeiramente ocorre a formação de um corpo acessório, o qual dará origem ao segundo corpo acessório.

A origem, composição química e função destes corpos acessórios ainda são desconhecidas. Para *T. molitor*, BACCETTI et alii (1977a, apud JAMIESON, 1987) descreveram que originam-se diretamente do complexo de Golgi, que a região medular é digerível pelas enzimas amilase ou pepsina e que a região cortical é sítio de atividade ATPase e UTPase. Em *C. sordidus*, é possível que os corpos acessórios e/ou suas expansões contenham na sua composição química proteína(s) e que estas sejam sintetizadas a partir de polissomos livres, já que durante a formação dos mesmos, estas organelas são abundantes no citoplasma do flagelo. Quanto à função, acreditamos que estas duas estruturas, juntamente com o derivado mitocondrial maior, estejam envolvidos no padrão de batimento do flagelo. Durante a espermiogênese, até a fase em que começam a ser formadas as expansões, observando flagelos em cortes transversais nota-se que todos os elementos do flagelo possuem a mesma orientação em relação aos dois microtúbulos centrais do axonema. Entretanto, conforme os corpos acessórios vão sendo formados, especialmente suas expansões, os derivados mitocondriais vão se tornando mais afastados do axonema, principalmente o maior, e a orientação entre os elementos do flagelo com relação ao axonema não é mais mantida. Portanto, acreditamos que estes corpos acessórios e em especial as suas expansões, por possuírem certa elasticidade, sejam os responsáveis pelo trajeto ondulado do axonema e, por conseguinte, influenciem no padrão de movimento dos espermatozóides.

8.8 A Morfologia do Espermatozóide e a Organização do Flagelo

A morfologia dos espermatozóides do *C. sordidus* é semelhante àquela dos espermatozóides das demais espécies da superfamília Curculionoidea estudadas por BURRINI et alii (1988). São espermatozóides muito

longos e finos, medindo de 110 a 700µm e com espessura aproximadamente constante (BURRINI et alii, 1988). Os espermatozóides do *S. oryzae*, espécie da mesma subfamília do *C. sordidus*, estudados por BURRINI et alii (1988), medem 100µm de comprimento, sendo, portanto, 60µm mais curtos que os espermatozóides de *C. sordidus*. O flagelo dos espermatozóides do *C. sordidus* tem arranjo estrutural semelhante ao flagelo dos espermatozóides da maioria dos Curculionoidea (PHILLIPS, 1970; GASSNER et alii, 1975; BURRINI et alii, 1988). Todos são formados por 2 derivados mitocondriais e 2 corpos acessórios que flanqueiam um axonema de padrão "9 + 9 + 2", descrito para a maioria destes insetos, exceto para *Deporaus betulae* (L.). O axonema deste besouro não possui os 2 microtúbulos centrais, sendo de padrão "9 + 9 + 0" (BURRINI et alii, 1988). Ainda, quanto à implantação dos elementos do flagelo, o espermatozóide do *C. sordidus* é semelhante aos da maioria dos Curculionoidea. Ou seja, estes elementos estão implantados na região basal do núcleo, diferente apenas em *C. campestris*, em que os elementos do flagelo se estendem por toda a extensão da cabeça, terminando próximos ao ápice do núcleo (WERNER, 1965). Em microscopia eletrônica de varredura, o flagelo dos espermatozóides do *C. sordidus* é semelhante ao do *Crytorhynchidius lapathi*, mostrado por BURRINI et alii (1988). Entretanto, é possível que a semelhança se estenda para todas as espécies da superfamília Curculionidae, como pode ser observado pelas microfotografias publicadas por estes mesmos autores.

9 CONCLUSÕES

1. A sequência de transformações que ocorrem durante a diferenciação das espermatídes de *C. sordidus* em espermatozoides revelaram-se, em muitos aspectos, semelhantes às daquelas de outras espécies de insetos, em particular de outros curculionídeos.

2. O processo de compactação da cromatina apresenta uma sequência de fases bem distintas. Primeiro a cromatina torna-se toda condensada para depois assumir a forma de filamentos. Por associações estes filamentos formam cordões espessos e estes, então, coalescem em uma massa cromatínica. No processo de alongamento nuclear, acreditamos que vários fatores tais como, presença de microtúbulos, agregação da cromatina e elementos do envoltório nuclear desempenham papéis fundamentais.

3. O início da formação do acrossomo ocorre já no começo da espermiogênese, a partir do complexo de Golgi. Inicialmente a vesícula pró-acrossômica associa-se lateralmente ao envoltório nuclear e, durante a transformação do formato nuclear, esta vesícula alcança a sua posição definitiva na extremidade anterior do núcleo. O acrossomo é composto de 3 elementos: o perforatorium, a vesícula acrossomal e uma camada extra-acrossômica.

4. No começo da espermiogênese as mitocôndrias formam um complexo mitocondrial constituído, desde o início, por duas estruturas mitocondriais bem distintas e enroladas uma na outra. Subsequentemente este complexo mitocondrial diferencia-se em dois derivados mitocondriais desiguais, onde o maior é quase totalmente preenchido por material paracristalino e, em diâmetro, tem aproximadamente o dobro do menor. Sua extremidade anterior localiza-se na cavidade da base do núcleo. O derivado mitocondrial menor é basicamente ocupado por cristas mitocondriais, regularmente dispostas em ângulo reto relativo ao seu eixo maior. É possível que estes derivados mitocondriais estejam relacionados com a motilidade dos

espermatozoides: o menor como responsável pelo fornecimento de energia e o maior pelo padrão de batimento do flagelo.

5. Nas espermátides jovens foi observado um único centríolo. Este, no início da espermiogênese, é formado por 9 trincas de microtúbulos e localiza-se em uma depressão lateral do núcleo. Durante a alteração nuclear, o centríolo migra para a região basal do núcleo e torna-se alinhado com este. Nos espermatozoides, como ocorre na maioria dos insetos, o arranjo original em trincas deste centríolo não é mais observado.

6. O adjunto do centríolo aparece no quarto estágio, torna-se desenvolvido durante a transformação do formato nuclear e, no sétimo estágio, já não é mais observado. Nesta espécie, supomos que o adjunto tem como função manter o centríolo associado ao envoltório nuclear e garantir que este centríolo alcance a sua posição posterior e orientação definitiva durante esta transformação do núcleo.

7. O axonema tem origem a partir do único centríolo observado na espermátide e, inicialmente, apresenta o esquema básico de "9 + 2", o qual durante o quarto estágio evolui para o padrão clássico de "9 + 9 + 2", já descrito para a grande maioria dos insetos. O axonema, como para todos os animais, é responsável pela locomoção dos espermatozoides.

8. Os corpos acessórios são estruturas aproximadamente triangulares, em secção transversal, que flanqueiam o axonema, separando-o dos derivados mitocondriais. Cada corpo acessório possui uma expansão menos compacta, sendo esta mais desenvolvida em um deles. Durante a espermiogênese, os corpos acessórios começam a ser formados no sétimo estágio e suas expansões no oitavo. Acreditamos que estes corpos acessórios, especialmente suas expansões, juntamente com o derivado mitocondrial maior, estejam relacionados com o padrão de batimento do flagelo dos espermatozoides.

9. O espermatozoide de *C. sordidus* é muito longo e fino, medindo aproximadamente 160µm de comprimento. A cabeça, também longa e fina, mede por volta de 22µm. Destes, 1µm é representado pelo acrossomo. Por microscopia eletrônica de varredura, o flagelo apresenta-se como sendo formado por dois filamentos, sendo um linear e o outro ondulado. Quando observado em corte longitudinal, nota-se que o filamento ondulado é constituído pelo axonema, os dois corpos acessórios com suas expansões e o derivado mitocondrial menor, enquanto o filamento não ondulado representa o derivado mitocondrial maior.

10 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, W.A.; WIESMAN, A. & ELLIS, R.A. Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. **J. Cell Biol.** **32**: 11-26, 1967.
- ANDRÉ, J. & BERNHARD, W. The centriole and the centriolar region. In: **XIth International Congress Cell Biology**. Providence. R.I.9, 1964
- ARLEU, R.J. & SILVEIRA-NETO, S.S. Broca da bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). **Turrialba**, **34**(3): 359-67, 1984.
- BACCETTI, B. Insect Sperm Cell. **Adv. Insect Physiol.**, **9**: 315-397, 1972.
- BACCETTI, B. & BAIRATI, A. Indagini sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in *Dacus cleae* Geml. ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Diptera). **Redia**, **49**: 1-29, 1964.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R. & ROSATI, F. Uridine 5-³H incorporation in the centriole adjunct. **VHe Congrès Internationale de Microscopie Electronique Grenoble**, Vol. 3, p. 643-644, 1970.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R.; GIUSTI, F.; MAZZINI, M.; RENIERI, T.; ROSATI, F. & SELMI, G. Structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor* (The spermatozoon of Arthropoda. XX). **J. Mechanochem. Cell Motil.**, **2**: 149-161, 1973a.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G., DALLAI, R.; PALLINI, V.; PERITI, P.; PIANTELLI, F.; ROSATI, E. & SELMI, G. Structure and function in the spermatozoon of *Bacillus rossius*. **J. Ultrastruct. Res.**, **44** (Suppl 12): 1-73, 1973b.
- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F. & AFZELIUS, B.A. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. **J. Cell Biol.**, **73**(3): 594-600, 1977.

- BACCETTI, B.; DALLAI, R. & ROSATI, F. The spermatozoon of Arthropoda. III. The lowest holometabolic insects. *J. Microsc.*, **8**: 233-248, 1969.
- BAIRATI, A. & PEROTTI, M.E. Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: BACCETTI, B. (ed.) **Comparative Spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. 333-345.
- BÁO, 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.
- BÁO, S.N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, H. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Cytobios*, **58**: 93-100, 1989.
- BEAMS, H.W.; TAHMISIAN, T.N.; DEVINE, R.L. & ANDERSON, E. Electron microscope studies on the dictyosomes and acroblasts in the male germ cells of the cricket. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**(Suppl.): 123-130, 1956.
- BECCARI, F. Contributo alla conoscenza del *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Rivista di Agricoltura Subtropicale ed Tropicale*, **61**(1/3): 51-93, 1967a.
- BECCARI, F. Contributo alla conoscenza del *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Rivista di Agricoltura Subtropicale ed Tropicale*, **61**(4/6): 131-150, 1967b.
- BLOCH, D.P. & BRACK, S.D. Evidence for the cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in the grasshopper *Chortophaga viridifasciata* (de Gerr). *J. Cell Biol.*, **22**: 327, 1964.
- BRELAND, O.P.; BARKER, K.R.; EDDLEMAN, C.D. & BIESELE, J.J. Centrioles in the spermatids of insects. *Ann. Entomol. Sci. Am.*, **61**: 1037-1039, 1968.
- BRELAND, O.P.; GASSNER, G.; RIESS, W.R. & BIESELE, J.J. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. *Can. J. Genet. Cytol.*, **8**: 759-781, 1966.
- BRICK, D.; LIFSCHITZ, E. & FRIEDLANDER, M. Mitochondrial differentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: an ultrastructural analysis in the male sterile mutant ms(1)413. *J. Ultrastruct. Res.*, **66**: 151-163, 1979.
- BURRINI, A.G.; MAGNANO, L.; MAGNANO, A.R.; SCALA, C. & BACCETTI, B. Spermatozoa and phylogeny of Curculionoidea (Coleoptera). *Int. J. Insect Morphol.*, **17**(1): 1-50, 1988.
- CANTACUZÈNE, A. L'annexe centriolaire du spermatozoide des insectes. In: BACCETTI, B. (ed.) **Comparative Spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 553-563.

- CHEVAILLIER, P. Le noyau du spermatozoïde et son evolution au cours de la spermiogenèse. In: BACCETTI, B. (ed.) **Comparative Spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 499-514.
- CLAYTON, B.P.; DEUTSCH, K. & JORDAN-LUKE, B.M. The spermatid of the house-cricket, *Acheta domesticus*. **J. Microsc. Sci.** **99**: 15-23, 1958
- CRAVEIRO, D. & BÁO, S.N. Localização ultraestrutural de carboidratos em espermátides de *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae). **VIII Cong. Brasil. Biol. Cel.**, resumos, p. 114, 1993.
- CUILLÉ, J. Recherches sur le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* (Germar). **Monographie del insecte et recherches de ses chimiotropismes**. Paris, Institut des Fruits et Agrumes Coloniaux, 1950. 225p.(Ser. Tech, 4)
- FAWCETT, D.W. **An Atlas of Fine Structure: The Cell, Its Organelles and Inclusions**. W. B. Saunders and Company, Philadelphia and London, 1966.
- FAWCETT, D.W.; ANDERSON, W.A. & PHILLIPS, D.M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Develop. Biol.**, **26**: 220-251, 1971
- FAWCETT, D.W. & PHILLIPS, D.M. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. **Anat. Rec.**, **165**: 153-164, 1969.
- FEAKIN, S.D. **Control de los plagas de los bananos**. Londres, Center for Overseas Pest Research, 1975. 147p. (PANS Manual 1)
- FONSECA, J.P. A broca da bananeira. **O Biológico**, **2**(2): 56-61, 1936.
- FONZO, S. & ESPONDA, P. The relationship between microtubules and chromatin in spermatids of Acrididae. **Protoplasma**, **85**: 193-197. 1975.
- GASSNER, G. Studies on the housefly centriole adjunct. **J. Cell Biol.**, **47**: 69A, 1970.
- GASSNER, G.; CHILDRESS, D. & KLEMETSON, D.J. Spermiogenesis in boll weevil, *Anthonomus grandis* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, **4**(2): 115-125, 1975.
- GATENBY, J.B. The electron microscopy of centriole, flagellum and cilium. **J. R. Microsc. Soc.**, **79**: 299-317, 1961.
- GATENBY, J. B. & TAHMISIAN, T. N. Centriole adjunct, centrioles, mitochondria and ergastoplasm in orthopteran spermatogenesis, and electron microscopic study. **La Cellule** **60**: 103-134, 1959.

- GLAUERT, A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: GLAUERT, A.M. (ed.) **Practical Methods in Electron Microscopy**. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1975. v.3, p. 1-207
- HOAGE, T.R. & KESSEL, R.G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera*) with special reference to centriole replication and elimination. **J. Ultrastruct. Res.**, **24**: 6-32, 1968.
- HODGES, R.J. Ultrastructure of the somatic and germ cells of the testes of *Dermestes frischii* Kugelann (Coleoptera: Dermestidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, **11**(5/6): 235-253, 1982.
- IMMS, A.D. **A General Textbook of Entomology Including the Anatomy, Physiology, Development and Classification of Insects**. Dutton & Company Inc., New York, 1948.
- ITAYA, P.W.; THOMPSON, S.A. & HEIDGER Jr., P.M. Fine structure of late stage of spermiogenesis in *Leptocoris triviatatus* Say (Hemiptera: Corizidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, **9**: 135-145, 1980.
- ITO, S. The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of *Drosophila virilis*. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, **7**: 433-442, 1960.
- JAMIESON, B.G.M. **Ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. University Press, Cambridge, 1987. 195-196.
- JUMPER, G.A. & CANNON Jr., W.N. Spermatogenesis in the smaller european elm bark beetle, *Scolytus multistriatus*. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **68**(4): 733-740, 1975.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **27**: 136a, 1965.
- KAYE, J.S. Acrosome formation in the house cricket. **J. Cell Biol.**, **12**: 411-431, 1962.
- KAYE, J.S. The ultrastructure of chromatin in nucleus of interphase cells and in spermatids. In: **Handbook of Molecular Cytology**. LIMA-DE-FARIA, A. (ed.). Amsterdam: North Holland Publishing Comp., 1969, p. 361-380.
- KESSEL, R.G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the Dragonfly. **J. Ultrastruct. Res.**, **16**: 293-304, 1966.
- KESSEL, R.G. An electron microscope study of spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of microtubular systems during differentiation. **J. Ultrastruct. Res.**, **18**: 677-694, 1967.

- KIEFER, B.I. Development, organization, and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. **J. Cell Sci.**, **6**: 177-194, 1970.
- KIERSZENBAUM, A.L. & TRES, L.L. The packaging unit: a basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei. **J. Cell Sci.**, **33**: 265-283, 1978.
- LANZAVECCHIA, G. & DONNIN, C.L.L. Morphogenetic effects of microtubules. II. Spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. **J. Submicr. Cytol.**, **4**: 247-270, 1972.
- LE MENN, R. Observations sur la spermiogenèse et la spermatozoïde de *Psyllides* (Homoptera: Psylloidea). **C.R. Hebd. S'eanc. Acad. Sci Paris.** **262**: 1731-1733, 1966.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, **9**: 409-14, 1961.
- MESSIAS JR., N.S. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomya megacephala* Fab (Diptera, Calliphoridae). Campinas, 1990. 115 p. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas.
- MONTELLANO, C.B. Estudios biológicos del *Cosmopolites sordidus* (Germar), que infesta el rizoma de abacá. Turrialba, 1954. 27p. (Tese de Pós-Graduação).
- MOREIRA, R.S. Bananais livres de broca produzem o dobro. **Correio Agrícola**, São Paulo, **2**: 202-6, 1979.
- NATH, V. Cytology of spermatogenesis. **Int. Rev. Cytol.**, **5**: 395-453, 1956.
- PEROTTI, M.E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig., **J. Submicr. Cytol.**, **1**: 171-196, 1969.
- PEROTTI, M.E. The neck region in mature sperm of *Drosophila melanogaster*. In: BACCETTI, B. (ed.) **Comparative Spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Linceu, 1970. p. 523-529.
- PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. **J. Ultrastruct. Res.** **44**: 181-198, 1973.
- PHILLIPS, D.M. Insect sperm: structure and morphogenesis. **J. Cell Biol.**, **44**: 243-277, 1970.
- PHILLIPS, D.M. Substructure of the mammalian acrosome. **J. Ultrastruct. Res.**, **38**: 591-604, 1972.
- PRATT, S. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of an Hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. In: BACCETTI, B. (ed.) **Comparative Spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Linceu, 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.
- ROSATI, F., SELMI, G. & MAZZINI, M. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *J. Submicr. Cytol.*, **8**(1): 51-67, 1976.
- ROSS, H.H. *A Textbook of Entomology*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1961.
- ROSS, A. The substructure of centriole subfibres. *J. Ultrastruct. Res.*, **23**: 537-539, 1968.
- ROTHSCHILD, Lord. The spermatozoa of the honey-bee. *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, **107**: 289-294, 1955.
- SARAIVA, A.C. O gorgulho da bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar) no arquipélago de Cabo Verde. *Estudos Agronômicos*, Lisboa, **5**(2): 59-65, 1964.
- SHAY, J.W.; DOBSON, W.J.; SIMMONS, E.E.; BIESELE, J.J. & BRELAND, O.P. Subunits of flagellar accessory tubules. *Tissue & Cell* **1**(4): 593-596, 1969.
- SIMMONDS, N.W. *Bananas*. 2. ed. London, Longmans, 1966. 512p.
- STANLEY, H.P.; BOWMAN, J.T.; ROMRELL, L.J.; REED, S.C. & WILKINSON, R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, **41**(5/6): 433-466, 1972.
- SZÖLLOSI, A. Electron microscopic study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect, Orthoptera). *J. Ultrastruct. Res.*, **50**(3): 322-346, 1975.
- TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. Fine-structural cytochemistry of the centriolar adjunct in grasshopper spermatids. *Mikroskopie* (Wien), **36**: 35-42, 1980.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axonema and mitochondrial derivatives. *Exptl. Cell Res.*, **84**: 239-250, 1974a.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.* **48**: 284-303, 1974b.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Head-tail alignment. *J. Ultrastruct. Res.*, **50**: 117-129, 1975.
- TOKUYASU, K.T; PEACOCK, W.J. & HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, I. Individualization process. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **124**: 479-506, 1972.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **25**: 407-8, 1965.

- VIANA, A.M.M. Comportamento de agregação de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera, Curculionidae), mediado por semioquímicos, em olfatômetro. Viçosa-MG, 1991. 75 p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa.
- VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, **101**: 13-27, 1969.
- WARNER, F.D. New observations on flagellar fine structure; the relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. **J. Cell Biol.**, **47**(1): 159-82, 1970.
- WARNER, F.D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. **J. Ultrastruct. Res.**, **35**(3/4): 210-232, 1971.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, **4**(4): 475-8, 1958.
- WERNER, G. Untersuchungen über die Spermiogenese beim Sandläufer, *Cicindela campestris* (L.). **Z. Zellforsch.**, **66**: 255-74, 1965.
- WERNER, G. Untersuchungen über die Spermiogenese bei einem Lankäfer, *Carabus catenulatus*, Scop., und der Skorpion-Wasserwanze, *Nepra rubra* (L.). **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** **73**: 576-599, 1966.
- WIGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. Methuen & Co. Ltd., London, 1953.
- WILKINSON, R.F.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. The effects of abnormal cytoplasmic microtubule populations in mutant ms(3)10R and its colcemid induced phenocopy. **J. Ultrastruct. Res.**, **48**(2): 242-258, 1974.
- WOLF, K.W. & KYBURG, J. The restructuring of the flagellar base and the flagellar necklace during spermatogenesis of *Ephesia kuehniella* Z. (Lepidoptera, Pyralidae). **Cell Tissue Res.**, **256**: 77-86, 1989.
- YASUZUMI, G. Spermiogenesis in animals as revealed by electron microscopy. III. Formation and submicroscopic structure of the tail flagellum of fish, insect, bird and mammalia. **Proc. 1st. Reg. Conf. Electron Microscopy in Asia and Oceania, Tokyo**, p. 251-256, 1956.
- YASUZUMI, G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. **In. Rev. Cytol.**, **37**: 53-119, 1974.
- YASUZUMI, G.; SUGIOKA, T.; Tsubo, I.; YASUZUMI, F. & MATANO, Y. Spermiogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XX. Relationship between chromatoid bodies and centriole adjunct in spermatids of the grasshopper, *Acrida lata*. **Z. Zellforsch.**, **110**: 231-242, 1970.