

Sônia Nair Bão

Este exemplar corresponde à redação  
final da tese defendida pela candidata  
Sônia Nair Bão e aprovada pela comissão  
julgadora. Helder 05/11/87

Estudo ultra-estrutural da espermiogênese  
no mutante "olho róseo" comparativo à  
linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*  
Weidmann (Diptera, Tephritidae)

Campinas, 1987

B228e  
v.1  
8860/BC

Sônia Nair Bão

Estudo ultra-estrutural da espermiogênese  
no mutante “olho róseo” comparativo à  
linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*  
Weidmann (Diptera, Tephritidae)

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre.

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder  
Orientadora de Tese e Programa

Campinas, 1987

Volume I

Texto

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Waldemar e Noêmia, pelo exemplo de vida*

## Agradecimentos

- À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder; pela orientação científica e pela amizade e carinho nestes anos de convivência.
- À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, à Profa. Dra. Marina Silveira e à Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling; pela leitura zelosa do original deste trabalho e pelas críticas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento do mesmo.
- Aos Professores do Departamento de Biologia Celular; pelo conhecimento transmitido e pela convivência nestes anos.
- Aos Colegas e Funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Centro de Microscopia Eletrônica; que de alguma forma colaboraram para a efetivação deste trabalho.
- À Maria Tereza de Paula; pelo seu indispensável auxílio na elaboração das cópias fotográficas e pela amizade.
- Ao Gilson Paulo Manfio; pelo inestimável auxílio na impressão do texto e pela amizade.
- Ao Nazário de Souza Messias; pelo auxílio na confecção dos desenhos esquemáticos e pela amizade.
- Aos meus Pais, pelo estímulo e carinho.
- Aos Amigos, os quais não posso enumerar; pelo apoio e amizade.
- À Universidade de Ijuí; pela oportunidade.
- E à CAPES; pelo incentivo financeiro.

# Conteúdo

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Revisão Bibliográfica . . . . .	3
<b>2</b>	<b>MATERIAIS e MÉTODOS</b>	<b>10</b>
2.1	Método de Preparação para a Observação Ultra-Estrutural, segundo SIMIONESCU & SIMIONESCU (1976a, b), com algumas modificações . . . . .	12
2.2	Método de Preparação da Reação Citoquímica para Fosfatase Ácida (GÖMÖRI, 1952 - apud ESSNER, 1973) . . . . .	15
2.3	Método de Preparação da Reação Citoquímica para Fosfatase Ácida (BARKA & ANDERSON, 1962 - apud ESSNER, 1973; modificado por PAAVOLA, 1978a, e SOUZA & AZEVEDO, 1986) . . . . .	16
2.4	Método de Preparação da Reação Citoquímica para Arilsulfatase segundo HOPUSU-HAVU <i>et alii</i> (1967), com algumas modificações . . . . .	18
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
3.1	Organização Testicular . . . . .	21
3.2	Aspectos Ultra-Estruturais de Espermátides em Diferenciação	25
3.2.1	Estádios Iniciais . . . . .	25
	Formação do Complexo Mitocondrial . . . . .	25
	Formação do Acrossoma . . . . .	26
	Formação do Adjunto do Centríolo . . . . .	26
	Formação do Axonema . . . . .	27
	Diferenciação Nuclear . . . . .	28
3.2.2	Estádios Intermediários . . . . .	29
3.2.3	Estádios Finais . . . . .	33
3.2.4	Ultra-Estrutura do Espermatozóide na Espermateca	35
3.3	Estudo Citoquímico para Fosfatase Ácida no Processo de Espermio-gênese de <i>Ceratitidis capitata</i> . . . . .	37
3.4	Estudo Citoquímico para Arilsulfatase no Processo da Espermio-gênese de <i>Ceratitidis capitata</i> . . . . .	42

<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
4.1	Organização Testicular . . . . .	45
4.2	Citodiferenciação das Espermátides . . . . .	50
4.2.1	Formação do Complexo Mitocondrial . . . . .	50
4.2.2	Formação do Acrossoma . . . . .	53
4.2.3	Formação do Adjunto do Centríolo . . . . .	54
4.2.4	Formação do Axonema . . . . .	55
4.2.5	Formação de Membranas Citoplasmáticas . . . . .	57
4.2.6	Membrana Plasmática . . . . .	58
4.2.7	Diferenciação Nuclear . . . . .	59
4.2.8	Células Císticas . . . . .	62
4.2.9	Ultra-Estrutura do Espermatozóide na Espermateca	64
4.3	Citoquímica I: Fosfatase Ácida na Citodiferenciação das Es- permátides . . . . .	66
4.3.1	Células Espermáticas . . . . .	66
4.3.2	Células Císticas . . . . .	72
4.4	Citoquímica II: Arilsulfatase na Citodiferenciação das Esper- mátides . . . . .	75
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES / RESUMO</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A mosca *Ceratitis capitata* Weidmann é um Díptero, praga de fruto, portanto de considerável importância biológica e econômica. Esta mosca pertence à família Tephritidae, ordem Diptera, sub-ordem Cyclorrhapha e tribo Schizophora. O seu controle, assim como da grande maioria dos insetos pragas, tem sido feito com o uso indiscriminado de inseticidas, em detrimento ao equilíbrio biológico. Este método de controle, além de causar problemas ao homem e ao meio ambiente de um modo geral, pode eventualmente perder sua efetividade com a inevitável seleção de resistência pelo animal. Com estas preocupações, nas duas últimas décadas, esforços foram concentrados com o intuito de desenvolver sofisticados métodos de controle, sendo que os mais usados são as técnicas de esterilidade e outros métodos de controle genético (RADU *et alii*, 1975; RÖSSLER & KOLTIN, 1976; RÖSSLER, 1982).

Para o desenvolvimento de controles alternativos nas populações de insetos o estudo da biologia da reprodução destes indivíduos parece ser de grande valia. Desejando contribuir neste sentido, efetuamos o estudo da espermiogênese no mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, o qual possui uma capacidade de inseminação bastante reduzida.

As moscas que eclodem de ovos de *Ceratitis capitata*, da linhagem selvagem, submetidos à irradiação com luz ultravioleta, apresentam alterações morfológicas na segmentação do abdômem. Ao se realizar o cruzamento destes indivíduos obtém-se indivíduos com uma mutação que

afeta a cor dos olhos – mutante “olho róseo”. Portanto, os raios ultravioleta parecem causar lesões no DNA das células germinativas dos indivíduos em formação no interior dos ovos irradiados. A mutação que afeta a coloração dos olhos é monogênica, recessiva e autossômica. Os machos mutantes para esta característica também possuem uma capacidade de inseminação significativamente menor e o tempo requerido para a inseminação das fêmeas é maior que aquele requerido pelos machos normais (CARDOSO *et alii*, 1984; CARDOSO, 1987).

Frente a estas informações que apontam para uma alteração comportamental do mutante, procuramos investigar ainda a possibilidade de modificações no desenvolvimento celular que poderiam levar à malformações e/ou à produção de menor quantidade de células germinativas viáveis no mutante. Propusemo-nos a investigar o processo da espermiogênese desta mosca a nível ultra-estrutural, com o objetivo de ampliar os conhecimentos da biologia de reprodução de *Ceratitis capitata*, e em específico deste mutante, que, por possuir uma capacidade de inseminação significativamente menor, apresenta conseqüentemente uma população bastante reduzida.

Portanto, com o objetivo de contribuir com novos conhecimentos a respeito do processo da espermiogênese da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata*, em específico do mutante “olho róseo”, que possam servir de base para posteriores trabalhos relacionados direta e/ou indiretamente com o controle biológico deste Díptero, praga das culturas frutíferas realizaremos um estudo da organização testicular, ao qual segue uma análise dos eventos de diferenciação das células espermáticas no testículo e na espermateca. Para melhor entendermos as alterações morfofuncionais no processo da espermiogênese recorreremos ao estudo citoquímico para reações enzimáticas fosfatásica ácida e arilsulfatase. O nosso estudo, em todas as suas etapas, será realizado paralelamente na linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* e no mutante “olho róseo” para efeitos comparativos; baseando-se ainda na citodiferenciação descrita para a espermiogênese normal de *Ceratitis capitata* por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983).

## 1.1 Revisão Bibliográfica

Os espermatozóides são células altamente especializadas, verdadeiros modelos de diferenciação celular. São células destituídas de muitas organelas associadas com o metabolismo celular, e os elementos essenciais que são conservados passam por uma evolução morfológica que não tem paralelo em outros tipos celulares. Muitas de suas características estruturais estão relacionadas com o seu papel terminal na fertilização, cuja função específica relaciona-se com o carregamento do material genético e sua introdução no óvulo durante o processo da fecundação (PHILLIPS, 1974a).

A dimensão e ultra-estrutura do espermatozóide demonstra considerável variação entre as diferentes espécies de insetos. As razões desta diversidade ainda não são totalmente conhecidas. Porém, esta diversidade pode refletir somente pequenas diferenças adaptacionais exigidas funcionalmente durante a produção, armazenamento e transferência dos espermatozóides, e no processo de fertilização; ou refletir pequenas mudanças acumuladas com o processo de evolução; ou ainda, a diversidade da ultra-estrutura do espermatozóide relaciona-se com a filogenia dos grupos de insetos (DALLAI & AFZELIUS, 1980).

Em todo o filo Arthropoda um tipo convencional de espermatozóides é estabelecido. Na maioria das espécies de insetos os espermatozóides são do tipo modificado, cujas características morfológicas estão voltadas e/ou adaptadas à motilidade da célula, através de diferenciações sofridas na sua forma filamentosa, na cabeça muito alongada, no complexo acrossomal e nas mitocôndrias muito modificadas que flanqueiam o longo axonema (BACCETTI, 1970 e 1972; DALLAI & AFZELIUS, 1980).

A formação das células germinativas ocorre no interior de folículos dentro dos testículos, que geralmente são órgãos pares. Os testículos morfofuncionalmente podem ser divididos em três zonas distintas. Em *Drosophila melanogaster* a divisão do testículo em três zonas foi assim estabelecida: porção apical (distal) onde encontram-se os espermatócitos e alguns cistos com espermátides em fases iniciais de diferenciação; porção intermediária que ocupa a maior parte do testículo, é o local onde as células germinativas sofrem o processo de maturação; porção terminal (proximal), região onde se encontram cistos com espermátides em estádios adiantados de maturação e cistos com espermatozóides maduros (BAIRATI, 1967;

TOKUYASU *et alii*, 1972a).

A espermatogênese representa um complexo sistema de diferenciação celular, o qual produz células haplóides encarregadas da transferência do material genético aos óvulos no processo de fertilização. Durante a espermatogênese as espermatogônias pré-definitivas se desenvolvem ao redor de uma célula apical localizada no “germarium” existente na porção distal de cada folículo testicular. A espermatogônia pré-definitiva ao deixar o “germarium” se associa às células somáticas formando um espermatocisto. Esta espermatogônia agora encistada, denomina-se espermatogônia definitiva. Iniciam-se as divisões sincrônicas (divisões mitóticas goniais) das quais resultam os espermatócitos primários que ao passarem pelas duas divisões sucessivas da meiose dão origem a um feixe de espermátides; estas, por sua vez, sofrem profundas alterações morfofuncionais no decorrer de um processo designado espermiogênese. Este processo culmina com a formação de cistos com espermatozóides orientados paralelamente cabeça com cabeça, cauda com cauda (VIRKKI, 1969; GARBINI & IMBERSKI, 1977; DUMSER, 1980).

Em contraste com muitos vertebrados, nos quais os espermatozóides desenvolvem-se no interior de túbulos seminíferos, em muitos invertebrados e alguns poucos vertebrados as células germinativas masculinas desenvolvem-se no interior de cistos. O cisto é essencialmente um clone de células germinativas circundado por células somáticas de natureza epitelial. O número de espermatozóides por cisto é usualmente constante e específico para cada espécie, e é em geral igual a razão  $2^n$ , onde  $n$  é o número de divisões mitóticas goniais juntamente com o processo meiótico pelo qual passam os espermatócitos secundários, originando as espermátides. As células germinativas de um cisto são funcionalmente um sincício, elas dividem-se e desenvolvem-se em sincrônia. As espermátides interconectadas por pontes citoplasmáticas no interior do cisto permanecem alinhadas lado a lado durante o processo da espermiogênese (BAIRATI, 1967; VIRKKI, 1969; PHILLIPS, 1970a e 1974a; DUMSER, 1980).

O número de células espermáticas por cisto é um indicativo da posição filogenética ocupada pelo inseto dentro do grupo a que pertence. Os insetos de ordens mais primitivas possuem um número maior de células espermáticas por cisto do que as ordens mais modernas; e no interior de categorias sistemáticas, grupos e espécies mais evoluídos ten-

dem a possuir menos espermatozóides por cisto. O decréscimo do número de espermatozóide por cisto possivelmente reflete uma redução geral na produção de espermatozóides, e isto provavelmente tem valor adaptativo limitando a variabilidade genética (VIRKKI, 1969).

Na linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* o número de espermatozóides na grande maioria dos cistos aproxima-se de 256, seguindo a razão  $2^n$ , onde  $n$  é igual a 8, sendo este número característico para esta espécie (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983). Seguindo a hipótese de VIRKKI, na ordem Diptera a família Tephritidae, representada por *Ceratitis capitata*, é menos evoluída, contendo aproximadamente 256 células espermáticas por cisto, enquanto que a família Drosophilidae, representada por *Drosophila melanogaster*, é mais evoluída, contendo somente 64 células espermáticas por cisto.

Porém, o número de células germinativas por cisto apresenta-se reduzido em mutantes X/0 de *Drosophila melanogaster*, onde somente cerca de 20% dos cistos maduros contêm a quantidade teoricamente esperada de espermatozóides, ou seja, 64 (KIEFER, 1966; HESS & MEYER, 1968).

O processo da espermiogênese foi descrito de forma detalhada, a nível ultra-estrutural, relacionando as modificações morfológicas das células espermáticas com estádios característicos em algumas espécies de insetos, como *Drosophila melanogaster* (STANLEY *et alii*, 1972); *Locusta migratoria* (SZÖLLÖSI, 1975); e *Ceratitis capitata* (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983).

Inúmeros autores, em seus trabalhos referentes à espermiogênese em insetos, enfocam os eventos morfofisiológicos pelos quais passam as espermátides para atingir a configuração final do espermatozóide, célula apta ao processo de fertilização (KESSEL, 1967; HOAGE & KESSEL, 1968; MOSES & WILSON, 1970; FOLLIOU & MAILLET, 1970; PHILLIPS, 1970a e 1974a; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972; YASUZUMI, 1974; GASSNER *et alii*, 1975; CRUZ-LANDIM, 1979a; CRUZ-LANDIM & BEIG, 1980).

Outros trabalhos referem-se especificamente à morfologia do espermatozóide maduro de alguns insetos, como *Drosophila melanogaster* Meig (PEROTTI, 1969; BAIRATI & PEROTTI, 1970); *Apis mellifera* (CRUZ-HÖFLING *et alii*, 1970); *Dalbulus maidis* Del. e W. (CRUZ-

LANDIM & KITAJIMA, 1972); *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropila* (CAETANO, 1980); Heteroptera (DALLAI & AFZELIUS, 1980); *Ceratitis capitata* Weidmann (QUAGIO-GRASSIOTTO & DOLDER, 1985); e *Alabama argillacea* (MEDEIROS, 1986).

Há, entretanto, várias publicações que tratam da formação, do desenvolvimento e da morfologia de determinadas estruturas celulares que caracterizam ultra-estruturalmente os espermatozóides de insetos. Quando do processo de diferenciação da célula espermática as organelas celulares que são conservadas no espermatozóide são bastante modificadas contribuindo para a formato muito delgado desta célula, a qual é constituída por uma cabeça bastante delgada e por uma cauda ou flagelo extremamente comprido.

A cabeça do espermatozóide é formada por um acrossoma e pelo núcleo. O acrossoma é, essencialmente, um pequeno grânulo, limitado por membrana, que se localiza anteriormente ao núcleo. Sua formação, geralmente, inicia-se com o aparecimento de um grânulo pró-acrossômico na superfície côncava do complexo de Golgi, organela esta, que participa ativamente no desenvolvimento do acrossoma. A natureza enzimática do conteúdo acrossomal propõe o envolvimento desta organela no processo de fecundação auxiliando a penetração do espermatozóide no óvulo (PHILLIPS, 1970a; BACCETTI, 1972; YASUZUMI, 1974).

Quanto ao estudo citoquímico, poucos trabalhos na literatura enfocam a reação enzimática fosfatásica ácida em acrossoma de espermatozóides. As enzimas parecem ser armazenadas em uma forma inativa no acrossoma de espermatozóides do ouriço-do-mar (ANDERSON, 1968) e *Marthasterias glacialis* (SOUZA & AZEVEDO, 1986) e serão ativadas somente no momento da fertilização.

Durante a espermiogênese, a cromatina das espermátides sofre uma série de transformações que levam à condensação de todo o núcleo com conseqüente alongamento e redução do diâmetro do mesmo. Estas transformações são discutidas por inúmeros pesquisadores em diferentes espécies de insetos, como *Aeschna grandis* e outras espécies de libélulas (KESSEL, 1966 e 1970); *Drosophila melanogaster* (TOKUYASU, 1974b e 1975a); *Coelopa frigida* (SCHRANKEL & SCHWALM, 1974); *Myogryllus* sp. (CRUZ-LANDIM & FERREIRA, 1976); e *Ceratitis capitata* Weid (QUAGIO-GRASSIOTTO & DOLDER, 1981).

O estudo da reação enzimática fosfatásica ácida nuclear na literatura restringe-se basicamente, a núcleos de células somáticas, com exceção do trabalho de YASUZUMI e colaboradores (1970b) em espermátides de *Cipangopaludina malleata*. No núcleo de células somáticas a atividade fosfatase ácida parece relacionar-se com o processo de transcrição do DNA (DEULTOR *et alii*, 1981).

A região caudal ou flagelo é formado pelo adjunto do centríolo, em sua porção inicial, o qual circunda o corpúsculo basal, e o axonema com um arranjo básico de  $9 + 2$  microtúbulos circundado ainda, por 9 microtúbulos acessórios em muitos grupos de insetos. Ladeando o axonema encontram-se dois derivados mitocondriais que se estendem da região anterior até próximo à extremidade posterior do flagelo.

O adjunto do centríolo está associado com a região posterior do núcleo e é observado como uma estrutura granular, densa que circunda o centríolo e a porção inicial do flagelo das células espermáticas de muitos insetos. Na literatura YASUZUMI e colaboradores (1970a), TAF-FAREL & ESPONDA (1980) trabalhando com a espermiogênese de gafanhoto e CANTACUZÈNE (1970) em estudo com células espermáticas de Orthoptera discutem a provável constituição e função desta estrutura.

As células germinativas na maioria dos insetos retêm aparentemente, somente um centríolo, o qual modifica-se no corpúsculo basal do axonema. Por sua vez, o axonema geralmente apresenta um arranjo tubular típico de  $9 + 9 + 2$  microtúbulos (2 microtúbulos centrais rodeados por 9 microtúbulos duplos, que por sua vez, são circundados por mais 9 microtúbulos simples). Na tentativa de elucidar a complexa organização do axonema, relacionando-a com a motilidade flagelar dos espermatozoides, inúmeros autores envolveram-se no estudo ultra-estrutural deste componente do flagelo, em células espermáticas de insetos (ROBISON, 1966 e 1970; PHILLIPS, 1966, 1969, 1970c e 1974b; HOAGE & KESSEL, 1968; SHAY *et alii*, 1969; KIEFER, 1970; WARNER, 1970 e 1974; TILNEY *et alii*, 1973; BACCETTI & DALLAI, 1976; CRUZ-LANDIM, 1979b; DALLAI & MAZZINI, 1983; YIN *et alii*, 1985).

Paralelamente ao estudo ultra-estrutural surgiram alguns estudos citoquímicos a nível do flagelo de espermatozoides de insetos. Os trabalhos na literatura referem-se à localização da atividade enzimática fosfatásica ácida no axonema dos espermatozoides de *Bacillus* e *Ceratitidis*

(BIGLIARDI *et alii*, 1970); de *Bacillus rossius*, *Ceratitis capitata* e *Pezotettix giornai* (BACCETTI *et alii*, 1971a); de *Drosophila melanogaster* (BEAULATON & PERRIN-WALDEMER, 1973); e de *Triatoma infestans* (DOLDER, 1981).

Os derivados mitocondriais dispõem-se um de cada lado do axonema e estendem-se desde a extremidade posterior do núcleo até as proximidades da extremidade final da cauda dos espermatozóides. Nos insetos, durante a espermiogênese, as mitocôndrias das células espermáticas passam por uma série de transformações morfofuncionais para a formação dos derivados mitocondriais. Estas transformações estão elucidadas nos trabalhos de PRATT (1970) com *Murgantia histrionica* (Hemiptera); de TOKUYASU (1974a e 1975b) com *Drosophila melanogaster*; de ROSATI e colaboradores (1976) num estudo comparativo de derivados mitocondriais em espermatozóides de vários grupos de insetos; de BACCETTI e colaboradores (1977) com espermatozóides de *Notonecta*; e de CRUZ-LANDIM & MORAES (1980) na espermiogênese de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.

Na literatura pouquíssimos são os trabalhos que enfocam o estudo citoquímico de enzimas líticas em vesículas lisossomais de células germinativas e/ou células císticas. Os autores PERRIN-WALDEMER & BEAULATON (1973) e TOKUYASU e colaboradores (1972b) respectivamente, em estudos citoquímicos durante o processo da espermatogênese e espermiogênese em *Drosophila melanogaster* enfocam a participação da fosfatase ácida na eliminação de resíduos celulares resultantes das modificações morfológicas pelas quais passam as células germinativas e a ação desta enzima nas células císticas durante o processo de liberação dos espermatozóides maduros.

Porém, inúmeros são os estudos encontrados na literatura com referência ao estudo citoquímico de hidrolases, especificamente fosfatases ácidas em lisossomos de células somáticas, tais como em células de diferentes órgãos de ratos (GOLDFISCHER *et alii*, 1964; SMITH & FARQUHAR, 1966; HELMINEN *et alii*, 1968; SERRANO *et alii*, 1976); em intestino delgado de camundongo (BARKA, 1964); em túbulos renais de camundongo (SASAKI & FISHMAN, 1973; MIYAYAMA *et alii*, 1975); em glândula salivar de *Drosophila melanogaster* (ANASTASIA-SAWICKI & MACINTYRE, 1976); em túbulos de Malphigi de *Triatoma infestans*

(AZEREDO-OLIVEIRA, 1982); e no órgão pineal de *Salmo gairdneri* (OMURA *et alii*, 1986).

Na literatura o estudo citoquímico da arilsulfatase, enzima cuja localização preferencial ocorre a nível lisossomal está mais relacionado com análises bioquímicas em testículos e espermatozóides de mamíferos (ISHIZUKA *et alii*, 1973; YAMATO *et alii*, 1974). A localização da enzima a nível ultra-estrutural está registrada em alguns trabalhos com células renais de ratos (ARSTILA *et alii*, 1967; HOPUSU-HAVU *et alii*, 1967; ERICSSON & HELMINEN, 1967; HOPUSU-HAVU & HELMINEN, 1974).

Na literatura alguns trabalhos com mutantes de *Drosophila* referem-se à alterações no processo da espermiogênese. Em machos Y-deficiente observa-se que todos os elementos estruturais para o desenvolvimento do espermatozóide normal estão presentes, porém o que lhes falta é a propriedade de organização, portanto estes machos são completamente viáveis, porém estéreis (MEYER, 1968 e 1970; KIEFER, 1969). No mutante X/0 além da grande frequência de cistos com pequeno número de espermatozóides, foram verificadas alterações no desenvolvimento dos derivados mitocondriais e fibras do axonema (KIEFER, 1966). O cromossomo Y heterocromático é portador de inúmeros fatores de fertilidade indispensáveis para o desenvolvimento normal de espermatozóides férteis (HESS & MEYER, 1968; HARDY *et alii*, 1981).

Em mutantes autossômicos de *Drosophila* alterações morfológicas anormais no processo de diferenciação da espermatíde são observadas. Entre as anomalias mais comuns observa-se a falta de diferenciação da cabeça, degeneração do axonema, formação de corpúsculos paracristalinos múltiplos nos derivados mitocondriais e não formação dos derivados mitocondriais (SHOUP, 1967; ROMRELL *et alii*, 1972a e 1972b; WILKINSON *et alii*, 1974; HABLSTON *et alii*, 1977; BRICK *et alii*, 1979).

Machos de *Drosophila melanogaster* e *Locusta migratoria* submetidos à temperatura elevada apresentam o processo da espermiogênese com algumas alterações onde observa-se frequentemente a formação das células germinativas com anomalias morfológicas (ANDERSON, 1967; SZÖLLÖSI, 1976a e 1976b).

## 2 MATERIAIS e MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados machos selvagens e mutantes “olho róseo” da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata*, com 05 a 30 dias, após a emergência do adulto, e fêmeas selvagens e mutantes cruzadas, respectivamente, com machos da mesma linhagem.

O mutante “olho róseo” foi obtido em laboratório. Ovos com a idade de 01 hora, de *Ceratitis capitata*, da linhagem selvagem, foram submetidos à irradiação durante 7.5 minutos, com luz ultravioleta, num comprimento de onda de 254 nm. A partir do cruzamento dos indivíduos que eclodiram dos ovos irradiados foi obtido o referido mutante (CARDOSO, 1987). As moscas foram gentilmente cedidas pela professora Ana Maria Pereira Cardoso do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

Machos adultos foram dissecados com auxílio de um microscópio estereoscópio ZEISS, os testículos retirados e submetidos a diferentes processos de fixação para a observação de aspectos ultra-estruturais e estudo citoquímico para fosfatase ácida e arilsulfatase nas diversas fases da espermiogênese no mutante “olho róseo”, comparativo à linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*. As espermatecas de fêmeas adultas foram utilizadas para a observação e análise de espermatozóides armazenados no trato genital feminino do mutante comparativo à fêmea selvagem.

Os métodos experimentais empregados no preparo de testículos e espermatecas para o estudo ultra-estrutural e citoquímico da espermiogênese no mutante “olho róseo”, comparativo à linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* serão explicados a seguir.

## 2.1 Método de Preparação para a Observação Ultra-Estrutural, segundo SIMIONESCU & SIMIONESCU (1976a, b), com algumas modificações

Machos e fêmeas adultos do mutante “olho róseo” e do tipo selvagem da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata* foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão fosfato Sörensen 0.1 M, pH 7.4 (GLAUERT, 1975), contendo 3.5 % de sacarose e traços de cloreto de cálcio. Os órgãos reprodutores dos animais, testículos espermatecas, foram fixados inteiros, pois devido às pequenas dimensões dos mesmos (0.1 mm de diâmetro da espermateca, e 0.5 mm de comprimento por 0.3 mm de diâmetro do testículo) o fixador não teria dificuldades para penetração.

Após a remoção do material, testículos e espermatecas foram fixados, por imersão, em solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0.1 M, pH 7.4, contendo 3.5 % de sacarose e traços de cloreto de cálcio, durante 2 a 3 horas, a 4°C.

As gônadas foram, após a fixação em glutaraldeído, lavadas no mesmo tampão, durante 1 hora, a 4°C, efetuando-se 2 trocas.

A pós-fixação foi efetuada, por imersão, em tetróxido de ósmio 2% em tampão fosfato Sörensen 0.2 M, pH 7.4, contendo 3.5 % de sacarose e traços de cloreto de cálcio, durante 1 hora, a 4°C.

Após uma lavagem rápida em tampão fosfato Sörensen 0.1 M; os espécimes foram tratados com ácido tânico a 2% em tampão fosfato Sörensen 0.1 M, pH 7.4, contendo 3.5 % de sacarose e traços de cloreto de cálcio, durante 1 hora, a 4°C. O tratamento com ácido tânico visa a obtenção de um aumento geral de contraste das estruturas celulares, particularmente das membranas.

Testículos e espermatecas passaram por uma rápida lavagem em água destilada e foram submetidos ao processo de desidratação em uma série gradual de álcool etílico:

1. Após a lavagem do material em água destilada, o mesmo foi imerso em um pequeno volume de água destilada, ao qual adicionou-se álcool etílico 95 %, gota a gota, durante 15 minutos, a 4°C, até a obtenção do dobro do volume inicial da água, obtendo-se portanto uma con-

centração final do álcool de aproximadamente 45 %.

2. Desprezou-se metade do volume de álcool 45 %, no qual estava imerso o material em estudo, adicionou-se álcool etílico 95 %, gota a gota, durante 15 minutos, a 4°C, até a obtenção do volume inicial do líquido, obtendo-se portanto uma concentração final do álcool de aproximadamente 75 %.
3. O volume total do álcool 75 % foi desprezado, adicionou-se álcool 95 %, deixando o material em estudo imerso durante 15 minutos, a 4°C. A substituição do álcool 95 % foi repetida mais duas vezes.
4. O álcool 95 % foi substituído por álcool 100 %, deixando-se o material imerso durante 10 minutos, à temperatura ambiente. A substituição do álcool 100 % foi repetida mais duas vezes.

Após a desidratação dos espécimes, efetuou-se a substituição do etanol pelo óxido de propileno segundo a metodologia abaixo descrita:

1. Desprezou-se o álcool 100 % e adicionou-se etanol 100 % e óxido de propileno na proporção 1:1, deixando o material em estudo imerso nesta solução durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
2. A solução etanol 100 % e óxido de propileno (1:1) foi substituída por óxido de propileno puro, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido mais uma vez.

O material em estudo foi então embebido em uma mistura de óxido de propileno e Epon (1:1), “overnight” ou 12 horas, em frasco aberto, à temperatura ambiente. No dia seguinte procedeu-se à inclusão do material em Epon 812, utilizando-se a forma dura - mistura B descrita por LUFT (1961) para a obtenção da máxima dureza final dos blocos.

Os cortes ultra-finos de aproximadamente 30 a 50 nm de espessura, de cor cinza a levemente dourada (cor esta, devido à interferência da luz) foram obtidos em ultra-micrótomo LKB, com a utilização de navilhas de vidro. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh” 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 1 N de hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965), por 2 minutos, à temperatura ambiente.

A observação e as micrografias eletrônicas do material em estudo foram efetuadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, marca ZEISS EM 9S-2, operado a 60 kV, a aumentos de 1.800 a 60.000 vezes, utilizando-se filmes Fuji (Fuji Electron - Microscopic Film - FG).

Para revelação dos filmes utilizou-se o revelador D19B, preparado conforme fórmula fornecida pela Kodak. As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico Kodabromide, peso simples,  $F_3$  ou  $F_4$ , da Kodak, com a utilização de uma ampliador Fuji, modelo S69, equipado com as lentes originais. Na revelação e fixação das cópias fotográficas utilizou-se respectivamente, o revelador Dektol da Kodak e o Fixador também da Kodak.

## 2.2 Método de Preparação da Reação Citoquímica para Fosfatase Ácida (GÖMÖRI, 1952 - apud ESSNER, 1973)

Machos adultos do mutante “olho róseo” e do tipo selvagem da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata* foram anestesiados em éter sulfúrico e dissecados em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.2 M, pH 7.2 (GLAUERT, 1975), contendo 3.5 % de sacarose. Os testículos foram fixados, por imersão, em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.2 M, pH 7.2, contendo 3.5 % de sacarose, durante 30 minutos, a 4°C.

Após a fixação em glutaraldeído, o material em estudo foi lavado rapidamente no mesmo tampão, e imerso no meio de incubação para a reação enzimática fosfatásica ácida: 30 mg de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio; 11 ml de tampão acetato 0.05 M, pH 5.0 (HUMASON, 1972), contendo 3.5 % de sacarose; e 0.1 ml de nitrato de chumbo 12 %. Os componentes do meio foram misturados na ordem indicada, e este foi filtrado antes de ser utilizado. O material em estudo permaneceu no meio de incubação durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Os espécimes, após uma lavagem rápida em tampão cacodilato de sódio 0.2 M, pH 7.2, foram pós-fixados, por imersão, em tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato 0.2 M, pH 7.2, contendo 3.5 % de sacarose, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

O material em estudo passou por uma rápida lavagem em água destilada, e foi em seguida submetido ao processo de desidratação em série gradual de álcool etílico e inclusão em Epon 812, conforme descrito anteriormente.

Os cortes ultra-finos foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão, sem contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo. Nos controles da reação citoquímica para fosfatase ácida, segundo GÖMÖRI, os testículos foram incubados em um meio sem a presença do substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. Os cortes ultra-finos, para observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão, foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo.

### 2.3 Método de Preparação da Reação Citoquímica para Fosfatase Ácida (BARKA & ANDERSON, 1962 - apud ESSNER, 1973; modificado por PAVOLA, 1978a, e SOUZA & AZEVEDO, 1986)

No estudo citoquímico para fosfatase ácida, além da metodologia descrita anteriormente, foi empregada uma variação da técnica de fixação e meio de incubação. Esta variação encontra-se descrita a seguir.

Machos adultos do mutante “olho róseo” e do tipo selvagem da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata* foram anestesiados em éter sulfúrico e dissecados em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose. Os testículos foram fixados, por imersão, em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 30 minutos e/ou 2 horas, a 4°C.

Após a fixação em glutaraldeído, o material em estudo foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5% de sacarose, durante 30 minutos e/ou 2 horas, a 4°C.

A seguir, os testículos foram pré-incubados em tampão tris-maleato 0.05 M, pH 5.0 (VILLELA *et alli*, 1973), contendo 5 % de sacarose, durante 30 minutos, a 4°C.

A incubação por 1 hora, a 37°C e/ou temperatura ambiente, foi realizada no seguinte meio: 12.5 mg de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio; 1.0 ml de água destilada; 2.0 ml de tampão tris-maleato 0.05 M, pH 5.0, contendo 5 % de sacarose; e 2.0 ml de nitrato de chumbo 0.2 %. Os componentes do meio de incubação foram misturados na ordem indicada, e este foi filtrado antes de ser utilizado.

Após a incubação, o material em estudo foi lavado 2 vezes, por 5 minutos cada lavagem, em tampão tris-maleato 0.05 M, pH 5.0, contendo 5 % de sacarose; em seguida lavado 2 vezes, por 5 minutos cada lavagem, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose.

Na etapa seguinte, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 1 hora.

O material em estudo passou por uma rápida lavagem em água destilada e foi em seguida submetido ao processo de desidratação em série gradual de álcool etílico, e inclusão em Epon 812, conforme descrito anteriormente.

Os cortes ultra-finos foram observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão, sem contrastação por acetato de uranila e citrato de chumbo.

Nos controles da reação citoquímica para fosfatase ácida, segundo BARKA & ANDERSON, os testículos foram incubados em um meio sem a presença do substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. Os cortes ultra-finos, para observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão, foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

## 2.4 Método de Preparação da Reação Citoquímica para Arilsulfatase segundo HOPSU-HAVU *et alii* (1967), com algumas modificações

Foi investigada também a presença de arilsulfatase, a qual está associada principalmente à presença de lisossomos. A metodologia empregada encontra-se descrita a seguir.

Machos adultos do mutante “olho róseo” e do tipo selvagem da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata* foram anestesiados em éter sulfúrico e dissecados em solução de glutaraldeído 1.5 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose. Os testículos foram fixados, por imersão, em solução de glutaraldeído 3 % em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 1 hora, a 4°C.

Após fixação em glutaraldeído, os espécimes foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 30 minutos, realizando-se duas trocas; em seguida, passou-se à lavagem em tampão acetato 0.1 M, pH 5.4, contendo 5 % de sacarose, durante 30 minutos, realizando-se 2 trocas. Ambas as lavagens foram realizadas a 4°C.

A incubação, por 1 hora, foi realizada no seguinte meio: 60 mg de *p*-nitrocatecol sulfato em 1.5 ml de água destilada; 4.5 ml de tampão acetato 0.1 M, pH 5.4, contendo 5 % de sacarose; e 1.5 ml de cloreto de bário 5 %. O meio de incubação foi mantido a 37°C.

Após a incubação, o material em estudo foi lavado em tampão acetato 0.1 M, pH 5.4, contendo 5 % de sacarose, durante 15 minutos, realizando-se 2 trocas; e em seguida uma lavagem em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 15 minutos, realizando-se 2 trocas. Ambas as lavagens foram realizadas à temperatura ambiente.

Os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2, contendo 5 % de sacarose, durante 1 hora.

O material em estudo passou por uma rápida lavagem em água destilada e foi em seguida submetido ao processo de desidratação em uma série gradual de álcool etílico, e inclusão em Epon 812, conforme descrito anteriormente.

Para a análise em Microscópio Eletrônico de Transmissão a contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo não foi realizada nos cortes ultrafinos.

Nos controles da reação citoquímica para arilsulfatase os testículos foram incubados em um meio sem a presença do substrato, *p*-nitrocatecol sulfato. Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para a observação em Microscópio Eletrônico de Transmissão.

### 3 RESULTADOS

Para o estudo da espermiogênese do mutante “olho róseo” seguiremos a classificação dos estádios que caracterizam o desenvolvimento das espermátides de *Ceratitis capitata* da linhagem selvagem, descrita por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983). O processo da espermiogênese foi dividido em 10 estádios de diferenciação das espermátides, os quais são distinguíveis morfofisiologicamente. Porém, com o intuito de facilitar nosso estudo passaremos a considerar os estádios 1, 2, 3, 4 e 5 como estádios iniciais; os estádios 6, 7 e 8 como estádios intermediários; e os estádios 9 e 10 como estádios finais na diferenciação da célula espermática.

### 3.1 Organização Testicular

O macho de *Ceratitis capitata* tem dois testículos, na forma de pequenos túbulos, medindo 0.5 mm de comprimento por 0.3 mm de diâmetro. Para a descrição da organização testicular os testículos, de machos adultos com 15 dias após a emergência do adulto foram divididos em três zonas distintas: distal (apical), mediana (intermediária), e proximal (basal) a qual comunica-se com o ducto testicular (Desenhos Esquemáticos 1 e 2).

O testículo é formado por uma parede externa e por tecido germinativo interno. A parede do testículo é constituída por duas camadas celulares de natureza diferente: as células pigmentadas, mais externas, as quais contêm inúmeros grânulos de pigmentos; e as fibras musculares, mais internas (Figs. 1, 5, 8 e 99). As células germinativas ocorrem em grupos e estão envolvidas pelas células císticas formando cistos, principal constituinte do testículo (Figs. 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Para a avaliação e comparação dos cistos existentes nos diferentes níveis, foi dada preferência a baixos aumentos, cobrindo áreas maiores. Os diversos estádios portanto, foram reconhecidos através do uso de lupa manual, quando da análise de micrografias em baixo aumento, e as características citadas podem ser visualizadas com mais detalhes em micrografias de maior aumento, colocadas posteriormente a esta descrição da organização do testículo.

As figuras 1 e 2 representam, respectivamente, a zona testicular distal do mutante “olho róseo” e do tipo selvagem da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata*. Na figura 1 observa-se um grupo de espermátides em estágio inicial de diferenciação (estádio 1). Nas espermátides jovens pode-se observar o núcleo com formato irregular, áreas de cromatina condensada e regiões nucleolares evidentes; no citoplasma encontramos grande quantidade de mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático e, em algumas células, complexo de Golgi. Lamelas anuladas estão presentes junto ao envólucro nuclear de uma das espermátides. As células que formam a parede do cisto são ricas em mitocôndrias.

Também, na zona distal do testículo de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem (Fig. 2) observam-se cistos com espermátides em estádios jovens de maturação (estádios 4 e 5). O estágio 4 foi identificado

mediante algumas características típicas desta fase. Assim, a região de flagelo da espermatíde apresenta-se com o axonema circundado por dupla membrana lisa e somente com o complexo básico 9 + 2 microtúbulos e complexo mitocondrial em alongamento, dividido em duas massas iguais, uma de cada lado do axonema e com porções de citoplasma que penetram os derivados mitocondriais em formação. O núcleo apresenta-se com áreas de cromatina condensada. O adjunto do centríolo encontra-se como um corpo eletrondenso de aspecto granular e com áreas eletrólúcidas, justaposto à região posterior do núcleo, onde se insere o flagelo.

A região flagelar de espermatídes no estágio 5 caracteriza-se pelo alongamento dos derivados mitocondriais e deposição de material eletrondenso em arranjo paracristalino no seu interior, e formação das fibras acessórias no axonema. Pode-se observar, em ambos os estádios, a existência de massas citoplasmáticas comuns entre vários flagelos do mesmo cisto.

Na zona mediana do testículo do mutante “olho róseo” observam-se grupos de espermatídes em estádios jovens de diferenciação (estádios 4 e 5) e estádios intermediários (estádios 6 e 7) (Fig. 3). No nível de corte das espermatídes no estágio 4, as células apresentam núcleo ovóide ou esferóide com áreas de cromatina condensada e poros nucleares em uma área específica do envólucro nuclear; além do adjunto do centríolo. O núcleo das células espermatídes no estágio 5 de diferenciação encontra-se no processo de alongamento com cromatina em fase inicial de compactação; ao nível do citoplasma duas membranas adjacentes ao envólucro nuclear e situadas em regiões diametralmente opostas ao núcleo começam a ser formadas. As características da região de flagelo, de ambos os estádios, foram descritas anteriormente no selvagem, e não diferem no mutante.

No estágio 6 o núcleo em alongamento apresenta concavidades laterais e cromatina em compactação, na forma de filamentos em seu interior; membranas adjacentes ao núcleo e inúmeros microtúbulos orientados longitudinalmente no citoplasma.

O núcleo de espermatíde no estágio 7 apresenta cromatina em compactação crescente, perda gradual das concavidades nucleares, enrolamento das extremidades laterais das membranas adjacentes, e conjunto de microtúbulos nas regiões citoplasmáticas perpendiculares a estas membranas.

As figuras 4 e 5 representam cortes a nível da zona mediana do testículo de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. Na figura 4 observam-se cistos com espermátides em estágio intermediário (estádio 8) e estádios adiantados (estádios 9 e 10) no processo de maturação; enquanto na figura 5, observam-se somente os estádios intermediários (estádios 6, 7 e 8) do processo de diferenciação da espermátide.

Na região de flagelo, no estágio 6 inicia-se a formação das fibras eletrondensas entre os microtúbulos do axonema. No estágio 7, observa-se uma deposição crescente de material em arranjo paracristalino nos derivados mitocondriais e o aparecimento de material eletrondenso preenchendo o par central de microtúbulos e os microtúbulos acessórios do axonema.

As espermátides no estágio 8 apresentam núcleo com cromatina em processo final de compactação, membranas adjacentes com as extremidades laterais enroladas para dentro e distantes dos bordos nucleares e microtúbulos em camadas concêntricas ao redor do núcleo. O axonema está formado e os derivados mitocondriais quase totalmente preenchidos por material em arranjo paracristalino.

No estágio 9 observa-se uma fina camada de citoplasma envolvendo o axonema e os derivados mitocondriais, enquanto no estágio 10 o citoplasma encontra-se praticamente ausente das células espermáticas e os derivados mitocondriais totalmente preenchidos por material eletrondenso.

A nível da região de cauda, nos estádios 6, 7 e 8 observam-se vários flagelos no interior de massas citoplasmáticas comuns.

Na zona proximal do testículo do mutante “olho róseo” (Fig. 6) observa-se a presença de vários cistos, ainda organizados com espermátides em estádios finais de maturação (estádio 9 e 10). Neste mesmo nível de corte encontram-se dois cistos com espermátides nos estádios 7 e 8 de diferenciação, onde vários flagelos estão situados no interior de uma massa citoplasmática comum. Observa-se ainda, um cisto onde os espermatozóides estão sendo eliminados e com a presença de massas residuais, provavelmente resultantes do conteúdo do cisto após o processo de eliminação dos espermatozóides já maduros.

Na figura 7 observa-se a região de eliminação dos espermatozoides maduros e ausência da organização em cisto do tecido germinativo do mutante “olho róseo” de *Ceratitidis capitata*. As células que formam a parede dos cistos desta região são ricas em microvilosidades onde inúmeros espermatozoides estão “ancorados”. Estas células apresentam alterações estruturais iniciando-se aparentemente o processo de destruição das mesmas.

A figura 8 mostra a mesma zona proximal do testículo em *Ceratitidis capitata*, tipo selvagem, com espermatozoides maduros em eliminação e células císticas em processo degenerativo.

## 3.2 Aspectos Ultra-Estruturais de Espermátides em Diferenciação

### 3.2.1 Estádios Iniciais

Como estádios iniciais no processo de diferenciação das espermátides estão sendo considerados os estádios 1, 2, 3, 4 e 5. Estes estádios caracterizam-se pela formação do complexo mitocondrial ou “nebenkern” e sua posterior diferenciação em derivados mitocondriais, do acrossoma, do adjunto do centríolo, além do início de formação do axonema e alongamento nuclear.

**Formação do Complexo Mitocondrial** Em espermátides no estágio 1 de diferenciação observam-se inúmeras mitocôndrias aglomeradas em um polo citoplasmático (Figs. 1 e 9). O núcleo apresenta uma forma irregular com pequenas áreas de cromatina condensada e nucléolo evidente. No citoplasma encontram-se cisternas do retículo endoplasmático.

No estágio subsequente as inúmeras mitocôndrias fundem-se formando o complexo mitocondrial (Figs. 10 e 11). Várias mitocôndrias interligam-se formando uma estrutura complexa em rede, grande e única. O núcleo nestas células é ovóide ou esferóide com áreas dispersas de cromatina condensada, e complexos de poros nucleares em áreas específicas do envólucro nuclear. No citoplasma encontram-se cisternas do retículo endoplasmático e o complexo de Golgi situado próximo ao núcleo. O axonema com nove duplas periféricas de microtúbulos circundadas por dupla membrana lisa é observado na figura 11.

A complexa estrutura em rede organiza-se, através de fusões de mitocôndrias, em uma estrutura em camadas que lembra uma “cebola”, e tem recebido esta denominação (Fig. 12). Isto é característico do estágio 3 de diferenciação da espermátide. O axonema, ainda incompleto, é circundado por dupla membrana lisa. O conjunto de cisternas do complexo de Golgi encontra-se próximo ao axonema.

Posteriormente, no estágio 4, o complexo mitocondrial divide-se em duas massas iguais, uma de cada lado do axonema e com porções citoplasmáticas que invadem os derivados mitocondriais em formação (Fig. 13). Observa-se o núcleo ovóide ou esferóide com áreas de

cromatina condensada. No citoplasma próximo ao núcleo encontra-se um grande complexo de Golgi com algumas vesículas pró-acrossômicas.

**Formação do Acrossoma** O complexo de Golgi (Figs. 13 e 14) nos estádios iniciais da espermiogênese participa ativamente no processo de formação do acrossoma. Durante este processo uma estrutura intermediária, o grânulo pró-acrossômico (Fig. 15) origina-se do complexo de Golgi. O grânulo pró-acrossômico apresenta uma eletrondensidade menor quando comparado ao acrossoma já formado (Figs. 16 e 17) que se localiza anteriormente ao núcleo. Nesta fase observam-se cisternas e vesículas Golgianas junto ao grânulo pró-acrossômico em formação.

Na figura 16 observa-se uma célula espermática no estágio 4 de diferenciação com o acrossoma em corte oblíquo e com uma localização anterior em relação ao núcleo. O acrossoma apresenta-se circundado por um complexo de dupla membrana e com diferenças na eletrondensidade do seu conteúdo, verificando-se uma maior eletrondensidade nas regiões periféricas. Na região entre o acrossoma e o núcleo da espermátide observa-se a presença de uma membrana intersticial eletrondensa.

O acrossoma quando cortado transversalmente (Figs. 17 e 18) apresenta-se como uma estrutura circular, eletrondensa, situada anteriormente ao núcleo e em oposição ao adjunto do centríolo (Fig. 18). O acrossoma está intimamente associado ao envólucro nuclear e nesta região observa-se uma eletrondensidade maior. Na região central do acrossoma o seu conteúdo apresenta-se menos eletrondenso.

**Formação do Adjunto do Centríolo** O adjunto do centríolo é formado durante os primeiros estádios da espermiogênese em *Ceratitis capitata*. Esta estrutura é observada nas espermátides como um corpo eletrondenso com áreas eletronlúcidas, justaposta à região posterior do núcleo, onde se insere o flagelo (Figs. 18 e 19). Na área de contato entre o núcleo e o adjunto do centríolo verifica-se uma descontinuidade e modificação do envólucro nuclear pela deposição de uma camada fina de material eletrondenso (Fig. 18). O adjunto do centríolo justapõe-se ao corpúsculo basal, região inicial de formação do axonema, e encontra-se circundado por microtúbulos orientados longitudinalmente no citoplasma da espermátide (Fig. 19).

No decorrer do processo da espermiogênese o adjunto do centríolo diminui de tamanho e torna-se uma estrutura bastante compacta e eletrondensa localizada entre os derivados mitocondriais na região final da cabeça e inicial da cauda da espermátide (Figs. 29 e 33).

**Formação do Axonema** No mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, assim como no tipo selvagem e na maioria dos insetos, um centríolo se transforma em corpúsculo basal do flagelo. O arranjo típico de nove grupos de microtúbulos triplos pode ser observado na região inicial do adjunto do centríolo (Fig. 19) e portanto região de inserção do axonema junto ao núcleo (Fig. 33).

A organização do axonema nos estádios jovens de maturação da espermátide em mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* não difere do padrão já descrito por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para o tipo selvagem, padrão este apresentado pela maioria dos insetos. O axonema no estágio 4 é formado somente pelo complexo básico de  $9 + 2$  microtúbulos (Figs. 2, 3 e 26), já no estágio 5 ocorre a formação dos microtúbulos acessórios (Figs. 19 e 22). Nos estádios subsequentes o axonema desenvolver-se-á conforme o padrão fundamental  $9 + 9 + 2$  microtúbulos, isto é dois microtúbulos centrais, nove duplas periféricas de microtúbulos e nove microtúbulos acessórios (Figs. 21, 23 e 29), interligados por fibras densas.

No processo de formação do conjunto axonema e derivados mitocondriais no flagelo do mutante “olho róseo” observa-se com frequência uma relativa desorganização. Derivados mitocondriais extranumerários e com características morfológicas que diferem do padrão normal podem ser observados na figura 20.

Ainda, nos estádios iniciais de diferenciação da espermátide observa-se a formação de membranas em torno do axonema (Figs. 21, 22, 23 e 24). A dupla membrana lisa que circunda o axonema parece ser formada a partir de cisternas do complexo de Golgi, conforme pode ser observado nas figuras 22, 23 e 24. Na figura 21, a dupla membrana lisa além de estar organizada em torno do axonema, encontra-se circundando os derivados mitocondriais. Esta dupla membrana delimita a cauda, separando os flagelos que se encontram em uma massa citoplasmática única e participa do processo de eliminação do excesso de conteúdo citoplasmático

da célula espermática.

O complexo de Golgi parece ter também uma participação ativa na formação de membranas que separam células espermáticas cujos núcleos encontram-se no interior de uma massa citoplasmática comum (Fig. 25).

**Diferenciação Nuclear** O núcleo da espermátide do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, nos estádios iniciais de diferenciação, passa pelo mesmo processo de transformações observadas no tipo selvagem (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983). Inicialmente, apresenta-se com uma forma irregular, com pequenas áreas de cromatina condensada e nucléolo, portanto com aspecto de um núcleo interfásico (Figs. 1 e 9). Justaposto ao envólucro nuclear, neste estádio (estádio 1), observam-se lamelas anuladas eletrondensas (Figs. 1 e 14). Estas lamelas anuladas apresentam complexos de poros simples semelhantes àqueles observados no envólucro nuclear de espermátides jovens.

Logo em seguida, no estádio 2, o núcleo adquire uma forma ovóide ou esférica com áreas dispersas de cromatina condensada (Fig. 10).

Após a formação do complexo mitocondrial e o início de formação do axonema inicia-se o alongamento do núcleo e a compactação do material cromatínico nele existente (Figs. 17 e 18). Anteriormente ao processo das transformações nucleares mais drásticas, alongamento com redução do diâmetro em dez vezes e complexa compactação da cromatina, a condensação cromatínica no núcleo das espermátides parece se desfazer com exceção dos nucléolos (Fig. 16). Nesta fase o material cromatínico apresenta-se com um aspecto granular.

Os poros nucleares são observados em áreas específicas do envólucro nuclear, em posição posterior ao acrossoma (Figs. 17 e 18), ou seja, aparentemente em região dorsal quando em corte longitudinal da espermátide (Fig. 18).

Com o início do alongamento nuclear, estágio 5, membranas adjacentes ao envólucro nuclear aparecem no citoplasma. São duas membranas por núcleo, as quais se situam em regiões diametralmente opostas. Nas regiões em que as membranas adjacentes não são encontradas observa-se a presença de microtúbulos dispostos paralelamente ao envólucro nuclear (Fig. 36).

### 3.2.2 Estádios Intermediários

Como estádios intermediários no processo de diferenciação da espermátide estão sendo considerados os estádios 6, 7 e 8. Estes estádios caracterizam-se pela progressiva compactação da cromatina nuclear e formação do flagelo com o conseqüente alongamento celular.

Nos estádios intermediários durante a espermiogênese do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* observa-se frequentemente a mistura de espermátides em diferentes estádios de maturação (Figs. 26, 27, 28 e 36), assim como a presença, no mesmo nível de corte, da região anterior da cabeça e da extremidade posterior do flagelo (Fig. 28). Esta imagem obtida difere muito do padrão encontrado no tipo selvagem.

A figura 29 mostra um conjunto de espermátides de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem onde observam-se todas as células germinativas num mesmo estágio de diferenciação, seguindo portanto um padrão de organização.

Os derivados mitocondriais em espermátides do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, nos estádios intermediários de diferenciação seguem as mesmas modificações morfofuncionais já descritas para o tipo selvagem por QUAGIO-GRASSIOTTO.

Nos estádios intermediários, durante o alongamento das espermátides, os derivados mitocondriais pareados e mantendo sempre proporções idênticas, diminuem consideravelmente de diâmetro e perdem gradualmente as cristas mitocondriais de seu interior (Figs. 21 e 34). Os corpúsculos cristalóides formados por bastões eletrondensos dispostos em arranjo hexagonal localizam-se na matriz dos derivados mitocondriais, na região adjacente ao axonema (Fig. 23 e 24). O material eletrondenso em arranjo paracristalino continua a ser acumulado preenchendo uma grande área dos derivados mitocondriais (Figs. 26, 27 e 33). Inúmeros microtúbulos

citoplasmáticos orientados paralelamente encontram-se ao redor e entre os derivados mitocondriais (Figs. 19, 27 e 33).

Conforme descrição anterior, derivados mitocondriais extranumerários podem ser observados em espermátides do mutante “olho róseo” (Fig. 20).

O adjunto do centríolo decresce de tamanho nos estádios intermediários de diferenciação da espermátide do mutante “olho róseo” seguindo o observado e descrito para o tipo selvagem. O adjunto do centríolo é observado entre os derivados mitocondriais na região final da cabeça e inicial da cauda da célula espermática (Figs. 29, 33 e 37) e apresenta-se como uma estrutura mais compacta e eletrondensa em relação aos estádios iniciais. Um conjunto de microtúbulos citoplasmáticos, longitudinalmente orientados, circundam o adjunto do centríolo (Figs. 19, 29 e 33).

O axonema nos estádios intermediários de diferenciação da espermátide do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* apresenta-se, na maioria das células, com o padrão normal de organização, descrito para a linhagem selvagem e para a maioria dos insetos (Figs. 27, 28 e 33).

No estágio 6 do processo de maturação o axonema apresenta o padrão de organização  $9 + 9 + 2$  (Fig. 27), isto é os 2 microtúbulos centrais, circundados por 9 duplas de microtúbulos periféricos e 9 microtúbulos acessórios. Os microtúbulos acessórios do axonema são formados a partir de projeções da subfibrila B das duplas periféricas de microtúbulos, ainda durante o estágio 5 (Fig. 19). Juntamente com os microtúbulos acessórios aparecem as fibras eletrondensas entre o par central e as duplas periféricas de microtúbulos (Figs. 19, 23 e 27).

Com o processo de maturação das espermátides, nos estádios subseqüentes, o axonema completa a sua formação: o par central de microtúbulos é preenchido por material eletrondenso, assim como os microtúbulos acessórios; ocorre ainda a deposição de material eletrondenso entre o par central e as duplas periféricas de microtúbulos e o aparecimento de fibras eletrondensas entre os microtúbulos acessórios (Figs. 29 e 33).

Nos estádios intermediários mais adiantados (estádios 7 e 8) verifica-se que a dupla membrana lisa que circundava o axonema, agora restringe-se somente à região entre o axonema e os derivados mitocondriais (Figs. 28, 29 e 37).

A ligação eletrondensa observada entre o axonema e os

derivados mitocondriais nos estádios iniciais (Fig. 19) persiste nos estádios intermediários (Figs. 27 e 33)

Na região caudal de células espermáticas, em estádios intermediários de diferenciação, persiste ainda a aglomeração de inúmeros flagelos no interior de uma massa citoplasmática comum (Figs. 5, 7, 20, 27 e 28).

Nas espermátides do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* foram observados, no estágio 6 de diferenciação, axonemas com todos os seus elementos tubulares, porém distribuídos de forma desorganizada (Fig. 20 e 34), o que é desconhecido no tipo selvagem.

Nos estádios intermediários do processo de maturação de espermátides do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* as transformações nucleares seguem os padrões descritos para o tipo selvagem por QUAGGIO-GRASSIOTTO (1983), na maioria das células da linhagem germinativa.

A formação das concavidades em dois lados diametralmente opostos do núcleo, onde são encontradas as membranas adjacentes (Figs. 25, 26, 30 e 36) caracterizam o núcleo de espermátides no estágio 6 de diferenciação. Nas regiões em que as membranas adjacentes ao núcleo estão ausentes, uma fileira única de microtúbulos citoplasmáticos orientados paralelamente ao envólucro nuclear é observada (Fig. 36). Concomitantemente com o alongamento do núcleo aumenta a camada de material cromatínico depositado junto a face interna da membrana nuclear interna, enquanto que na região central a cromatina encontra-se na forma de finas fibrilas (Fig. 25).

Com o processo de maturação da célula espermática as concavidades laterais do núcleo tornam-se menos acentuadas, até tornarem-se pouco perceptíveis, caracterizando o estágio 7 (Figs. 31, 33 e 37). Nesta fase observam-se densos grumos de cromatina compactada no interior do núcleo. O processo de eliminação de excesso do nucleoplasma e do envólucro nuclear determina o aparecimento de uma protuberância na região posterior do núcleo e inicial do flagelo, denominada bulbo nuclear. Este caracteriza-se por conter em seu interior material de baixa densidade eletrônica (Figs. 29 e 37). As membranas adjacentes afastam-se progressivamente do núcleo e suas extremidades laterais enrolam-se para dentro como um pergaminho (Figs. 31, 32, 33 e 37). Estas membranas adjacentes acompanham o núcleo

desde sua extremidade anterior na qual se insere o acrossoma (Fig. 29) até sua extremidade posterior onde se inicia o flagelo (Figs. 29, 33 e 37). Uma fileira única de microtúbulos aparece margeando as regiões do envólucro nuclear perpendiculares às membranas adjacentes (Figs. 33 e 37). Na região do bulbo nuclear os microtúbulos citoplasmáticos estão ausentes (Fig. 37).

Em uma fase posterior, estágio 8, a cromatina encontra-se bem compactada e em corte transversal tem-se um núcleo com contorno circular (Figs. 28, 29, 32, 37 e 38). As membranas adjacentes encontram-se então, ainda mais afastadas do núcleo (Figs. 29, 32, 37 e 38). Observa-se que um conjunto de microtúbulos citoplasmáticos margeam o núcleo (Figs. 28, 29 e 38). Estes microtúbulos encontram-se paralelos ao núcleo no eixo de alongamento da célula espermática.

Nos estádios intermediários da espermiogênese de *Ceratitis capitata* observam-se também, a nível da região nuclear, inúmeros núcleos no interior de uma massa citoplasmática comum (Figs. 30, 31 e 32).

Nas figuras 21 e 28 observam-se núcleos de espermátides cuja compactação da cromatina está alterada, em relação ao estágio de maturação em que as células se encontram, fenômeno aparentemente frequente no processo da espermiogênese do mutante "olho róseo". Ainda, relativo às alterações no processo de compactação da cromatina em mutante, na figura 33 duas células espermáticas apresentam um corpúsculo altamente eletrondenso no interior do núcleo.

No processo da espermiogênese do mutante "olho róseo" o envólucro nuclear não é distinguível em determinadas regiões nucleares (Fig. 33), especialmente nas áreas em que estão faltando os microtúbulos citoplasmáticos.

Na figura 35 vários flagelos formados pelo conjunto axonema e dois derivados mitocondriais encontram-se destituídos da membrana plasmática. Porém, alguns flagelos agrupados apresentam a membrana plasmática e observa-se ainda, a presença de uma estrutura lembrando figura mielínica, provavelmente formada pelos resíduos de membranas e conteúdo citoplasmático resultantes do processo de diferenciação das células espermáticas.

Aglomerados de espermátides em diferentes estádios de maturação parecem resultar de um processo degenerativo das células que formam a parede dos cistos, conforme pode ser verificado nas figuras 36, 37

e 38. Restos de membranas provenientes de células que formam a parede dos cistos são observadas entre grupos de espermatídes que se encontram em sua maioria nos estádios intermediários de diferenciação (Figs. 36 e 37). Estes grupos de células espermáticas provavelmente constituíam cistos independentes.

### 3.2.3 Estádios Finais

Como estádios finais do processo da espermiogênese estão sendo considerados os estádios 9 e 10. Estes estádios caracterizam-se pela eliminação do excesso do conteúdo citoplasmático, tendo-se no final uma célula espermática madura, espermatozóide, apta ao processo de fertilização do óvulo.

As células espermáticas, nestes estádios finais, apresentam o material nuclear altamente compactado (Figs. 39, 41 e 44), citoplasma praticamente ausente, derivados mitocondriais totalmente preenchidos por material eletrondenso e o axonema com todos os seus componentes tubulares (Figs. 40, 42 e 43).

Nos estádios finais o mutante “olho róseo” de *Ceratitís capitata* apresenta cistos com um número de espermatozoides considerado normal (Fig. 39), porém aparentemente em uma frequência bem menor que a observada no tipo selvagem (Fig. 41). Este cisto do mutante apresenta um número de aproximadamente 249 células espermáticas, portanto muito próximo da quantidade teoricamente esperada, a qual seria de 256 células por cistos, ou seja  $2^n$  sendo  $n = 8$ . As células que formam a parede dos cistos organizados apresentam-se morfolologicamente normais e ricas em mitocôndrias (Figs. 39 e 42).

A figura 40 mostra a região final da cauda de espermatozoides onde observa-se a terminalização dos derivados mitocondriais na maioria dos flagelos, e em alguns, a presença do axonema sozinho conservando o padrão de organização dos componentes tubulares.

No mutante “olho róseo” de *Ceratitís capitata* frequentemente encontram-se em cistos organizados, células espermáticas em estádios de diferenciação atrasados em relação à maioria das células da linhagem germinativa (Fig. 42). Nestes cistos verifica-se também a presença de uma grande quantidade de membranas entre as células espermáticas. No final

da espermiogênese do mutante “olho róseo” observou-se também a presença de cistos organizados com um pequeno número de células espermáticas e uma possível fusão das células císticas (Fig. 43).

No término do processo da espermiogênese tem-se um conjunto de espermatozóides maduros no interior de cistos organizados. Os feixes de espermatozóides passam a ser eliminados e concomitantemente parece haver um processo degenerativo a nível das células que formam a parede dos cistos, resultando assim na desorganização do conjunto (Figs. 44, 45, 47 e 48). Inúmeras estruturas lembrando figuras mielínicas estão presentes nesta fase (Figs. 44, 45 e 47).

Na figura 46 observa-se o conteúdo citoplasmático de uma célula que forma a parede de um cisto do mutante “olho róseo” de *Ceratitís capitata* em processo degenerativo bastante adiantado. Os espermatozóides encontram-se espalhados de forma desorganizada e cortados em diferentes ângulos indicando uma distribuição espacial aleatória dos mesmos.

Em *Ceratitís capitata*, tipo selvagem, a desorganização no momento da eliminação das células maduras parece ser menor (Figs. 47 e 48). Na figura 48 tem-se um cisto cujos espermatozóides estão sendo eliminados e outro em que a organização das células espermáticas faz-se presente. O conteúdo das células que formam a parede dos cistos apresenta-se morfológicamente alterada, já em processo degenerativo, característico da fase de eliminação dos espermatozóides do interior do cisto. Na figura 47 o grau de desorganização é maior, que no cisto da figura 48, pois observam-se células maduras sendo eliminadas junto a um conjunto de espermátides que se encontram no estágio 9 de diferenciação, com vários flagelos em massas citoplasmáticas comuns. Porém, o fenômeno verificado nesta figura apresenta-se com baixa frequência no tipo selvagem e este grau de desorganização difere do verificado no mutante “olho róseo” (Figs. 26, 27, 28 e 45).

No mutante “olho róseo” a ocorrência de cistos completamente desorganizados é elevada, sendo frequente a aglomeração de espermátides em diferentes estádios de diferenciação (Figs. 26, 27, 28, 36 e 37) e a distribuição espacial desorientada das células germinativas (Figs. 36, 38 e 45) resultante da não permanência dos espermatozóides em feixes no interior do cisto.

Após a eliminação dos espermatozóides maduros, do interior do cisto, observa-se a presença de uma massa residual muito rica em estruturas lembrando figuras mielínicas e vesículas lisossômicas (Figs. 49 e 50). Esta massa residual provavelmente é o conteúdo resultante do processo degenerativo pelo qual passam as células císticas durante a eliminação dos espermatozóides.

### 3.2.4 Ultra-Estrutura do Espermatozóide na Espermateca

O processamento das espermatecas para o estudo da ultra-estrutura ofereceu inúmeras dificuldades, conforme já mencionado por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983). O material dos inúmeros cortes obtidos apresentava-se pobremente preservado e portanto com a qualidade comprometida.

Os espermatozóides presentes no interior das espermatecas da fêmea (Figs. 52, 55 e 56) não apresentaram diferenças morfológicas de sua estrutura básica em relação às observações realizadas nos espermatozóides dos testículos do macho. Ainda, no material analisado, verificou-se a não existência de diferenças morfológicas entre os espermatozóides encontrados no interior das espermatecas de fêmeas do tipo selvagem e do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, conforme figuras 52 e 56, respectivamente.

Na figura 51 observa-se corte de uma espermateca sem espermatozóides; em seu interior encontra-se um material tubular. Este material tubular localiza-se no espaço entre os espermatozóides quando estes estão presentes no interior da espermateca (Figs. 52, 53, 55 e 56).

A massa de espermatozóides não está junto à camada de quitina da parede da espermateca na figura 53; a mesma encontra-se isolada no interior do órgão, indicando que já foi eliminado parte dos espermatozóides da espermateca, provavelmente utilizados no processo de fertilização dos óvulos. Por outro lado, na figura 55, observa-se uma maior proximidade da massa de espermatozóides junto à camada de quitina.

Quando da presença de inúmeros espermatozóides no interior da espermateca observa-se que os mesmos estão envolvidos por um material tubular, cujo diâmetro, de aproximadamente 30 nm, é bem maior do que o diâmetro dos microtúbulos do axonema, componente do flagelo

(Figs. 52 e 56). No momento em que a maioria dos espermatozóides foram eliminados para serem utilizados no processo de fertilização verifica-se que os poucos espermatozóides que permanecem no interior da espermateca encontram-se envolvidos por material fibrilar (Fig. 54).

### 3.3 Estudo Citoquímico para Fosfatase Ácida no Processo de Espermiogênese de *Ceratitis capitata*

O estudo da reação citoquímica para fosfatase ácida nos métodos utilizados GÖMÖRI, 1952 — apud ESSNER, 1973 e BARKA & ANDERSON, 1962 — apud ESSNER 1973) envolve a incubação do material em um meio contendo  $\beta$ -glicerofosfato de sódio como substrato e na presença de nitrato de chumbo. As enzimas liberam fosfato do substrato e dessa forma um precipitado insolúvel de fosfato de chumbo, bastante eletrondenso será formado no sítio da atividade enzimática.

O material para controle foi incubado em um meio sem a presença do substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio.

As células espermáticas, assim como as células que formam a parte dos cistos da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e do mutante “olho róseo” demonstraram a atividade fosfatásica ácida em várias estruturas celulares.

O método descrito por GÖMÖRI, 1952 - apud ESSNER, 1973 ofereceu inúmeras dificuldades para a obtenção de cortes ultra-finos, o material apresenta-se pobremente preservado e portanto com sua qualidade comprometida. Observa-se ainda a presença de precipitados bastante grosseiros (Fig. 57) quando comparados com o método descrito por BARKA & ANDERSON, 1962 - apud ESSNER, 1973 (Fig. 74).

Em função destas observações o método eleito para o estudo da reação citoquímica para a fosfatase ácida na diferenciação das espermátides durante o processo da espermiogênese em *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e o mutante “olho róseo” foi o descrito por BARKA & ANDERSON, 1962 - apud ESSNER, 1973 com algumas modificações conforme já mencionado em materiais e métodos.

No processamento da reação citoquímica para fosfatase ácida duas variações foram efetivadas no método descrito por BARKA & ANDERSON. A primeira refere-se ao tempo de fixação em glutaraldeído, onde utilizou-se uma amostra com 30 minutos de fixação e a outra com 2 horas. Do material analisado observou-se que com 2 horas de fixação tínhamos uma melhor preservação das estruturas celulares, porém parece haver uma diminuição na quantidade do produto da reação nos sítios de atividade enzimática (Figs. 62, 75 e 85).

A segunda variação estabelecida foi quanto à temperatura em que se processou a incubação do material, uma amostra foi incubada a 37°C e a outra à temperatura ambiente. Do material analisado observou-se que as células espermáticas e císticas, de testículos cuja incubação foi efetivada a 37°C apresentaram frequência e quantidade maior do produto de reação nos sítios de atividade enzimática (Figs. 58, 60, 61, 66, 71, 72, 74 e 86).

Em espermátides nos estádios iniciais de diferenciação observa-se a presença de um fino precipitado resultante da atividade enzimática no material nuclear, principalmente junto às regiões de cromatina mais compactada (Figs. 58, 59, 60, 61 e 62). A nível de nucléolo o produto da reação enzimática parece restringir-se às regiões periféricas (Figs. 59 e 61).

Nos núcleos de espermátides nos estádios iniciais de diferenciação, visualizados em cortes ultra-finos obtidos de testículos submetidos ao meio de incubação sem a presença do substrato, verifica-se a ausência de depósitos de fosfato de chumbo (Figs. 64 e 65).

No complexo de Golgi, estrutura celular da qual origina-se o acrossoma durante os estádios iniciais de diferenciação da espermátide, observa-se a formação de precipitados de fosfato de chumbo. Nas figuras 59 e 60 estes precipitados estão presentes nas cisternas do complexo de Golgi e na figura 58 em vesículas Golgianas. Nos controles para a reação enzimática nenhum produto da reação enzimática está presente nas cisternas e vesículas Golgianas (Figs. 64 e 80).

O produto da reação enzimática é também encontrado nas vesículas pró-acrossômicas (Figs. 60 e 61). Nestas vesículas a reação é bastante intensa, o que indica a presença de uma grande quantidade de sítios da atividade enzimática.

No acrossoma em fase adiantada de formação, nos estádios 4 e 5 de diferenciação da espermátide, observam-se pequenas áreas onde precipitados da reação enzimática fazem-se presentes (Figs. 60 e 62), o que provavelmente indica, já nestes estádios, uma inatividade de inúmeras enzimas acrossomais, as quais se tornarão ativas novamente somente durante o processo de fecundação dos óvulos. Em estádios intermediários do processo da espermiogênese o acrossoma não apresenta nenhum produto da reação enzimática (Fig. 63) parecendo-se com o controle (Fig. 65) para o

qual não foi fornecido o substrato.

Nestes estádios iniciais de diferenciação da espermatíde não foi observado nenhuma reação enzimática na região do flagelo. Portanto, parece não existir nenhuma atividade fosfatásica ácida no axonema e complexo mitocondrial em formação.

Em espermatídes no estádio 6 de diferenciação observam-se depósitos de fosfato de chumbo em núcleos, estes encontram-se nas regiões de cromatina compactada junto ao envólucro nuclear e aparentemente com menor intensidade nas regiões mais centrais do núcleo, onde a cromatina ainda encontra-se bastante frouxa (Fig. 66). Verifica-se que os precipitados resultantes da reação enzimática estão presentes em núcleos de algumas espermatídes e ausentes em núcleos de outras espermatídes de um mesmo cisto.

No núcleo de espermatídes no estádio 7 de maturação observam-se depósitos de fosfato de chumbo em volta das massas cromatínicas mais compactadas (Fig. 67). Na figura 68 tem-se núcleos com grandes áreas de cromatina bastante condensada e observa-se que o produto da reação enzimática está presente em volta destas áreas e distribuído na região em que a cromatina ainda encontra-se frouxa. Nos estádios em que a cromatina encontra-se totalmente compactada (estádios 8, 9 e 10) verifica-se a ausência do produto da reação junto ao material nuclear (Figs. 63, 69 e 70).

Nos estádios em que o alongamento celular é bastante evidente (estádios 6 e 7) nos quais ocorre uma drástica diminuição do volume nuclear observam-se densos precipitados resultantes da atividade enzimática no envólucro nuclear (Figs. 67, 68 e 72). O produto da reação enzimática está ainda presente no envólucro nuclear em estádios finais de diferenciação da espermatíde (Figs. 69 e 70). Estes precipitados parecem estar localizados especificamente no espaço perinuclear existente entre as membranas nucleares externa e interna.

Nos controles da reação citoquímica para fosfatase ácida não são observados depósitos de fosfato de chumbo no material nuclear e envólucro nuclear (Fig. 73).

Foi observada, em espermatídes do mutante "olho róseo" que se encontravam em estádios intermediários de diferenciação, mais especificamente no estádio 6, a presença de lisossomos no citoplasma com

depósitos de fosfato de chumbo (Figs. 71 e 72).

Na região de flagelo da célula espermática de *Ceratitís capitata* em estádios intermediários e finais do processo de maturação o produto da reação enzimática é observado no axonema, nos derivados mitocondriais e na dupla membrana lisa que circunda o axonema.

Os depósitos de fosfato de chumbo no axonema localizam-se especificamente nas fibras eletrondensas entre o par central e as nove duplas periféricas de microtúbulos e nas fibras eletrondensas encontradas entre os microtúbulos acessórios (Figs. 57, 74, 75 e 76). Portanto a reação enzimática para fosfatase ácida passa a ser detectada no axonema somente após o estágio 6 de maturação da espermátide, pois neste estágio ocorre o aparecimento das fibras eletrondensas entre os microtúbulos que formam o modelo básico  $9 + 9 + 2$  do axonema. A presença do produto da reação enzimática não se estende a todos os axonemas dos flagelos de um cisto (Figs. 79 e 91). Outro aspecto evidente é quanto à intensidade da reação nos elementos do axonema, esta difere de um axonema para outro (Figs. 74, 77 e 79). Verifica-se ainda, diferenças de intensidade nas próprias fibras eletrondensas do mesmo axonema. A reação parece ser mais intensa nas fibras eletrondensas localizadas entre o par central e as nove duplas periféricas de microtúbulos (Figs. 74, 75, 76 e 77).

Nos derivados mitocondriais em estádios intermediários e finais de diferenciação da espermátide, mais especificamente nas fases de grande diminuição do volume e alongamento desta estrutura observa-se a presença de depósitos de fosfato de chumbo nas regiões periféricas dos derivados mitocondriais, ou seja circundando a região eletrondensa do material em arranjo paracristalino (Figs. 69, 70 e 77).

A dupla membrana lisa que circunda o axonema nos estádios jovens de maturação e que com o amadurecimento da espermátide aparentemente desintegra-se, apresenta precipitados de fosfato de chumbo resultantes da atividade enzimática (Figs. 69 e 77). Na figura 77 observa-se ainda, que nas membranas lisas e duplas, que envolvem quase por completo o conjunto formado pelos derivados mitocondriais e axonema, e ocasionalmente se estendem no citoplasma, o produto da reação enzimática também está presente.

Nos controles da reação enzimática para fosfatase ácida observa-se a ausência de depósitos de fosfato de chumbo nos elementos do

axonema, nos derivados mitocondriais e na dupla membrana lisa (Figs. 80, 81 e 82).

O produto da reação enzimática fosfatásica ácida localiza-se em sítios específicos de estruturas celulares das espermátides em diferenciação, conforme descrito anteriormente. Porém, em determinadas células espermáticas observa-se a presença de depósitos de fosfato de chumbo em todo o conteúdo citoplasmático (Figs. 63 e 78) sugerindo que estas células encontram-se em processo degenerativo.

Foi observado ainda, a presença do produto da reação enzimática fosfatásica ácida em estruturas das células que formam a parede dos cistos. Os núcleos destas células apresentam depósitos de fosfato de chumbo nas regiões de cromatina mais compactada, especialmente na cromatina que se encontra junto à face interna da membrana interna do envólucro nuclear (Figs. 59 e 88). Os lisossomos das células que formam a parede dos cistos contêm depósitos bastante eletrondensos de fosfato de chumbo (Figs. 58, 79, 83, 87 e 91) indicando uma intensa atividade enzimática fosfatásica ácida no interior desta organela citoplasmática.

Em células que formam a parede de cisto organizado, do controle da reação enzimática para fosfatase ácida, depósitos de fosfato de chumbo estão ausentes (Fig. 84).

As membranas residuais de células císticas em processo degenerativo encontradas entre conjuntos de espermátides em diferentes estádios de maturação, frequentes no mutante "olho róseo", apresentam depósitos de fosfato de chumbo em grande quantidade (Figs. 85 e 86). Esta degeneração de células císticas é verificada principalmente, em cistos cujas espermátides encontram-se nos estádios intermediários de diferenciação.

Na fase de eliminação dos espermatozóides do interior do cisto observa-se a presença de inúmeros lisossomos com densos depósitos de fosfato de chumbo (Figs. 89 e 90).

No controle o produto da reação enzimática está ausente do cisto cujos espermatozóides estão sendo eliminados (Fig. 92).

### 3.4 Estudo Citoquímico para Arilsulfatase no Processo da Espermiogênese de *Ceratitis capitata*

O estudo da reação citoquímica para arilsulfatase no método utilizado (HOPSU-HAVU *et alii*, 1967) envolve a incubação do material, testículos de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e do mutante “olho róseo”, em um meio contendo *p*-nitrocatecol sulfato como substrato e na presença de cloreto de bário. As enzimas liberam sulfato do substrato e dessa forma um precipitado insolúvel e eletrondenso de sulfato de bário será formado no sítio da atividade enzimática.

O material para o controle foi incubado em um meio sem a presença do substrato, *p*-nitrocatecol sulfato.

O método descrito por HOPSU-HAVU *et alii* (1967) ofereceu inúmeras dificuldades para a obtenção de cortes ultra-finos, o material apresentava-se pobremente preservado e portanto com a qualidade comprometida. Dos inúmeros cortes feitos, poucos negativos foram obtidos e destes alguns foram selecionados pelas informações fornecidas e não total comprometimento na qualidade da micrografia.

Em espermátides nos estádios iniciais de diferenciação observam-se vesículas lisossômicas com o produto da reação enzimática (Fig. 96). A atividade enzimática arilsulfatase ocorre preferencialmente em lisossomos. Na figura 96 verifica-se ainda, a presença de figuras mielínicas com precipitados resultantes da atividade enzimática. As estruturas lembrando figuras mielínicas são restos celulares do processo de diferenciação das espermátides que estão sendo destruídos pela ação de enzimas, o que indica o provável envolvimento da arilsulfatase neste processo.

Flagelos de espermátides nos estádios intermediários de maturação não apresentam produtos da reação enzimática arilsulfatase em seus componentes característicos, axonema e derivados mitocondriais.

Densos precipitados de sulfato de bário são localizados nas cisternas do complexo de Golgi (Figs. 93 e 94) indicando a atividade enzimática nesta organela.

Corpúsculos multivesiculares encontrados no interior de algumas espermátides também apresentam o produto da reação enzimática (Fig. 93). Estes corpúsculos parecem estar envolvidos no processo de eliminação dos resíduos celulares resultantes da diferenciação da espermátide.

A presença de precipitados de sulfato de bário junto à membrana plasmática de espermatídes no estágio 8 de diferenciação é observada nas figuras 93 e 94.

No controle para a atividade enzimática arilsulfatase, nenhum precipitado de sulfato de bário está presente na região mediana da cauda da espermatíde (Fig. 95) onde inúmeros flagelos ainda encontram-se no interior de uma massa citoplasmática comum.

No mutante “olho róseo” observaram-se células espermatícas em fase final de diferenciação com núcleos circundados por uma grande massa citoplasmática e ainda, núcleos com padrão anormal de compactação cromatínica. Os pontos de adesão existentes entre algumas células espermatícas apresentam-se bastante eletrondensas, indicando a provável presença de precipitados de sulfato de bário (Fig. 97).

Nas células que formam a parede dos cistos, depósitos de sulfato de bário são observados nos lisossomos, enquanto que em acrossoma de espermatozóides o produto de reação está ausente (Fig. 98), indicando novamente a preferencial atividade enzimática arilsulfatase por lisossomos com enzimas ativas.

Na fase de eliminação dos espermatozóides uma massa residual permanece no local do cisto; inúmeras vesículas lisossômicas e estruturas lembrando figuras mielínicas fazem parte desta massa residual. Com a reação enzimática para arilsulfatase observa-se que estas estruturas apresentam densos depósitos de sulfato de bário (Fig. 99).

## 4 DISCUSSÃO

O processo da espermiogênese no mutante “olho róseo” da mosca-da-fruta *Ceratitis capitata*, é similar à espermiogênese do tipo selvagem descrita por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) e a de outros insetos (STANLEY *et alii*, 1972; SZÖLLÖSI, 1975); porém difere em alguns aspectos, os quais serão discutidos.

Entre as diferenças observadas constatamos uma defasagem no processo da espermiogênese do mutante em relação ao selvagem, a qual é enfatizada no estudo da organização testicular. Durante o processo de citodiferenciação da célula espermática no mutante observa-se: a formação de derivados mitocondriais extranumerários, a desorganização na distribuição dos componentes do axonema, ausência ou destruição parcial da membrana plasmática, e um padrão anormal de condensação da cromatina. Ainda, a degeneração das células císticas é bastante frequente com a conseqüente desorganização dos cistos. Estes aspectos levam a uma redução no número de células espermáticas por cisto neste mutante.

Entretanto, em outros aspectos, a citodiferenciação da espermátide no mutante não difere da apresentada pelo selvagem, tais como: a formação do complexo mitocondrial, do acrossomo e do centríolo; a seqüência de formação do axonema e a diferenciação nuclear. A ultraestrutura de espermatozóides armazenados na espermateca de fêmeas mutantes também não difere da apresentada nas fêmeas selvagens. As reações citoquímicas fosfatásica ácida e arilsulfatase não diferem nas células germinativas e císticas normais entre o selvagem e o mutante.

## 4.1 Organização Testicular

Em *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, assim como no mutante “olho róseo” os aspectos ultra-estruturais da parede do testículo por nós observados são os mesmos descritos por BAIRATI (1967) para *Drosophila melanogaster*. A parede externa do testículo é formada por dois tipos de tecidos distintos, uma camada de células pigmentadas e uma camada muscular, as quais apresentam funções específicas. As células pigmentadas formam uma barreira testicular protegendo o órgão, e as células musculares parecem contribuir de forma significativa no deslocamento dos feixes de células espermáticas e a posterior eliminação dos espermatozóides maduros do interior do testículo.

No interior dos testículos encontra-se o tecido germinativo, o qual é constituído por células germinativas organizadas em grupos com um número fixo de elementos, característico para cada espécie, os quais se mantêm em um estado sincicial; estas são envolvidas por células somáticas formando o cisto, o qual é considerado, por BAIRATI como uma unidade supracelular do tecido germinativo.

TOKUYASU e colaboradores (1972a e 1972b) também descrevem a organização do tecido germinativo no interior do testículo de *Drosophila*, em cistos. A mesma observação foi realizada por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) quando da análise e descrição do processo da espermiogênese da linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*. No mutante “olho róseo” a presença do cisto como principal elemento constituinte do testículo é também uma característica com papel importante no processo da espermiogênese.

Na linhagem selvagem, QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) observou a presença de cistos com um número de espermatozóides maduros inferior àquele teoricamente esperado, ou seja, 256 células espermáticas por cisto, seguindo a razão  $2^n$ , sendo  $n = 8$ . Provavelmente, a eliminação de células possivelmente inviáveis, devido a alterações morfofuncionais, estabelece esta diferença entre o número de células teoricamente esperado por cisto e o número de células efetivamente observado.

No mutante X/0 de *Drosophila melanogaster* KIEFER (1966) descreve a presença de cistos com um número inferior de espermatozóides, em relação ao teoricamente esperado. O mesmo fenômeno

foi observado por ANDERSON (1967) na espermiogênese de *Drosophila melanogaster* submetida a temperaturas elevadas.

No mutante “olho róseo” observamos com frequência cistos com um número de espermatozóides muito aquém do teoricamente esperado. Este fenômeno pode ser devido ao grande número de células germinativas com alterações morfofuncionais, as quais provavelmente são destruídas, pois apresentam-se inviáveis ao processo de fertilização. Ou ainda, estes pequenos conjuntos de espermatozóides agrupados podem ser resultantes da reorganização do conteúdo de um cisto, devido à degeneração das células císticas e à consequente eliminação de inúmeras células em processo de diferenciação.

Evolutivamente parece haver uma tendência na redução do número de espermatozóides nos insetos; pois ordens mais antigas têm um número maior de espermatozóides por cisto que as ordens mais modernas, e no interior de uma ordem os grupos mais modernos ou especializados tendem a ter um número menor de espermatozóides. O decréscimo no número de espermatozóides por cisto parece ter um valor adaptativo para a especialização da população (VIRKKI, 1969).

Em *Ceratitis capitata*, assim como foi descrito para *Drosophila melanogaster* por BAIRATI (1967), pelas características ultra-estruturais do tecido germinativo, o testículo pode ser dividido em três (03) zonas distintas: apical, intermediária e terminal. Esta mesma divisão foi seguida também por TOKUYASU e colaboradores (1972a e 1972b), quando do estudo da dinâmica da espermiogênese em *Drosophila* nos processo de individualização das células espermáticas e helicoidização dos feixes de espermatozóides.

No mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, na zona apical do testículo de insetos adultos, cistos com espermátides em estádios bem iniciais de diferenciação foram encontrados; já nos machos adultos da linhagem selvagem na zona apical observam-se espermátides nos estádios iniciais de maturação, porém bem mais diferenciados. Com isto cremos que nesta zona testicular, de insetos adultos, já se iniciam os eventos de diferenciação da espermátide. As modificações mais drásticas, em termos de alongamento e diminuição do volume celular ocorrem na zona intermediária, onde se encontram espermátides nos estádios intermediários (estádios 6, 7 e 8) de maturação. Espermátides nos estádios finais (estádios 9 e 10)

de maturação e cistos com espermatozóides maduros são característicos da zona proximal do testículo de *Ceratitis capitata*; ainda nesta zona constata-se o processo de degeneração das células que formam a parede dos cistos com a conseqüente desorganização dos mesmos e eliminação dos espermatozóides maduros, permanecendo as massas residuais.

Portanto, a divisão do testículo de *Ceratitis capitata* em três zonas segue as características ultra-estruturais do tecido germinativo, sendo estas bastante distintas. Pode-se verificar a existência de uma pequena defasagem no processo da espermiogênese entre o mutante “olho róseo” e o tipo selvagem, quando compararmos as três zonas testiculares entre machos adultos com a mesma idade, dos respectivos tipos de mosca; conforme podemos observar comparando os Desenhos Esquemáticos 1 e 2, referentes à organização testicular. Parece haver uma maior rapidez do processo nos machos tipo selvagem, pois na zona intermediária a frequência de cistos com espermátides em estádios finais de maturação é bastante elevada; por outro lado, no mutante, na zona proximal, constata-se a presença de inúmeros cistos com espermátides ainda nos estádios intermediários de diferenciação. Esta defasagem no processo da espermiogênese poderia estar relacionada a alterações hormonais que afetam o desenvolvimento do testículo. Esta hipótese explicaria ainda, a cópula demorada, o que resulta na capacidade de inseminação bastante reduzida do mutante “olho róseo”.

A forma e o tamanho do cisto dependem do grau de maturação das células germinativas que se encontram no seu interior. Cistos com espermátides jovens são grandes e com uma forma aproximadamente esferóide, característicos da zona distal do testículo. Os cistos com espermátides em estádios intermediários e finais de diferenciação apresentam-se menores e com uma forma mais cilíndrica, caracterizando as zonas intermediária e proximal do testículo. Estas observações já haviam sido descritas por BAIRATI para *Drosophila* e foram por nós constatadas em *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e no mutante “olho róseo”.

TOKUYASU e colaboradores (1972a) ao analisarem o processo de individualização das células espermáticas na espermiogênese de *Drosophila melanogaster* observaram que a maior concentração de cistos encontra-se na zona intermediária do testículo. Em *Ceratitis* pode-se definir também, que a maior concentração do número de cistos ocorre na zona intermediária; este aspecto pode ser explicado pela presença, nesta

zona, de células espermáticas que estão passando por grandes modificações morfofuncionais tendo como consequência o alongamento da célula e a diminuição do volume da mesma; o que leva o conjunto do cisto a ocupar um espaço menor. Na zona proximal o cisto ocupa um espaço ainda menor, pois as células espermáticas encontram-se na fase final de diferenciação, apresentando um volume citoplasmático bastante reduzido. Nesta zona porém, observa-se a degeneração das células císticas com a consequente desorganização dos cistos e eliminação dos espermatozóides maduros, com isto o número de cistos ainda perfeitamente estruturados é menor quando esta zona é comparada com a zona intermediária.

Nos estádios jovens de diferenciação as espermátides, no interior do cisto, encontram-se em um estado sincicial. TOKUYASU e colaboradores (1972b) descreveram para *Drosophila*, que, o processo morfogenético que transforma as espermátides de um estado sincicial, para um estado no qual cada espermátide está envolvido em sua própria membrana, é iniciada na região da cabeça do feixe de espermátide e atravessa todo o seu comprimento, no testículo. Este processo não somente elimina as pontes sinciciais entre as espermátides, como também, remove organelas desnecessárias e o excesso da membrana nuclear, do nucleoplasma e do citoplasma.

Semelhante ao descrito por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para *Ceratitis capitata* tipo selvagem, também no mutante “olho róseo”, as células espermáticas aparecem fundidas na região da cauda em um extenso sincício, separando-se nas fases finais de maturação. Observamos ainda, a fusão citoplasmática na região da cabeça de espermátides em estádios intermediários (estádios 6 a 8) de diferenciação, formando um grande sincício.

Pelas observações, por nós realizadas e pelas colocações dos autores supra citados, cremos que as pontes representam características de fases específicas da espermiogênese dos insetos em discussão. Estas pontes poderiam facilitar a difusão de substâncias que exercem o controle da diferenciação sincrônica conforme a descrição, de FAWCETT e colaboradores (1959). Ainda, segundo STANLEY e colaboradores (1972), seriam mecanismos para a distribuição uniforme de nutrientes e a eliminação de produtos residuais acumulados.

Relacionado com a organização testicular, observamos que na zona proximal do testículo de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, não mais se encontram espermátides em estado sincicial, portanto nos estádios finais de diferenciação as células espermáticas já se apresentam individualizadas. No mutante “olho róseo”, em função da defasagem verificada no processo da espermiogênese, observa-se nesta zona a presença de alguns cistos com espermátides em estádios intermediários de diferenciação, as quais encontram-se ainda, no interior de massas citoplasmáticas comuns.

A fusão citoplasmática na região da cabeça, da célula espermática, é mais difícil de ser observada, conforme relatos anteriores de TOKUYASU e colaboradores. Cremos que esta dificuldade esteja relacionada com o comprimento da região da cabeça; esta, sendo menor, apresentará pontes citoplasmáticas menos extensas e em menor número. A cauda, com um comprimento bem maior, terá pontes citoplasmáticas mais largas e em maior número, conseqüentemente a probabilidade de visualização em cortes ultrafinos será elevada.

A organização das espermátides no interior de cistos nos diferentes estádios de maturação permitiu o estabelecimento de uma sequência de eventos que ocorrem durante o processo de diferenciação da célula espermática, facilitando portanto a análise e descrição do processo da espermiogênese.

## 4.2 Citodiferenciação das Espermátides

No processo de diferenciação das espermátides, aspectos ultra-estruturais da formação do complexo mitocondrial e posterior diferenciação do mesmo em derivados mitocondriais, da formação do acrossoma e do adjunto do centríolo, da organização do axonema, das transformações nucleares, das células císticas e da organização dos cistos serão levados em consideração.

### 4.2.1 Formação do Complexo Mitocondrial

A formação do complexo mitocondrial no mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* e sua posterior transformação nos derivados mitocondriais são similares ao processo descrito por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para a mosca tipo selvagem e o encontrado em outros insetos e previamente descritos e comparados em extensas revisões por PHILLIPS (1970a) e BACCETTI (1972).

Em nosso estudo observamos a formação do complexo mitocondrial e passaremos a enfatizar sua ultra-estrutura no estágio 3 de diferenciação da espermátide, uma vez que o mesmo não havia sido observado por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983). O complexo mitocondrial neste estágio apresenta-se com formato de “cebola”, ou seja, um conjunto de camadas concêntricas de duplas membranas com cristas mitocondriais evidentes; aspectos morfológicos estes descritos anteriormente por TOKUYAZU (1975b) para *Drosophila melanogaster*. Porém, em *Ceratitis capitata* o número de camadas concêntricas observadas é menor, sendo 5 ou 6 camadas, enquanto que em *Drosophila melanogaster* foram descritas 7 ou 8 camadas de ambos os lados da estrutura, as quais encontram-se conectadas no plano mediano.

Para TOKUYAZU (1975b) a estrutura e orientação do complexo mitocondrial em camadas concêntricas de duplas membranas sugerem que a característica funcional da formação do mesmo viabiliza a divisão da organela em duas massas iguais, as quais individualmente desenvolvem-se em dois derivados (mitocôndrias muito modificadas), com uma orientação das duas unidades, que forneceriam assim, igual oportunidade de relacionamento com o axonema, podendo inclusive ser importante para o posicionamento preciso do axonema em crescimento.

Com o início do alongamento celular observa-se no mutante “olho róseo” a divisão do complexo mitocondrial em duas unidades que se localizam uma de cada lado do axonema já em formação. A invaginação das membranas do complexo mitocondrial forma vários sulcos através dos quais o citoplasma avança. Estes sulcos fundem-se formando um único, o qual desaparece com o início da deposição de material paracristalino. Este evento na formação dos derivados mitocondriais foi descrito anteriormente por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e por CRUZ-LANDIM & MORAES (1980) quando do estudo da espermiogênese em *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep.

Estas complexas mudanças pelas quais passam as mitocôndrias culminam com a formação dos derivados mitocondriais localizados ao longo do axonema em espermatozóides maduros de muitos insetos (ROSATI *et alii*, 1976).

Segundo PHILLIPS (1970a) e BACCETTI (1972) dois importantes fenômenos ocorrem durante o processo de reorganização e diferenciação pelos quais passam os derivados mitocondriais dos espermatozóides de insetos. As cristas mitocondriais se orientam transversalmente formando uma série de pequenas lamelas, regularmente espaçadas e orientadas perpendicularmente ao grande eixo do derivado, e dentro da matriz surgem massas de materiais em bastonetes regulares e em arranjo paracristalino.

O material no interior dos derivados mitocondriais não surge no local onde é depositado. Para BACCETTI (1972) as cisternas do Golgi ficam em contato com a parede mitocondrial e então inicia-se o aparecimento gradual de material regularmente arranjado no interior dos derivados. Este material em arranjo paracristalino é de natureza protéica (BACCETTI *et alii*, 1977).

Em espermátide de *Ceratitis capitata* frequentemente observamos cisternas do complexo de Golgi mantendo contato com os derivados mitocondriais em transformação o que nos leva a concordar com a proposição feita por BACCETTI, isto é, a ativa participação do complexo de Golgi na deposição do material em arranjo paracristalino, no interior dos derivados mitocondriais.

Várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais. Para TOKUYASU (1974a) a natureza cristalina do corpúsculo

paracristalino sugere que o derivado mitocondrial é uma estrutura bastante elástica, modulando ou translocando os batimentos do axonema. Ainda, pode estocar e liberar parte da energia cinética produzida para a mobilidade flagelar. PEROTTI (1973) acredita que o material estocado nos derivados mitocondriais será utilizado para ativação e nutrição dos ovos após a fertilização. PHILLIPS (1974b) sugere que os derivados mitocondriais regulam e influenciam a forma do movimento flagelar. Segundo YASUZUMI (1974) os derivados mitocondriais estão relacionados com o suprimento de energia para a motilidade flagelar.

Concordamos com os autores supra citados, relacionando os derivados mitocondriais de *Ceratitis capitata* com o suprimento de energia e regulação da motilidade flagelar; porém a hipótese de PEROTTI também parece ser viável, uma vez que, a natureza do material paracristalino sendo protéica, o mesmo pode servir de nutrição para os ovos.

No mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* derivados mitocondriais extranumerários e com aberrações morfológicas são observados. Irregularidades semelhantes tem sido observadas em outros Dipteras mutantes.

KIEFER (1966) descreve para o mutante X/0 de *Drosophila melanogaster* um relacionamento entre o axonema e os derivados mitocondriais completamente desorganizado e os contatos entre as duas estruturas são geralmente falhos. Em espermatozóides de *Drosophila melanogaster* cultivadas em temperaturas elevadas, ANDERSON (1967) observou a ausência de derivados mitocondriais ou a falta de material paracristalino no interior dos mesmos. BRICK e colaboradores (1979), no mutante **ms(1)413** de *Drosophila melanogaster*, observaram em espermátides jovens mitocôndrias espalhadas, e cada mitocôndria alonga-se e diferencia-se similarmente aos derivados resultantes do complexo mitocondrial normal. Porém, dois tipos de derivados são formados, um com diâmetro pequeno, matriz eletrólúcida e sem corpúsculos paracristalinos; e o outro relativamente grande, matriz eletrólúcida opaca e contém os corpúsculos paracristalinos.

Em espermatozóides de *Atta capiguara* e *Atta rubropilosa* CAETANO (1980) descreve aberrações morfológicas. As anomalias referem-se, principalmente, à conformação da cauda e se constituem na presença de flagelos ou derivados mitocondriais extranumerários.

A presença de derivados mitocondriais extranumerários nas espermátides do mutante “olho róseo”, em estádios intermediários de diferenciação, pode estar relacionada com uma separação anormal do complexo mitocondrial durante os estádios iniciais; porém, este fenômeno não foi por nós observado; esta anormalidade poderia também, ser provocada pela desorganização completa do axonema. Encontram-se, também, derivados mitocondriais com alterações morfológicas, tais como a presença de inúmeras cristas mitocondriais e a ausência de corpúsculo paracristalino. Espermátides com alterações morfológicas parecem ser facilmente eliminadas, dificultando portanto, o acompanhamento das mesmas ao longo da espermiogênese.

#### 4.2.2 Formação do Acrossoma

No mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* a formação do acrossoma foi acompanhada. O complexo de Golgi apresenta um papel básico na origem e diferenciação do acrossoma. O grânulo pró-acrossômico é formado pelo material denso acumulado nas cisternas e vesículas Golgianas e passa por uma série de modificações graduais, até atingir uma forma definitiva, no final da espermiogênese.

O acrossoma, geralmente, é uma organela pequena, circundada por membrana e ocupa uma posição lateral em relação à extremidade anterior do núcleo.

LONGO & ANDERSON (1969) em espermátides do ouriço-do-mar, SZÖLLÖSI (1975) em espermátides de *Locusta migratoria* e QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) em espermátide de *Ceratitis capitata* observaram, na região de associação entre o núcleo e o acrossoma, a presença de estruturas membranosas eletrondensas. Este material, também, encontra-se no espaço existente entre o núcleo e o acrossoma das células espermáticas do mutante “olho róseo”. Estas estruturas membranosas podem ser elementos especializados do envólucro nuclear, segundo LONGO & ANDERSON. Para McMASTER-KAYE & KAYE (1980) estas membranas intersticiais são responsáveis pelo posicionamento do grânulo pró-acrossômico e pela sua união ao núcleo, nas fases iniciais da espermiogênese.

Portanto, o processo de formação do acrossoma no mutante “olho róseo”, conforme descrição acima, parece ocorrer nos padrões

normais, onde nenhuma alteração morfológica foi detectada. WILKINSON e colaboradores (1974) também descrevem como normal a diferenciação do acrossoma em espermátides do mutante **ms(3)10R** de *Drosophila melanogaster*.

#### 4.2.3 Formação do Adjunto do Centríolo

Em células espermáticas do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* o adjunto do centríolo está presente e parece ter a mesma organização ultra-estrutural descrita por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para o tipo selvagem da referida mosca; a qual já foi, anteriormente, descrita para muitas outras espécies de insetos (PHILLIPS, 1970a e BACCETTI, 1972).

O adjunto do centríolo, uma estrutura com aspecto granular e áreas eletrólucidas, localiza-se junto à extremidade caudal do núcleo das espermátides, justapondo-se à porção inicial do flagelo. Nas espermátides em estádios iniciais de diferenciação apresenta-se bastante volumoso; durante a espermiogênese diminui de tamanho. No espermatozóide o adjunto do centríolo é um corpo relativamente pequeno, compacto e com grande densidade eletrônica.

WARNER (1971) em espermátides de *Sarcophaga bulata* e SCHRANKEL & SCHAWALM (1974) em espermátides de *Coelopa frigida* observaram uma descontinuidade no envólucro nuclear, na região em que se justapõe ao adjunto do centríolo. Esta mesma observação foi realizada por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) em *Ceratitis capitata*, tipo selvagem e por nós no mutante “olho róseo”. Nesta mesma região o envólucro nuclear apresenta-se modificado por deposição de material eletrondenso. Estas alterações, também, foram relatadas por YASUZUMI e colaboradores (1970a) em espermátides de *Acrida lata*.

A descontinuidade no envólucro nuclear facilitaria a passagem de material entre o núcleo e o adjunto do centríolo, conforme descrição de SCHRANKEL & SCHAWALM (1974). TAFFAREL & ESPONDA (1980), em estudos citoquímicos, mostram que o adjunto do centríolo é formado principalmente por ribonucleoproteínas e proteínas. Estes resultados confirmam a hipótese de SCHRANKEL & SCHAWALM (1974) de que o material do adjunto poderia originar-se das proteínas somáticas complexa-

das ao DNA, as quais são total ou parcialmente substituídas por proteínas específicas no decorrer da espermiogênese; ou de parte do genoma amplificado nos espermátocitos, assim como as regiões nucleolares que seriam eliminadas do núcleo durante a maturação das espermátides.

Conforme já descrito por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) a função mecânica atribuída ao adjunto do centríolo pelos autores CANTACUZÉNE (1970), BACCETTI (1972), BACCETTI *et alii* (1973) parece não ser a mais correta, pois apesar do adjunto do centríolo ser uma estrutura comum às espermátides dos insetos não é uma constante nos espermatozóides destes animais (PHILLIPS, 1970a). Portanto, a função mecânica estaria restrita aos estádios iniciais de diferenciação da espermátide. A função de um possível papel nutritivo atribuída ao adjunto do centríolo por YASUZUMI e colaboradores (1970a) parece-nos viável, pois as suas transformações estruturais mantêm uma relação inversa com o desenvolvimento do axonema.

#### 4.2.4 Formação do Axonema

No mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata* observamos que a região mais inicial do axonema de espermátides em diferenciação apresenta o agrupamento normal de microtúbulos triplos, correspondendo ao corpúsculo basal, aspecto este descrito anteriormente por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para o tipo selvagem da referida mosca.

No axonema de espermatozóides, com morfologia normal, do mutante “olho róseo” o padrão de organização dos microtúbulos corresponde ao arranjo básico de dois microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios, observado para *Ceratitis capitata*, tipo selvagem (QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983) e para a grande maioria dos insetos (PHILLIPS, 1970a; BACCETTI, 1972; YASUZUMI, 1974).

A sequência de eventos que ocorrem na formação do axonema normal no mutante “olho róseo” não difere daquela descrita em estudos anteriores referentes a células germinativas masculinas de diferentes espécies de insetos (PEROTTI, 1969; SHAY *et alii*, 1969; KIEFER, 1970; PHILLIPS, 1970a, 1970c e 1974b; WARNER, 1970 e 1971; BACCETTI, 1972; CRUZ-LANDIM, 1979b; QUAGIO-GRASSIOTTO, 1983).

Além dos componentes básicos (um par central de microtúbulos preenchido por material eletrondenso, nove duplas periféricas de microtúbulos formadas pelas subfibras A e B e os nove microtúbulos acessórios preenchidos por material eletrondenso), no axonema normal do mutante “olho róseo”, são também observadas fibras eletrondensas entre o par central e as duplas periféricas de microtúbulos, e fibras eletrondensas entre os microtúbulos acessórios. Estas características estruturais do axonema foram observadas por QUAGGIO-GRASSIOTTO (1983) em células espermáticas de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem; sendo as mesmas descritas para inúmeros insetos (PHILLIPS, 1970a; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972).

Em espermátides do mutante “olho róseo” observamos, também em alguns flagelos, o axonema com todos os seus componentes tubulares básicos, porém distribuídos de forma desorganizada, não mantendo a morfologia típica desta estrutura.

KIEFER (1966) acompanhando o desenvolvimento de espermatozóides do mutante X/0 de *Drosophila melanogaster*, observou em alguns axonemas a presença de todos os elementos tubulares, porém desorientados um em relação ao outro. Este mesmo autor, (1968, 1969 e 1970), observando células espermáticas de *Drosophila melanogaster* Y-deficiente, verificou que o axonema passa por um processo degenerativo durante o qual ocorrem quebras das conexões entre as duplas periféricas de microtúbulos adjacentes, e entre as fibras eletrondensas e a dupla central de microtúbulos; conseqüentemente ocorre uma desorganização total da estrutura. Para este mesmo mutante MEYER (1970) descreve a presença de todos os componentes estruturais para o desenvolvimento da espermátide, no entanto falta a propriedade de organização para a complexa ordem na arquitetura típica.

BRICK e colaboradores (1979) observaram em espermátides do mutante ms(1)413 de *Drosophila melanogaster* a presença de todos os componentes tubulares do axonema normal; porém em espermátides adiantadas no processo de diferenciação a desorganização destes componentes parece ser comum.

Compartilhamos das proposições levantadas pelos autores supra citados, quando da análise de alterações morfológicas no axonema de espermátides de mutantes autossômicos e mutações em cromossomos sexuais de *Drosophila melanogaster*, para explicarmos a malformação

e/ou destruição dos elementos de conexão entre os microtúbulos do axonema e a conseqüente desorganização deste componente do flagelo de células espermáticas do mutante autossômico “olho róseo” de *Ceratitis capitata*.

A não observação de espermatozóides maduros com o axonema estruturalmente desorganizado pode ser explicada pelo processo de eliminação das células espermáticas com aberrações morfológicas. Este fenômeno explica, ainda, a presença de cistos com um pequeno número de espermatozóides maduros e morfológicamente normais, frequentes no mutante “olho róseo”; este aspecto foi também descrito por KIEFER (1966) para o mutante X/0 de *Drosophila melanogaster*.

#### 4.2.5 Formação de Membranas Citoplasmáticas

Durante nossas investigações no processo da espermiogênese do mutante “olho róseo” observamos a formação de dupla membrana circundando o axonema e os derivados mitocondriais em desenvolvimento; o mesmo evento foi por nós verificado em espermátides de machos tipo selvagem.

Com o amadurecimento da espermátide a membrana dupla que envolvia o axonema se desintegra, aspecto anteriormente observado por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) em *Ceratitis capitata*, tipo selvagem; concomitantemente surgem no citoplasma das espermátides membranas lisas e dupla que envolvem quase por completo o conjunto formado pelos derivados mitocondriais e o axonema. A eliminação de conteúdo citoplasmático da região caudal parece ser uma conseqüência da formação destas membranas.

Um ponto ainda muito discutido é a origem desta dupla membrana lisa. Em espermátides de *Ceratitis capitata* observamos nos cortes ultra finos, da região caudal, a presença do complexo de Golgi próximo ao local de formação da dupla membrana lisa, o que indicaria uma provável origem Golgiana destas membranas.

Uma origem Golgiana desta dupla membrana é defendida por BACCETTI (1972). Este autor, estudando espermatozóide de *Tenebrio*, observou que um sistema de membranas originado de vesículas Golgianas encontra-se entre o axonema e os derivados mitocondriais.

CRUZ-LANDIM (1979a) descreve que durante o processo de desenvolvimento das espermátides de *Myogrillus* sp uma membrana isola do restante do citoplasma o núcleo, os derivados mitocondriais e o axonema. Esta membrana originaria-se do retículo endoplasmático e viria constituir a membrana plasmática do espermatozóide maduro. A mesma autora, em 1980, estudando células espermáticas de *Conocephalus saltator* observou cisternas do retículo endoplasmático se arranjando inicialmente em torno do axonema e, após, por fora dos derivados mitocondriais. Estas cisternas fundem-se delimitando a cauda, segregando-a do citoplasma restante.

Pelas nossas observações, inicialmente concordamos com BACCETTI sobre a origem das duplas membranas lisas em células espermáticas de *Ceratitis capitata*. Porém, não podemos descartar a possibilidade da dupla membrana que circunda o axonema e se desintegra com o amadurecimento da espermátide ter uma origem Golgiana; enquanto a dupla membrana lisa que envolve o conjunto, derivados mitocondriais e axonema, segregando o flagelo do restante do citoplasma, seria formada pela fusão de cisternas do retículo endoplasmático.

#### 4.2.6 Membrana Plasmática

No flagelo de espermátides, geralmente em fase adiantada de maturação, do mutante “olho róseo” observamos com frequência quebra ou ausência da membrana plasmática.

Esta alteração morfológica no flagelo, inicialmente poderia ser explicada por um problema de fixação; porém, junto aos flagelos sem membrana plasmática ou com esta parcialmente destruída encontramos inúmeros flagelos com a membrana plasmática intacta. Os testículos de machos selvagens foram submetidos ao mesmo processo de fixação e em suas espermátides a membrana plasmática dos flagelos encontra-se com as características ultra-estruturais inalteradas.

Nas espermátides do mutante “olho róseo” em que a membrana plasmática está ausente observa-se que o axonema e os derivados mitocondriais ainda encontram-se estruturalmente organizados, mantendo o conjunto constituinte do flagelo. Provavelmente, as zonas eletrondensas encontradas entre o axonema e os derivados mitocondriais contribuem para

a manutenção deste conjunto.

A ausência ou destruição parcial da membrana plasmática do flagelo do mutante “olho róseo” parecem estar relacionadas com a maior fragilidade de membranas neste mutante. A frequente destruição das células que formam a parede dos cistos corrobora significativamente com a hipótese da fragilidade de membranas no mutante “olho róseo”.

#### 4.2.7 Diferenciação Nuclear

A sequência de eventos no processo de diferenciação nuclear no mutante “olho róseo” é a mesma descrita por QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para as espermátides de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. Assim no mutante “olho róseo”, também o núcleo das espermátides jovens se apresenta semelhante ao núcleo de células somáticas. No processo de alongamento esta cromatina sofre intenso processo de reorganização, resultando em um conteúdo altamente compactado e a forma do núcleo é extremamente alongada; características estas do núcleo de espermatozóides da maioria das espécies de insetos (BACCETTI, 1972; PHILLIPS, 1970a e 1974a).

Em espermátides jovens de *Ceratitis capitata*, com núcleos ainda ovóides, estruturas de complexo de poro são observadas em uma área específica do envólucro nuclear, posterior ao acrossoma.

O papel funcional dos complexos de poros ainda não se encontra totalmente esclarecido. Provavelmente os complexos de poros observados, somente nas fases iniciais das modificações morfológicas nucleares, estão envolvidos com as trocas de informações e material entre o núcleo e o citoplasma, uma vez que, a cromatina ainda é floculenta, sem agregados densos, lembrando cromatina funcionalmente ativa (STANLEY, 1969).

Ainda, em espermátides no início do processo de diferenciação de *Ceratitis capitata* observamos a presença de lamelas anuladas, próximas ao núcleo. Estas lamelas são formadas por um conjunto de duplas membranas paralelas interrompidas por poros. Portanto são morfológicamente similares às estruturas descritas por KESSEL (1981, 1985) e por STAFSTRON & STAEHELIN (1984) em espermátides e embriões de *Drosophila melanogaster* respectivamente.

Creemos que funcionalmente as lamelas anuladas estão envolvidas com intensa síntese de proteínas específicas, que se fazem necessárias para a continuidade do processo de diferenciação da espermátide e particularmente para as transformações nucleares. Esta função foi anteriormente atribuída por KESSEL (1981, 1985) às lamelas anuladas presentes em espermátides jovens de *Drosophila melanogaster*.

Uma sequência de modificações morfológicas drásticas caracterizam o processo de alongamento do núcleo em espermátides de *Ceratitis capitata*, principalmente nos estádios intermediários e finais de diferenciação. Esta sequência foi anteriormente descrita por QUAGIO-GRASSIOTTO & DOLDER (1981) e envolve a formação de concavidades nucleares, o surgimento de membranas adjacentes ao núcleo e microtúbulos citoplasmáticos, formando a "manchette".

A biconcavidade nuclear em espermátide de *Ceratitis capitata* é mais acentuada no período inicial da condensação cromatínica e desaparece posteriormente. Para TOKUYASU (1974b), em espermátides de *Drosophila melanogaster* a formação destas concavidades estaria relacionada com a distribuição definitiva da cromatina.

No mutante "olho róseo" duas membranas adjacentes ao envólucro nuclear foram observadas, seguindo a descrição de QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. Estruturas similares foram relatadas em espermátides de outros insetos, como *Sarcophaga* (WARNER, 1971); *Drosophila* (STANLEY *et alii*, 1972; TOKUYASU, 1974b) e *Coelopa* (SCHRANKEL & SCHWALM, 1974).

As membranas adjacentes ao núcleo parecem ter importância na distribuição dos microtúbulos e conseqüentemente nos mecanismos de condensação nuclear (TOKUYASU, 1974b). Concordamos com a hipótese apresentada por TOKUYASU, uma vez que, estas membranas são eliminadas juntamente com o citoplasma circundante do núcleo, quando as espermátides se aproximam da maturidade, tendo concluído sua alongação.

Concomitantemente com o início do alongamento nuclear e celular da espermátide, inúmeros microtúbulos são formados no citoplasma. Para vários autores os microtúbulos seriam responsáveis pelo alongamento e formato do núcleo das células espermáticas (KESSEL, 1966, 1967 e 1970; HOAGE & KESSEL, 1968; PHILLIPS, 1970a; BACCETTI, 1972; RATTNER & BRINKLEY, 1972; YASUZUMI, 1974).

FAWCETT e colaboradores (1971) defendem a hipótese da forma do núcleo ser determinada por um padrão específico de agregação do DNA e proteínas, geneticamente controlado, durante a condensação da cromatina. Portanto, a forma do núcleo dos espermatozoides de insetos seria uma consequência da organização molecular e supramolecular da cromatina; a assimetria no processo de condensação poderia estar relacionada com o contorno nuclear. Estes mesmos autores e também SZÖLLÖSI (1975) acreditam que os microtúbulos podem ser essenciais para a redistribuição e escoamento de citoplasma e organelas da região anterior para a região posterior da célula, durante o processo e diferenciação da célula germinativa masculina.

Na transformação nuclear em espermátide do mutante “olho róseo” cremos que um conjunto de fatores está envolvido: a organização da cromatina como força intranuclear, as membranas adjacentes ao núcleo e os microtúbulos citoplasmáticos como forças mecânicas externas. TOKUYASU (1974b) discute esta mesma linha para *Drosophila melanogaster* e QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) para *Ceratitis capitata*, tipo selvagem.

Ainda, no mutante “olho róseo” observamos núcleos de espermátides em estádios intermediários de diferenciação com a cromatina apresentando um padrão anormal de condensação. SHOUP (1967) observou que em mutantes de *Drosophila melanogaster* onde não ocorre a troca das proteínas histônicas somáticas por histonas ricas em arginina, o material cromatínico nuclear não se encontrava compactado e, conseqüentemente, os espermatozoides eram estéreis.

Nas células espermáticas do mutante “olho róseo” em que a condensação cromatínica apresenta-se anormal, membranas adjacentes ao núcleo e microtúbulos citoplasmáticos estão presentes. Portanto, eventos intrínsecos do material cromatínico parecem estar envolvidos no processo das transformações nucleares normais, culminando com o elevado grau de compactação da cromatina e a drástica diminuição do volume nuclear em espermatozoides maduros. Provavelmente, as alterações morfológicas no processo das transformações nucleares, especificamente da compactação do material cromatínico, nas espermátides deste mutante, estão relacionadas com alguma alteração individual e ocasional desta mutação monogênica, recessiva e autossômica.

Outra alteração a nível de núcleo, especificamente envolvendo a compactação cromatínica, no mutante “olho róseo” é a presença de massas bastante eletrondensas, com uma forma definida, no interior do núcleo de espermátides em estágio intermediário de diferenciação (estádio 7). Estas massas podem representar regiões cromatínicas que sofreram compactação anteriormente ao restante do conteúdo nuclear. Ainda, em espermátides no estágio intermediário de diferenciação (estádio 7) na região nuclear encontram-se porções onde o envólucro nuclear não é distinguível. Este aspecto pode ser explicado com a hipótese de maior fragilidade de membranas no mutante. Nestas regiões não são encontrados microtúbulos citoplasmáticos nem membranas adjacentes ao núcleo, pois provavelmente com o rompimento do envólucro nuclear os mesmos foram deslocados.

A baixa frequência de núcleos com uma compactação cromatínica anormal por nós observada no mutante “olho róseo”, provavelmente deve-se ao fenómeno de eliminação das células espermáticas com malformações e, conseqüentemente, com a presença de cistos contendo um pequeno número de espermatozóides maduros. Porém, em paralelo a este grupo de cistos observa-se a presença de cistos com o número normal de espermatozóides maduros, conforme já discutimos anteriormente.

No mutante “olho róseo” também, observamos cistos organizados com o número normal de células espermáticas, onde pequenos grupos de células encontram-se em diferentes estádios de maturação. Acreditamos que esta defasagem está relacionada com um mecanismo intrínscio de cada célula, o qual desencadeia o processo de diferenciação. Portanto, nestes cistos, estes mecanismos não são desencadeados sincronicamente em todas as células do interior de um cisto, como ocorre normalmente.

Para melhor explicarmos as anomalias no processo de compactação do material cromatínico, nas células germinativas do mutante “olho róseo”, seriam necessárias outras metodologias, como estudos citoquímicos referentes à complexação DNA – proteínas, juntamente com análises bioquímicas.

#### **4.2.8 Células Císticas**

As células que formam a parede dos cistos possuem a função de proteção e nutrição das células germinativas. Os lisossomos

destas células estão envolvidos na destruição dos resíduos citoplasmáticos das células germinativas em diferenciação e na eliminação de espermátides defeituosas; esta atividade resultando na formação e acúmulo de diversas massas residuais (BAIRATI, 1967).

As células císticas durante a espermiogênese de *Myogrilus* sp. sofrem profundas transformações sugerindo um papel especial destas células no processo de maturação do espermatozóide. Sugere-se que as células císticas são responsáveis pela reabsorção e digestão dos resíduos citoplasmáticos das espermátides em diferenciação, por uma provável função nutritiva, e ainda como suporte físico durante o alongamento celular (CRUZ-LANDIM & FERREIRA, 1981).

No mutante “olho róseo” frequentemente observamos a destruição ou degeneração das células císticas e, conseqüentemente, a desorganização dos feixes das células espermáticas. Esta desorganização consiste na aglomeração de espermátides de maneira anômala, isto é: em diferentes estádios de maturação, em espermátides muito próximas seccionadas em diferentes alturas, como a extremidade da cauda junto à extremidade anterior da cabeça, e com alteração na distribuição espacial das espermátides, pois em um mesmo nível de corte temos células seccionadas transversal, oblíqua e longitudinalmente. Ainda, a célula germinativa não terá as condições propícias para a continuidade de sua diferenciação e, provavelmente, entra em processo degenerativo.

Diferentemente em *Ceratitis capitata* tipo selvagem e no mutante com cistos normais as células que formam a parede dos cistos mostram-se morfológicamente íntegras mantendo os feixes das células espermáticas organizados, o que sugere que seu papel seria o de oferecer condições propícias para a completa diferenciação das células germinativas.

Estruturas semelhantes a figuras mielínicas parecem ser resultantes do processo de maturação das células espermáticas. CRUZ-LANDIM e colaboradores (1980) descreveram a formação de figuras mielínicas a partir da eliminação de porções citoplasmáticas ou reabsorção de organelas durante o processo de maturação das células espermáticas em abelha. Estes mesmos autores e TOKUYASU (1972a) observaram também a formação de figuras mielínicas a partir da degeneração de espermatozoides anormais.

No caso do mutante “olho róseo” as estruturas semelhan-

tes a figuras mielínicas, frequentes em nossas observações, principalmente junto aos cistos desorganizados, provavelmente resultam da degeneração das células germinativas; e das próprias células císticas.

Na zona proximal do testículo de *Ceratitís capitata* observam-se as células císticas em processo degenerativo e a consequente liberação dos espermatozoides maduros. No local do cisto permanece uma massa residual com inúmeras estruturas semelhantes a figuras mielínicas e lisossomos ativos, os quais estão envolvidos com o processo de fagocitose dos resíduos do cisto após a eliminação do seu conteúdo.

#### 4.2.9 Ultra-Estrutura do Espermatozoide na Espermateca

Os espermatozoides armazenados no interior da espermateca de fêmeas mutante “olho róseo” e tipo selvagem de *Ceratitís capitata* não apresentam diferenças morfológicas.

QUAGIO-GRASSIOTTO (1983) descreveu que nenhuma alteração foi observada em espermatozoides armazenados no interior da espermateca de fêmeas de *Ceratitís capitata*, tipo selvagem. Pelas nossas observações a ultra-estrutura do espermatozoide no trato genital feminino, especificamente espermateca, do mutante “olho róseo” não apresenta nenhuma alteração em relação à morfologia das células germinativas no interior do trato genital masculino, especificamente testículo. O fato de não terem sido encontrados na espermateca espermatozoides com alterações pode ser explicado pela tendência dos mesmos serem eliminados durante o processo de maturação.

No interior de espermatecas vazias de *Ceratitís capitata* observamos a presença de um material tubular, com distribuição aleatória. Quando do armazenamento dos espermatozoides constatamos que este material tubular envolve e segue a mesma orientação das células germinativas no interior da espermateca. Pelas observações sugere-se que o material tubular é transformado e/ou utilizado durante o período de armazenamento dos espermatozoides na espermateca. Com a eliminação dos espermatozoides, e provável utilização dos mesmos no processo de fertilização dos óvulos, verifica-se que entre as poucas células germinativas que ainda se encontram no interior da espermateca, existe uma grande quantidade de material fibrilar e poucos são os elementos tubulares presentes.

Outros estudos e metodologias são necessárias para a determinação da natureza e função deste material tubular e fibrilar observado no interior da espermateca de *Ceratitis capitata*.

### 4.3 Citoquímica I: Fosfatase Ácida na Citodiferenciação das Espermátides

A atividade fosfatásica ácida (fosfatases com atividade em pH ótimo entre 4.5 – 6.0 e numa temperatura ótima de 37°C) detectada nas células espermáticas apresenta localização específica em organelas citoplasmáticas envolvidas no processo de maturação dos espermatozóides.

Com variações no tempo de fixação em glutaraldeído e na temperatura utilizada para incubação, na técnica de BARKA & ANDERSON, diferentes resultados foram demonstrados. Com um maior tempo de fixação melhora-se a preservação das estruturas celulares, porém, parece ocorrer uma diminuição na quantidade do produto de reação nos sítios de atividade enzimática. Segundo ESSNER (1973) a redução no tempo de fixação para a detecção de fosfatases é necessária para que haja uma maior preservação das enzimas, pois o glutaraldeído, mesmo a baixas concentrações, é potente inibidor de fosfatases. Testículos incubados a 37°C apresentaram frequência e quantidade do produto de reação muito maior nos sítios de atividade enzimática. A temperatura ótima para a atividade enzimática das fosfatases parece residir em torno dos 37°C (ERICSSON & TRUMP, 1965 – apud ESSNER, 1973).

As fosfatases ácidas consistem em um grupo de enzimas não específicas que hidrolizam uma variedade de ésteres orgânicos com a liberação de íons fosfato (ESSNER, 1973). A atividade fosfatase ácida foi inicialmente localizada em lisossomos (ESSNER & NOVIKOFF, 1961 – apud ESSNER, 1973; HOLT & HICKS, 1961 – apud ESSNER, 1973), e posteriormente em outras estruturas, incluindo retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

#### 4.3.1 Células Espermáticas

Em espermátides, nos estádios bem iniciais de diferenciação de *Ceratitis capitata*, observamos precipitados de fosfato de chumbo distribuídos no interior das cisternas e vesículas do complexo de Golgi, indicando o envolvimento desta organela no processamento de hidrolases ácidas, componentes do conteúdo enzimático das vesículas pró-acrossômicas, e posteriormente do acrossoma.

A concentração de densos precipitados indica a presença de uma quantidade significativa de hidrolases ácidas ativas no interior das vesículas pró-acrossômicas. Com a diferenciação desta vesícula em acrossoma observa-se um decréscimo do produto da reação, culminando com a ausência do mesmo, no acrossoma já formado.

ANDERSON (1968) e SOUZA & AZEVEDO (1986) descrevem a ausência de produtos da reação enzimática no acrossoma de ouriço-do-mar e *Marthasterias glacialis*, respectivamente. Segundo estes autores as enzimas são armazenadas no acrossoma em um estado inativo e serão ativadas somente na fertilização, participando na dissolução da zona pelúcida externa do ovócito e possibilitando a penetração do espermatozóide.

Para explicar a ausência da atividade fosfatase ácida no acrossoma de espermátides de *Ceratitis capitata* compartilhamos das hipóteses defendidas pelos autores supra citados. A natureza lisossomal do acrossoma formado a partir do complexo de Golgi, passando por uma estrutura intermediária, a vesícula pró-acrossômica, parece-nos confirmada, também, por este estudo citoquímico.

A atividade fosfatásica ácida foi verificada em núcleos de espermátides de *Ceratitis capitata* nos estádios iniciais e intermediários de diferenciação. Nestes estádios a cromatina ainda se encontra em processo de compactação. Dados da literatura descrevem esta atividade enzimática em núcleos de outros tipos celulares.

Entre os autores existem muitas controversias sobre a atividade fosfatásica ácida nuclear. Parece haver três grupos distintos de pesquisadores: aqueles que não hesitam sobre a possibilidade de existirem sítios enzimáticos autênticos no núcleo (LOVE *et alii*, 1969; DELTOUR *et alii*, 1981; AZEREDO-OLIVEIRA, 1982); outros que acreditam que haja uma afinidade particular da cromatina pelos íons chumbo (REMY *et alii*, 1975; BUCHWALOW & UNGER, 1977); e ainda os que defendem a idéia de difusão da fosfatase lisossomal para o núcleo, portanto os precipitados seriam artefatuais (ANASTASIA-SAWICKI & MACINTYRE, 1976; WASHITANI & SATO, 1976).

No caso dos resultados referentes aos núcleos de espermátides de *Ceratitis capitata*, parecem não serem os mesmos artefatuais. A reação positiva é abolida na ausência do substrato, e parece não ocorrer

difusão do produto da reação a partir de sítios citoplasmáticos. O produto da reação faz-se presente em estádios específicos de diferenciação da espermatíde e com uma localização definida a nível nuclear.

Na espermiogênese de *Ceratitidis capitata* ocorre uma série de eventos para a transformação da célula espermática adaptando-a ao processo de fertilização. cremos portanto, na interrelação da atividade enzimática fosfatásica ácida com o mecanismo de transcrição que desencadeará, em seguida, a síntese de enzimas acrossomais, de proteínas constituintes dos corpúsculos paracrystalinos dos derivados mitocondriais e das proteínas histônicas ricas em arginina, que substituem as proteínas histônicas somáticas no processo de compactação da cromatina.

DELTOUR e colaboradores (1981) propuseram quando do trabalho com células de raiz de milho uma correlação entre a taxa de transcrição nuclear, o nível de atividade fosfatásica ácida e o acúmulo de fosfato inorgânico nuclear; ainda estes autores encontraram uma alta atividade fosfatásica ácida justamente nos núcleos de células com metabolismo elevado.

O nosso objeto de estudo vem corroborar a proposição dos autores supra citados, pois uma alta atividade fosfatásica ácida foi encontrada nos estádios iniciais e intermediários de diferenciação da espermatíde, período de grande metabolismo nuclear; enquanto que no momento da queda deste metabolismo (estádios finais) verifica-se a ausência total da atividade enzimática.

Na fase das transformações drásticas do material nuclear com a conseqüente diminuição do seu volume, principalmente nos estádios intermediários de diferenciação da espermatíde de *Ceratitidis capitata*, a atividade fosfatásica ácida foi detectada no envólucro nuclear, aparentemente com localização no espaço perinuclear.

Finos precipitados resultantes da atividade fosfatásica, também, foram demonstrados por PERRIN- WALDEMER & BEAULTON (1973) no espaço perinuclear de espermatogônias de *Drosophila melanogaster*. Em espermatozóides de *Marthasterias glacialis* tratados citoquimicamente para a demonstração da atividade fosfatase ácida SOUZA & AZEVEDO (1986) observaram forte reação positiva no envólucro nuclear.

No caso das células espermáticas de *Ceratitidis capitata* cremos que a reação positiva para fosfatase ácida a nível do envólucro nu-

clear, relaciona-se com o processo de eliminação do conteúdo nucleoplasmático e resíduos de membranas resultantes do processo de transformações nucleares. Esta hipótese parece ser reforçada pelo período em que ocorre a formação dos depósitos de fosfato de chumbo no envólucro nuclear, o qual coincide com o momento da diminuição do volume nuclear.

Nos flagelos de células espermáticas de *Ceratitix capitata* produtos resultantes da atividade fosfatase ácida foram detectados no axonema, nos derivados mitocondriais e na dupla membrana lisa que circunda o axonema.

No axonema, precipitados densos resultantes da atividade enzimática, foram observados somente em estádios mais avançados de maturação. Os precipitados localizam-se especificamente nas fibras eletrondensas encontradas entre o par central e as nove duplas periféricas de microtúbulos e nas fibras eletrondensas localizadas entre os microtúbulos acessórios.

A atividade enzimática fosfatásica ácida na região da matriz do axonema em espermatozóides de *Ceratitix* foi anteriormente demonstrada por BIGLIARDI e colaboradores (1970), e BACCETTI e colaboradores (1971a). Estes últimos autores localizaram a atividade enzimática, também, em células espermáticas de *Bacillus rossius* e *Pezotettix giornai*, com uma localização específica nos espaços entre os componentes tubulares do axonema. BACCETTI (1972) descreve ainda, a atividade da fosfatase ácida na membrana plasmática do flagelo de espermatozóide de *Ceratitix*.

Em testículos de *Drosophila melanogaster* submetidos a tratamento citoquímico para a reação fosfatase ácida, precipitados de chumbo estão regularmente presentes a nível do axonema de espermátides em estádios avançados de diferenciação (BEAULATON & PERRIN-WALDEMER, 1973). Segundo estes autores a atividade fosfatásica ácida se reporta em duas zonas concêntricas, uma zona periférica entre os nove microtúbulos acessórios, e uma zona anular interna, onde os precipitados localizam-se a nível da matriz do axonema, encontrada entre os dois microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas. Provavelmente, a fosfatase ácida no axonema está envolvida no controle do metabolismo de fosfatos e nucleosídeos fosfatados que participam nas diversas reações de desfosforilação de ésteres fosfatados, ligados ou não à motilidade flagelar (ANDERSON *et alii*, 1968).

DOLDER (comunicação pessoal) observou a presença de depósitos de fosfato de chumbo nas regiões localizadas entre os componentes tubulares do axonema de espermatozóides de *Triatoma infestans*.

Em nosso material de estudo — células espermáticas de *Ceratitis capitata* — as regiões do axonema onde se detectou a atividade fosfatase ácida coincidem com o descrito anteriormente para os espermatozóides de alguns insetos, pelos autores supra citados. Concordamos com o envolvimento da fosfatase ácida no metabolismo de fosfatos ligados ou não à motilidade flagelar, principalmente tendo em vista o aparecimento de reação apenas a partir do estágio 7, quando o axonema possui todos os seus elementos e então torna-se capaz de exercer alguma motilidade.

A presença de precipitados resultantes da atividade enzimática em axonema de alguns flagelos e a ausência em outros muito próximos, provavelmente, representam diferentes momentos e/ou condições fisiológicas destes flagelos. Uma outra variação detectada foi referente à intensidade e quantidade de precipitados formados. Em alguns axonemas tem-se uma quantidade bem menor de fosfato de chumbo, indicando uma pequena atividade enzimática, o que provavelmente relaciona-se com um momento fisiológico inicial ou final dos flagelos. Neste momento poucos fosfatos inorgânicos encontrar-se-iam na matriz do axonema e, conseqüentemente, verifica-se uma pequena precipitação de fosfato de chumbo.

Em células espermáticas, nos estádios 8 e 9 de diferenciação de *Ceratitis capitata*, observa-se a presença de precipitados resultantes da atividade enzimática fosfatásica ácida nas regiões periféricas dos derivados mitocondriais. As hidrolases ácidas, aparentemente, restringem-se às porções dos derivados que ainda não se encontravam preenchidos pelos corpúsculos paracristalinos eletrondensos.

Em uma revisão de vários autores YASUZUMI (1974) descreve a formação de produtos da reação fosfatase ácida somente no filamento axial, enquanto que nos derivados mitocondriais de espermatozóides maduros estes produtos estão ausentes.

A morfologia mitocondrial é preservada em espermatozóides de estrela-do-mar e ouriço-do-mar. ANDERSON (1968) descreveu a formação de produtos da reação fosfatásica ácida na membrana mitocondrial externa, junto às cristas e distribuídas ao acaso na matriz mitocondrial em espermátides de ouriço-do-mar. Em espermatozóides de *Marthasterias*

*glacialis*, tratados para a demonstração citoquímica da atividade fosfatásica ácida observa-se uma fraca e difusa reação a nível de mitocôndrias (SOUZA & AZEVEDO, 1986).

Para ANDERSON (1968), as hidrolases mitocondriais podem ter um papel funcional em autólise, servindo para quebrar reservas nutricionais endógenas, como fosfolipídeos e proteínas que podem ser utilizados na produção de energia. As hidrolases ainda podem servir para autólise das mitocôndrias dos espermatozóides após a fertilização.

Na espermiogênese de *Ceratitis* tem-se a transformação das mitocôndrias em derivados mitocondriais, diferindo portanto de estrelado-mar e ouriço-do-mar; e em espermatozóides maduros nenhum produto da reação foi observado a nível dos derivados mitocondriais. Acreditamos que a presença de precipitados distribuídos ao acaso nas regiões periféricas dos derivados mitocondriais, geralmente de espermátides nos estádios 8 e 9 de diferenciação, indiquem a ação de hidrolases ácidas no processo de eliminação de resíduos da matriz mitocondrial, resultantes da transformação e estruturação dos derivados mitocondriais.

Na dupla membrana lisa que circunda o axonema de células espermáticas em diferenciação de *Ceratitis capitata* foram observados depósitos de fosfato de chumbo. Após a destruição desta membrana, a reação enzimática persiste nos resíduos de membrana que ainda se encontram entre o axonema e os derivados mitocondriais.

BACCETTI (1972) descreve histoquimicamente a reação fosfatásica ácida nos espaços entre as estruturas tubulares do axonema de espermatozóides de insetos, conforme discussão anterior; e nos resíduos de membranas originadas do Golgi que separam os derivados mitocondriais da complexa estrutura do axonema.

A forte reação a nível da dupla membrana lisa que inicialmente circunda o axonema e posteriormente persiste entre o axonema e os derivados mitocondriais de espermátides de *Ceratitis* pode estar relacionada com a origem desta membrana, provavelmente Golgiana, conforme discutimos anteriormente. Porém, esta reação também, pode ser devido à presença de hidrolases ácidas que participam da desintegração desta membrana, com o processo de maturação da célula espermática.

As hidrolases ácidas participam ativamente na destruição das células espermáticas com prováveis alterações morfofuncionais. Lisos-

somos com densos depósitos de fosfato de chumbo, presentes na região da cabeça e caudal de espermatídes e estádios intermediários de diferenciação do mutante “olho róseo” indicam, provavelmente, o início do processo de destruição destas células. Ainda, com uma frequência relativamente elevada, o conteúdo citoplasmático de células espermáticas do mutante “olho róseo” encontra-se preenchido por precipitados resultantes da atividade enzimática fosfatásica ácida; indicando a sequência do processo de destruição das células com alterações morfofuncionais. Cremos que este fenômeno ocorre para eliminar as células germinativas masculinas com anomalias que impedem o seu perfeito desenvolvimento; conseqüentemente as mesmas não teriam as condições morfofisiológicas necessárias ao processo de fertilização, função final do espermatozói-de. Com isto, temos no mutante “olho róseo” de *Ceratitís capitata* a presença frequente de cistos com o número de espermatozói-des maduros muito inferior ao número teoricamente esperado, conforme discutimos anteriormente.

#### 4.3.2 Células Císticas

As células que formam a parede dos cistos também demonstraram a atividade fosfatásica ácida em algumas de suas estruturas celulares.

No núcleo das células císticas de *Ceratitís capitata* precipitados resultantes da ação da atividade fosfatásica ácida estão presentes, predominantemente a nível da cromatina mais compactada, especificamente na cromatina que se encontra junto à membrana interna do envólucro nuclear. Esta localização da atividade enzimática relaciona-se provavelmente com os fenômenos de transcrição do conteúdo cromatínico, conforme discutimos anteriormente, com referência aos núcleos de espermatídes em fases iniciais e intermediárias de maturação. A atividade da fosfatase ácida no núcleo das células císticas indica que as mesmas encontram-se com um metabolismo elevado.

Portanto, as células que formam a parede dos cistos, além da função estrutural na manutenção do feixe de espermatozói-des organizado formando um cisto, apresentam um metabolismo provavelmente envolvido na produção de substâncias que podem sustentar as células espermáticas, auxiliando-as no processo de maturação.

Os lisossomos das células císticas apresentam fortes depósitos de fosfato de chumbo em testículos de *Ceratitis capitata* submetidos ao tratamento citotóxico para a reação fosfatase ácida. As hidrolases ácidas destes lisossomos podem estar relacionadas ao processo de degradação de material eliminado pelas espermátides.

No estudo do processo de involução que ocorre nos testículos do ouriço-do-mar *Echinometra locunter*, no período não reprodutivo, BEIG & CRUZ-LANDIM (1975) verificaram que a reabsorção das células, em qualquer estágio de diferenciação, é feita com o auxílio dos lisossomos, e tem lugar no interior de vacúolos digestivos das células nutritivas ou "nurse cells", as quais são equivalentes às células de Sertoli de vertebrados e às células císticas de insetos.

CHEMES & FAWCETT (1978) localizaram a atividade fosfatase ácida em lisossomos de células germinativas e células de Sertoli de ratos. As células de Sertoli demonstraram uma variação cíclica em sua população lisossomal, a qual aumenta progressivamente com o desenvolvimento da espermiogênese. O número de lisossomos e a intensidade da atividade enzimática aumentam na época da espermição e diminui após os corpúsculos residuais terem sido digeridos.

Em estudo citotóxico para fosfatase ácida, PERRIN-WALDEMER & BEAULATON (1973) descreveram uma resposta positiva nos corpúsculos residuais, frequentes em cortes ultra finos de testículos de *Drosophila melanogaster*. Para CRUZ-LANDIM e colaboradores (1980), as estruturas semelhantes a figuras mielínicas, com provável natureza lisossomal, observadas na espermatogênese de abelha relacionam-se com o processo de maturação, como a eliminação de parte do citoplasma ou reabsorção de algumas organelas citoplasmáticas, ou ainda, estas estruturas podem resultar da fagocitose de espermatozoides defeituosos ou degeneração das próprias células císticas.

Em *Ceratitis*, os lisossomos das células císticas estão envolvidos na destruição de resíduos citoplasmáticos e membranas resultantes do processo da espermiogênese, na eliminação de células espermáticas com anomalias morfofuncionais, especialmente no mutante "olho róseo" e ainda, participam ativamente na eliminação dos espermatozoides maduros do interior do cisto. Da ação dos lisossomos nestes processos de fagocitose resulta a formação de estruturas lembrando figuras mielínicas, semelhante ao des-

crito por CRUZ-LANDIM e colaboradores na espermatogênese de abelha.

No mutante "olho róseo" as hidrolases ácidas do conteúdo lisossomal participam de forma bastante ativa na eliminação de membranas residuais resultantes do processo de destruição das células que formam a parede dos cistos. Frequentemente observa-se intensa atividade enzimática em resíduos das células que separavam cistos com espermátides em diferentes estádios de diferenciação. A degeneração das células císticas, no mutante, anteriormente ao término do processo de diferenciação das células germinativas, pode ser devido à maior fragilidade de suas membranas e/ou a defasagem no tempo de duração do processo de maturação das espermátides.

Na espermiogênese de insetos as hidrolases ácidas parecem participar do processo de eliminação dos espermatozóides maduros. Observações sugerem que fosfatases ácidas estão envolvidas na liberação da região anterior da cabeça de espermatozóides em cistos de *Drosophila melanogaster* (TOKUYASU *et alii*, 1972b).

Em *Ceratitis* observamos que durante o processo de eliminação dos espermatozóides havia um significativo aumento da atividade enzimática fosfatásica ácida nos lisossomos e também de forma difusa no conteúdo citoplasmático das células císticas. Após a eliminação das células germinativas verifica-se a presença de densos depósitos de fosfato de chumbo distribuídos, sob a massa residual restante. Com a ação das hidrolases ácidas provavelmente esta massa residual, resultante da liberação dos espermatozóides maduros dos cistos, será totalmente digerida, restando apenas alguns corpúsculos residuais.

#### 4.4 Citoquímica II: Arilsulfatase na Citodiferenciação das Espermátides

A atividade arilsulfatase (um tipo de sulfatase com atividade em pH ótimo entre 5.0–5.5 e numa temperatura ótima de 37°C) detectada nas células espermáticas de *Ceratitidis capitata* apresenta localização específica, principalmente em lisossomos, complexo de Golgi e membrana plasmática.

As sulfatases são enzimas que catalizam a quebra hidrolítica de esteres sulfatados com a liberação de íons sulfatos. A atividade arilsulfatase tem sido demonstrada em diferentes tecidos e células e sua principal localização ocorre a nível de lisossomos. As observações citoquímicas são corroboradas com resultados bioquímicos, os quais demonstram que em experimentos de gradiente de centrifugação e centrifugação diferencial arilsulfatase sedimenta-se na fração lisossomal (HOPSU–HAVU & HELMINEN, 1974). WOJCZYZ (1986) descreve três diferentes tipos de arilsulfatases, os tipos A e B associados aos lisossomos e o tipo C localiza-se nos microsossomos.

Para HOPSU-HAVU & HELMINEN (1974), em revisão de inúmeros autores, a demonstração citoquímica do produto final da reação em lisossomos, cisternas de Golgi, vesículas, vacúolos e ocasionalmente em cisternas do retículo endoplasmático suportam a observação que as moléculas de arilsulfatase são sintetizadas nos ribossomos, transportadas através do retículo endoplasmático para o Golgi onde as moléculas da enzima são concentradas e empacotadas participando do conteúdo enzimático dos lisossomos primários.

Em células espermáticas de *Ceratitidis capitata* um material finamente granular, o produto da reação enzimática arilsulfatase, localiza-se nas cisternas do complexo de Golgi e em corpúsculos multivesiculares. O resultado positivo da reação no Golgi provavelmente relaciona-se com o envolvimento desta organela no processamento das arilsulfatases. Os corpúsculos multivesiculares correspondem aos lisossomos secundários; ou seja são resíduos citoplasmáticos ou organelas celulares eliminados pelo processo de diferenciação da espermátide e que estão sendo digeridos pelo conteúdo enzimático das vesículas lisossomais.

Nas células que formam a parede dos cistos inúmeros lisossomos apresentam precipitados de sulfato de chumbo. As estruturas lembrando figuras mielínicas e as massas residuais resultantes após a liberação dos espermatozoides do interior do cisto também apresentam produtos da reação enzimática. Portanto, a arilsulfatase, assim como a fosfatase ácida, provavelmente, além de participar no processo de eliminação dos resíduos citoplasmáticos resultantes do processo de diferenciação da espermátide, atua também na degeneração da própria célula cística.

Nossas observações citoquímicas corroboram com a hipótese de maior especificidade das arilsulfatases a nível lisossomal. Esta hipótese havia sido demonstrada anteriormente por ERICSSON & HELMINEN (1967) e HOPUSU-HAVU e colaboradores (1967) quando da localização da atividade arilsulfatase em lisossomos de células renais de ratos.

Em nosso material de estudo frequentemente observa-se a presença de finos precipitados, produtos da reação arilsulfatásica em regiões da membrana plasmática de células espermáticas, em estádios intermediários de diferenciação. Em alguns cortes ultrafinos parece haver uma localização preferencial dos depósitos de sulfato de bário em pontos de adesão existentes entre as células. Estes precipitados estão ausentes nos controles.

Depósitos ocasionais do produto final da reação arilsulfatase em membrana plasmática, núcleo, nucléolo, mitocôndria são considerados artefatuais (KALIMO *et alii*, 1967; ARSTILA *et alii*, 1967).

Creemos não ser artefactual os depósitos de sulfato de bário na membrana plasmática das espermátides em diferenciação de *Ceratitidis capitata*. A atividade enzimática não foi detectada em espermátides nos estádios iniciais de diferenciação. A reação parece ocorrer principalmente na membrana plasmática de espermátides em estádios intermediários de diferenciação, com localização preferencial nas regiões ou pontos de adesão que ainda persistem entre as células. Portanto, funcionalmente esta enzima parece participar no processo de individualização das células germinativas, onde ocorre a destruição da membrana plasmática em determinadas áreas.

A atividade enzimática arilsulfatase em espermátides no processo de maturação e em células císticas de testículos de *Ceratitis capitata* não está totalmente esclarecida, talvez uma análise bioquímica futura associada ao estudo ultra-estrutural, venha trazer maiores conhecimentos sobre a própria localização e principalmente em relação à ação desta enzima.

## 5 CONCLUSÕES / RESUMO

No mutante “olho róseo” de *Ceratitidis capitata*, o qual possui uma capacidade de inseminação bastante reduzida e tem alterações comportamentais, já conhecidas, o processo de diferenciação de grande parte das células espermáticas conduz-se de forma similar ao observado e descrito para o tipo selvagem, tendo-se no final do processo a formação do espermatozóide maduro, célula altamente especializada, apta ao processo de fertilização.

Em nosso estudo ultra-estrutural, utilizando o método rotineiro de preparação do material e com um estudo citoquímico para atividades fosfatásica ácida e arilsulfatásica, observamos pequenas alterações no processo da espermiogênese deste mutante que levam à malformação e à produção de uma menor quantidade de células germinativas viáveis.

As alterações a nível das células germinativas, por nós encontradas no mutante, envolvem os derivados mitocondriais, o axonema, o núcleo e a membrana plasmática. São encontrados derivados mitocondriais extranumerários. No axonema todos os elementos tubulares estão presentes, porém estes não apresentam o padrão normal de organização, isto é,  $9 + 9 + 2$  microtúbulos interconectados por fibras eletrondensas. No núcleo frequentemente temos um padrão anormal de compactação do material cromatínico. A membrana plasmática, com frequência está ausente ou rompida, demonstrando ser bastante frágil.

Com isto, temos a eliminação de inúmeras células es-

permáticas com alterações morfofuncionais e, conseqüentemente, uma redução no número destas células por cisto.

Uma defasagem no processo de maturação da célula espermática é observada, pois frequentemente temos no interior de um cisto organizado, grupos de células em diferentes estádios de maturação, levando a supor uma assincronia no mecanismo intrínscico que desencadeia a diferenciação destas células. Esta defasagem ocorre ainda em todo o processo da espermiogênese, pois em estudo comparativo com a linhagem selvagem, utilizando machos da mesma idade, verifica-se, nas diferentes zonas testiculares, um atraso de todo o processo da espermiogênese no mutante, o que nos leva a pensar em alguma alteração hormonal que, além da interferência no comportamento do animal, tem ação sobre o desenvolvimento das células germinativas.

Estas alterações morfofuncionais nas células espermáticas podem também estar relacionadas com as alterações observadas nas células císticas. Com grande frequência encontramos as células císticas em processo degenerativo levando à desorganização do cisto e conseqüente mistura de células espermáticas em diferentes estádios de maturação. Com isto, as células germinativas não terão as condições necessárias para a continuidade do processo de diferenciação, conseqüentemente sofrem degeneração e posterior eliminação.

Entretanto, as células espermáticas do mutante que atingem a espermateca não apresentam alterações morfológicas em relação ao tipo selvagem.

Portanto, os mecanismos intrínscicos das próprias células espermáticas e as alterações nas células císticas levam o processo da espermiogênese no mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata* a ter uma defasagem e culminar com uma provável diminuição no número de espermatozoides liberados do interior do testículo.

## 6 SUMMARY

In the mutant called "pink eye" of *Ceratitis capitata*, which is known to be less fertile and has modified behavioral patterns, the differentiation of most of the germinal cells follows that described in the wild type, resulting finally in the formation of the mature spermatozoon, a highly specialized cell, ready to participate in the fertilization process.

For our ultrastructural investigation, the customary preservation methods were employed, as well as cytochemical methods for acid phosphatase and arylsulphatase. A small number of alterations of the spermatogenesis were found, leading to the production of a reduced number of viable cells.

These alterations of the germinal cells found in the mutant occur in mitochondrial derivatives, axoneme, nucleus and plasma membrane. Extranumerary mitochondrial derivatives were found. All the microtubular elements of the axonemes are present but appear disorganized, not forming the typical  $9 + 9 + 2$  arrangement, interconnected by dense fibers. Abnormal condensation of the chromatin has been found in numerous nuclei. The plasma membrane is frequently broken or missing, demonstrating a greater fragility in the mutant.

Due to the elimination of morpho-functionally modified cells, a smaller number of spermatids reach maturity within the cysts.

Another irregularity in the maturation process gives rise to cysts with cells in different stages of maturity, suggesting an asynchro-

nism of the intrinsic mechanism of maturation of the germinal cells. A general retardation affects the entire process of spermiogenesis, as seen in comparison of mutant and wild type males of the same age, in which the different zones of the testicles show a distinctly slower development of the mutant. This suggests a possible hormonal alteration which affects the development of the germinal cells, as well as the behavioral traits of the fly.

Morpho-functional modifications of the spermatic cells may also be related to the changes observed in cyst cells. Very frequently, precociously degenerating cyst cells are seen, disrupting the cystic organization and mixing cells in different stages of maturation. These disarranged cells can no longer develop in a normal manner and therefore are enzymatically eliminated.

However, the mutant sperm cells that are transferred to and stored in the spermathecae do not present alterations in relation to the wild type.

It is, therefore, due to intrinsic mechanisms of the sperm cells and cyst cells that the spermiogenesis of the "pink eye" mutant of *Ceratitis capitata* is retarded and results in an apparently smaller number of free-swimming spermatozoa in the testicles.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANASTASIA-SAWICKI, J. & MACINTYRE, R.J. Ultrastructural histochemical localization of acid phosphatase in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Histochem. Cytochem.*, 24(2): 463-7, 1976.
- ANDERSON, W.A. Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster*: the effect of elevated temperature on spermiogenesis. *Mol. Gen. Genet.*, 99(3): 257-73, 1967.
- ANDERSON, W.A. Cytochemistry of sea urchin gametes. III. Acid and alkaline phosphatase activity of spermatozoa and fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 25 (1/2): 1-14, 1968.
- ANDERSON, W.A.; PERSONNE, P. & ANDRÉ, J. Chemical compartmentalization in *Helix* spermatozoa. *J. Microscopie*, 7: 367-90, 1968.
- ARSTILA, A.V.; HELMINEN, H. & KALIMO, H. Possible sources of error in demonstrating aryl sulfatase. I. Incubation and postosmication. *J. Ultrastruct. Res.*, 20: 249, 1967.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Estudo citoenzimológico em túbulos de malpighi de *Triatoma infestans* Klug. Campinas, 1982. 175 p. Tese (Mestrado). Instituto de Biologia, UNICAMP.
- BACCETTI, B. The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 169-81.
- BACCETTI, B. Insect sperm cells. *Adv. Insect Physiol.*, 9: 315-97, 1972.

- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E.; BURRINI, A.G. & ROSATI, F. Histochemical observations on the insect sperm cell by electron microscope. *J. Ultrastruct. Res.*, 37: 248-9, 1971a.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; PERITI, P.; PIANTELLI, F.; ROSATI, F. & SELMI, G. Structure and function in the spermatozoon of *Bacillus rossius*. XIX. The spermatozoon of Arthropoda. *J. Ultrastruct. Res.*, 44(suppl. 12): 1-73, 1973.
- BACCETTI, B. & DALLAI, R. The spermatozoon of Arthropoda. XXVII. Uncommon axonema patterns in different species of the Cecidomyid flies. *J. Ultrastruct. Res.*, 55: 50-69, 1976.
- 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.
- BAIRATI, A. Struttura ed ultrastruttura dell' apparato genitale maschile di *Drosophila melanogaster* Meig. I. Il testicolo. *Z. Zellforsch.*, 76: 56-99, 1967.
- 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. p. 333-45.
- BARKA, T. Electron histochemical localization of acid phosphatase activity in the small intestine of mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 229-38, 1964.
- BARKA, T. & ANDERSON, P.J. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 741, 1962. Apud ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- BEAULATON, J. & PERRIN-WALDEMER, C. Localisation ultrastructurale d'une activité phosphatasique acide dans les spermatides et les spermatozoïdes de *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 276: 2277-80, 1973.
- BEIG, D. & CRUZ-LANDIM, C. Sperm reabsorption in sea urchin (*Echinometra*, Locunter). *Ciência e Cultura*, 27(2): 221-8, 1975.
- BIGLIARDI, E.; BACCETTI, B.; BURRINI, A.G. & PALLINI, V. The spermatozoon of Arthropoda. XII. The distribution of some enzymes in the insect sperm tail. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**.

- Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 451-63.
- BRICK, D.; LIFSCHITZ, E. & FRIEDLÄNDER, M. Mitochondria differentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: an ultrastructural analysis in the male sterile mutant ms(1)413. *J. Ultrastruct. Res.*, 66: 151-63, 1979.
- BUCHWALOW, I.B. & UNGER, E. Enzyme activity of nuclear ribonucleoproteins. *Exp. Cell Res.*, 106: 139-50, 1977.
- CAETANO, F.H. Ultra-estrutura dos espermatozoides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). *Naturalia*, 5: 105-11, 1980.
- CANTACUZÉNE, A. L'annexe centriolaire du spermatozoïde des insectes. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 553-63.
- CARDOSO, A.M.P. Análise genética de mutantes morfológicos obtidos com R-UV sobre ovos de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). Campinas, 1987. 136 p. Tese (Mestrado). Instituto de Biologia, UNICAMP.
- CARDOSO, A.M.P.; SOUZA, H.M.L. & BARACHO, I.R. Análise genética de um mutante para a cor de olho de *Ceratitis capitata* Weid. (Diptera - Tephritidae). 36<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. p. 854, 1984.
- CHEMES, H.E. & FAWCETT, D.W. Lysosomes and acid phosphatase localization in the seminiferous epithelium of the rat. *Rev. Microsc. Eletrôn.*, 5(1): 336-7, 1978.
- CRUZ-HÖFLING, M.A. da ; CRUZ-LANDIM, C. da & KITAJIMA, E.W. The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 42 (1): 69-78, 1970.
- CRUZ-LANDIM, C. da Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Myogryllus* sp. (Orthoptera, Gryllidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 39(4): 783-91, 1979a.
- CRUZ-LANDIM, C. da Flagellar organization in *Myogryllus* sp. (Orthoptera, Gryllidae). *Dusenja*, 11(3): 161-4, 1979b.
- CRUZ-LANDIM, C. da Nota sobre a formação de membranas durante a espermatogênese de *Conocephalus saltator* (Saussure) (Orthoptera, Conocephalidae). *Ciência e Cultura*, 32(4): 479-83, 1980.
- CRUZ-LANDIM, C. da & BEIG, D. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). *Intern. J. Inv. Reprod.*, 2: 271-83, 1980.

- CRUZ-LANDIM, C. da ; BEIG, D. & MORAES, R.L.M.S. Cellular resorption figures during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, 5: 113-9, 1980.
- CRUZ-LANDIM, C. & FERREIRA, A. Aspectos ultra-estruturais da diferenciação nuclear durante a espermatogênese de *Myogryllus* sp. (Orthoptera). *Rev. Brasil. Biol.*, 36(3): 561-76, 1976.
- CRUZ-LANDIM C. da & FERREIRA, A. Studies on the fine structure of cyst cells and its relationships with the spermatids on *Myogryllus* sp. (Orthoptera). *Rev. Brasil. Biol.*, 41(2): 401-6, 1981.
- CRUZ-LANDIM, C. da & KITAJIMA, E.W. The ultrastructure of mature spermatozoa of corn leafhopper, *Dalbulus maidis* Del. and W. (Homoptera: Cicadellidae). *J. Submicr. Cytol.*, 4: 75-82, 1972.
- CRUZ-LANDIM, C. da & MORAES, L.M.S. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, 27: 167-75, 1980.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. Characteristics of the sperm structure in *Heteroptera* (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.*, 164: 301-9, 1980.
- DALLAI, R. & MAZZINI, M. Sperm axonema of two rows of doublets reversely oriented in the gall-midge *Lestremis* (Diptera, Cecidomyiidae). *J. Ultrastruct. Res.*, 82: 19-26, 1983.
- DELTOUR, R.; FRANSOLET, S. & LOPPES, R. Inorganic phosphate accumulation and phosphatase activity in the nucleus of maize embryo root cells. *J. Cell Sci.*, 47: 77-89, 1981.
- DOLDER, H. Alguns dados obtidos através da pesquisa de fosfatase ácida na espermatogênese de *Triatoma infestans* Klug. Resumos VIII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. p. 27, 1981.
- DUMSER, J.B. The regulation of spermatogenesis in insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 25: 341-69, 1980.
- ERICSSON, J.L.E. & HELMINEN, H.J. Observations on the localization of arylsulphatase activity in renal cortical tubules. *Histochemie*, 9: 181-8, 1967.
- ERICSSON, J.L.E. & TRUMP, B.F. Observations on the application to electron microscopy of the lead phosphatase technique for the demonstration of acid phosphatase. *Histochemie*, 4: 470, 1965. Apud ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company,

1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- ESSNER, E. & NOVIKOFF, A.B. Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 773, 1961. Apud ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- FAWCETT, D.W.; ANDERSON, W.A. & PHILLIPS, D.M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Develop. Biol.*, 26: 220-51, 1971.
- FAWCETT, D.W.; ITO, S. & SLAUTTERBACK, D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5(3): 453-60, 1959.
- FAWCETT, D.W. & PHILLIPS, D.M. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat. Rec.*, 165: 153-84, 1969.
- FOLLIOT, R. & MAILLET, P. Ultrastructure de la spermiogénèse et du spermatozoïde de divers insectes Homoptères. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 289-300.
- GARBINI, C.P. & IMBERSKI, R.B. Spermatogenesis in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralididae). *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 96(2): 189-203, 1977.
- GASSNER, G.; CHILDRESS, D. & KLEMETSON, D.J. Spermiogenesis in boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 4(2): 115-25, 1975.
- 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.
- GOLDFISCHER, S.; ESSNER, E. & NOVIKOFF, A.B. The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 72-95, 1964.
- GÖMÖRI, G. **Microscopic histochemistry: principles and practice**.

- University of Chicago Press, 1952. Apud ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- HABLISTON, D.L.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: the effects of abnormal association of centrosome and nucleus in mutant **ms(1)6S**. *J. Ultrastruct. Res.*, 60(2): 221-34, 1977.
- HARDY, R.W.; TOKUYASU, K.T. & LINDSLEY, D.L. Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes. *Chromosoma*(Berl.), 83: 593-617, 1981.
- HELMINEN, H.J.; ERICSSON, J.L.E. & ORRENIUS, S. Studies on mammary gland involution. IV. Histochemical and biochemical observations on alterations in lysosomes and lysosomal enzymes. *J. Ultrastruct. Res.*, 25: 240-52, 1968.
- HESS, O. & MEYER, G.F. Genetic activities of the Y chromosome in *Drosophila* during spermatogenesis. In: CASPARI, E.W. **Advances in genetics**. New York, Academic Press, 1968. v. 14, cap. 4, p. 171-223.
- HOAGE, T.R. & KESSEL, R.G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 6-32, 1968.
- HOLT, S.J. & HICKS, R.M. The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 47, 1961. Apud ESSNER, E. Phosphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1973. v. 1, cap. 2, p. 44-76.
- HOPUSU-HAVU, V.K.; ARSTILA, A.U.; HELMINEN, H.J.; KALIMO, H.O. & GLENNER, G.G. Improvements in the method for the electron microscopic localization of arylsulphatase activity. *Histochemie*, 8: 54-64, 1967.
- HOPUSU-HAVU, V.K.; HELMINEN, H. Sulphatases. In: HAYAT, M.A. **Electron microscopy of enzymes principles and methods**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1974. vol. 2, cap. 5, p. 90-109.
- HUMASON, G.L. Solution preparation. In: HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**, Third edition. San Francisco, W. H. Freeman and

- Company, 1972. cap. 28, p. 529-48.
- ISHIZUKA, I.; SUZUKI, M. & YAMAKAWA, T. Isolation and characterization of a novel sulfoglycolipid, "seminolipid", from boar testis and spermatozoa. *J. Biochem.*, 73: 77-87, 1973.
- KALIMO, H.; ARSTILA, A.V.; HELMINEN, H. & HOPUSU-HAVU, V.K. Possible sources of error in demonstrating arylsulphatase. II. Staining. *J. Ultrastruct. Res.*, 20: 295, 1967.
- 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: 677-94, 1967.
- KESSEL, R.G. Spermiogenesis in the dragonfly with special reference to a consideration of the mechanisms involved in the development of cellular asymmetry. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970, p. 531-52.
- KESSEL, R.G. Origin, differentiation, distribution and possible functional role of annulate lamellae during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, 75: 72-96, 1981.
- KESSEL, R.G. The relationships of annulate lamellae, fibrogranular bodies, nucleolus, and polyribosomes during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, 91: 183-91, 1985.
- KIEFER, B.I. Ultrastructural abnormalities in developing sperm of X/0 *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 54: 144-52, 1966.
- KIEFER, B.I. Y-mutants e spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* *Genetics*(Suplem.), 60: 192, 1968.
- KIEFER, B.I. Phenotypic effects of Y chromosome mutations in *Drosophila melanogaster*. I. Spermiogenesis and sterility in **KL-1**<sup>-</sup> males. *Genetics*, 61 (1): 157-66, 1969.
- KIEFER, B.I. Development, organization, and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. *J. Cell Sci.*, 6: 177-94, 1970.
- LONGO, F.J. & ANDERSON, E. Sperm differentiation in the sea urchins *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 27: 486-509, 1969.
- LOVE, R.; STUDZINSKI, G.P. & WALSH, R.J. Nuclear, nucleolar and cytoplasmic acid phosphatases in cultured mammalian cells. *Exptl. Cell*

- Res.*, 58: 62-72, 1969.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409-14, 1961.
- McMASTER-KAYE, R. & KAYE, J.S. Acrosomal bands: specialized structures on the nuclear surface for holding the acrosomal granule. *J. Ultrastruct. Res.*, 71: 233-48, 1980.
- MEDEIROS, M. Caracterização ultra-estrutural de espermatozoides eupirenes e apirenes de *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), ao nível do testículo e das vias genitais dos imagos macho e fêmea até a espermateca. Campinas, 1986. 122 p. Tese (Mestrado) Instituto de Biologia, UNICAMP.
- MEYER, G.F. Spermiogeneses in normalen und Y-defizienten männchen von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila hydei*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 84: 141-75, 1968.
- MEYER, G.F. Phenocopies of Y deficiencies and extraordinary differentiation types in spermiogenesis of *Drosophila*. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 347-55.
- MIYAYAMA, H.; SOLOMON, R.; SASAKI, M.; LIN, C. & FISHMAN, W.H. Demonstration of lysosomal and extralysosomal sites for acid phosphatase in mouse kidney tubule cells with *p*-nitrophenylphosphate lead salt technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 23(6): 439-51, 1975.
- MOSES, M.J. & WILSON, M.H. Spermiogenesis in an Iceryine Coccid, *Steatococcus tuberculatus* Morrison. *Chromosoma*(Berl.), 30: 373-429, 1970.
- OMURA, Y.; UENO, S. & UECK, M. Cytochemical demonstration of acid phosphatase activity in the pineal organ of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 245: 171-6, 1986.
- PAAVOLA, L.G. The corpus luteum of the guinea pig. II. Cytochemical studies on the golgi complex, GERL and lysosomes in luteal cells during maximal progesterone secretion. *J. Cell Biol.*, 79: 45-88, 1978a.
- PEROTTI, M.E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. *J. Submicr. Cytol.*, 1: 171-96, 1969.
- PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 44: 181-98, 1973.
- PERRIN-WALDEMER, C. & BEAULATON, J. Sur la localisation ultrastruc-

- turale d'une activité phosphatasique acide au début de la spermatogénèse (spermatogonies et spermatocytes) chez *Drosophila melanogaster*. Etude préliminaire des corps multivesiculaires. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 276: 2027-30, 1973.
- PHILLIPS, D.M. Substructure of flagellar tubules. *J. Cell Biol.*, 31: 635-8, 1966.
- PHILLIPS, D.M. Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insect species. *J. Cell Biol.*, 40(1): 28-43, 1969.
- PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44: 243-77, 1970a.
- PHILLIPS, D.M. Insect flagellar tubule patterns. Theme and variations. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970c. p. 263-73.
- PHILLIPS, D.M. **Spermiogenesis** New York, Academic Press, 1974a. 68 p.
- PHILLIPS, D.M. Structural variants in invertebrate sperm flagella and their relationship to motility. In: SLEIGH, M.A. **Cilia and flagella** London, Academic Press, 1974b. cap. 14, p. 379-402.
- 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 Lincei, 1970. p. 301-10.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Citodiferenciação ultra-estrutural durante a espermiogênese normal de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera - Tephritidae). Campinas, 1983. 93 p. Tese (mestrado). Instituto de Biologia, UNICAMP.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, M.A.H. Observações ultra-estruturais da diferenciação nuclear na espermiogênese de *Ceratitis capitata* Weid. Resumos VIII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. p. 28, 1981.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, M.A.H. A ultra-estrutura do espermatozóide de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera - Tephritidae). *Ciência e Cultura*, 37(12): 2067-71, 1985.
- RADU, M.; RÖSSLER, Y. & KOLTIN, Y. The chromosomes of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Weid.): Karyotype and chromosomal

- organization. *Cytologia*, 40: 823-8, 1975.
- RATTNER, J.B. & BRINKLEY, B.R. Ultrastructure of mammalian spermiogenesis. III. The organization and morphogenesis of the manchette during rodent spermiogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, 41: 209-18, 1972.
- REMY, L.; MICHEL-BECHET, M. & ATHORÏEL-HAON, A. M. Etude critique de localisations phosphatasiques acides extralysosomiales de cellules folliculaires thyroïdiennes par la réaction de GÖMÖRI. *Histochemistry*, 13: 131-45, 1975.
- ROBISON, W.G.Jr. Microtubules in relation to the motility of a sperm synctium in an armored scale insect. *J. Cell Biol.*, 29: 251-65, 1966.
- ROBISON, W.G.Jr. Unusual arrangements of microtubules in relation to mechanisms of sperm movement. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 311-20.
- ROMRELL, L.J.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: an autosomal mutant (ms(2)3R) demonstrating failure of meiotic cytokinesis. *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 563-77, 1972a.
- ROMRELL, L.J.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: an autosomal mutant (ms(2)10R) demonstrating disruption of the axonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 578-90, 1972b.
- ROSATI, F.; SELMI, G. & MAZZINI, M. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *J. Submicr. Cytol.*, 8(1): 51-67, 1976.
- RÖSSLER, Y. Recombination in males e females of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with and without chromosomal aberrations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 75(6): 619-22, 1982.
- RÖSSLER, Y. & KOLTIN, Y. The genetics of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: three morphological mutations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 69(4): 604-8, 1976.
- SASAKI, M. & FISHMAN, W.H. Dual ultrastructural localization of acid phosphatase in mouse kidney tubule cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 21(7): 653-60, 1973.
- SCHRANKEL, K.R. & SCHWALM, F.E. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis.

- Cell Tiss. Res.*, 153: 45-53, 1974.
- SERRANO, J.A.; SHANNON, W.A.Jr. ; STERNBERGER, N.J.; WASSERKAUG, H.L.; SERRANO, A.A. & SELIGMAN, A.M. The cytochemical demonstration of prostatic acid phosphatase using a new substrate phosphorylcholine. *J. Histochem. Cytochem.*, 24 (10): 1064-56, 1976.
- SHAY, J.W.; DOBSON, W.J.; SIMMONS, E.E., BIESELE, J.J. & BRELAND, O.P. Subunits of flagellar accessory tubules. *Tissue and Cell*, 1 (4): 593-6, 1969.
- SHOUP, J.R. Spermiogenesis in wild type and in a male sterility mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.*, 32(3): 663-75, 1967.
- SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 608-21, 1976a.
- SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 622-33, 1976b.
- SMITH, R.E. & FARQUHAR, M.G. Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.*, 31: 319-47, 1966.
- SOUZA, M. & AZEVEDO, C. Cytochemical study on the spermatozoon and at early fertilization in *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea). *Biol. Cell*, 56: 79-84, 1986.
- STAFSTROM, J.P. & STAEHELIN, A. Are annulate lamellae in the *Drosophila* embryo the result of over production of nuclear pore components? *J. Cell Biol.*, 98: 699-708, 1984.
- STANLEY, H.P. An electron microscope study of spermiogenesis in the teleost fish *Oligocottus maculosus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 27: 230-43, 1969.
- 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): 433-66, 1972.
- SZÖLLÖSI, A. Electron study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect Orthoptera). *J. Ultrastruct. Res.*, 50(3): 322-46, 1975.
- SZÖLLÖSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of the Locust *Locusta migratoria*. I. Abnormalities in differentiation of the cytoplasmic organelles. *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 202-14, 1976a.

- SZÖLLÖSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of the Locust *Locust migratoria*. II. Abnormalities in differentiation of the nucleus. *J. Ultrastruct. Res.*, 54: 215-23, 1976b.
- TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. Fine structural cytochemistry of the centriolar adjunct in Grasshopper spermatids. *Mikroskope(Wien)*, 36: 35-42, 1980.
- TILNEY, L.G.; BRYAN, J.; BUSH, J.; FUJIWARA, K., MOOSEKER, M.S.; MURPHY, D.B. & SNYDER, D.H. Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J. Cell Biol.*, 59: 267-75, 1973.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axonema and mitochondrial derivatives. *Exptl. Cell Res.*, 84: 239-50, 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- 29, 1975a.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of "onion" nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.*, 53: 93- 112, 1975b.
- TOKUYASU, K.T.; PEACOCK, W.J. & HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z. Zellforsch.*, 124: 479-506, 1972a.
- TOKUYASU, K.T.; PEACOCK, W.J. & HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. *Z. Zellforsch.*, 127: 492-525, 1972b.
- VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-8, 1965.
- VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. Métodos analíticos aplicados à bioquímica In: VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. cap. 1, p. 1-96.
- VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. *Z. Zellforsch.* , 101: 13-27, 1969.
- WARNER, F.D. New observations on flagellar fine structure: the relationship between matrix structure and the microtubule component of the axonema. *J. Cell Biol.*, 47: 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): 210-32, 1971.
- WARNER, F.D. The fine structure of the ciliary and flagellar axonema. In: SLEIGH, M.A. *Cilia and flagella*. London, Academic Press, 1974. cap. 2, p. 11-37.
- WASHITANI, I. & SATO, S. On the reliability of the lead salt precipitation method of acid phosphatase localization in plant cells. *Protoplasma*, 89: 157-70, 1976.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4(4): 475-8, 1958.
- 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): 242-58, 1974.
- WOJCZYK, B. Lysosomal arylsulphatases A and B from horse blood leukocytes: purification and physico-chemical properties. *Biol. Cell*, 57: 147-52, 1986.
- YAMATO, K.; HANDA, S. & YAMAKAWA, T. Purification of arylsulphatase A from boar testis and its activities toward seminolipid and sulfatide. *J. Biochem.*, 75: 1241-47, 1974.
- 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. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XX. Relationship between chromatoid bodies and centriole adjunct in spermatids of Grasshopper, *Acrida lata*. *Z. Zellforsch.*, 110: 231-42, 1970a.
- YASUZUMI, G.; Tsubo, I.; YASUDA, M.; SUGIOKA, T.; SAKAMOTO, H. & ASUZUMI, F. Electron microscope studies on atypical spermatids of pond snail *Cipangopaludina malleata* reeve, under consideration of conversion of DNA into polysaccharide. In: BACCETTI, B. ed **Comparative spermatology**. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970b. p. 401-13.
- YIN, W.; YANG, Y.; XUE, L. & DALLAI, R. A "13 + 0" axonemal pattern in the spermatozoon of *Neocondeellum dolichotarsum* (Insect, Protura). *J. Ultrastruct. Res.*, 93: 179-85, 1985.

Sônia Nair Bão

Este exemplar corresponde à redação  
final da tese defendida pela candidata  
(Sônia Nair Bão)  
e aprovada pela comissão julgadora.

Holden 05/11/87

Estudo ultra-estrutural da espermiogênese  
no mutante "olho róseo" comparativo à  
linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*  
Weidmann (Diptera, Tephritidae)

Campinas, 1987

B228e  
v.2  
8861/BC

Sônia Nair Bão

Estudo ultra-estrutural da espermiogênese  
no mutante “olho róseo” comparativo à  
linhagem selvagem de *Ceratitis capitata*  
Weidmann (Diptera, Tephritidae)

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre.

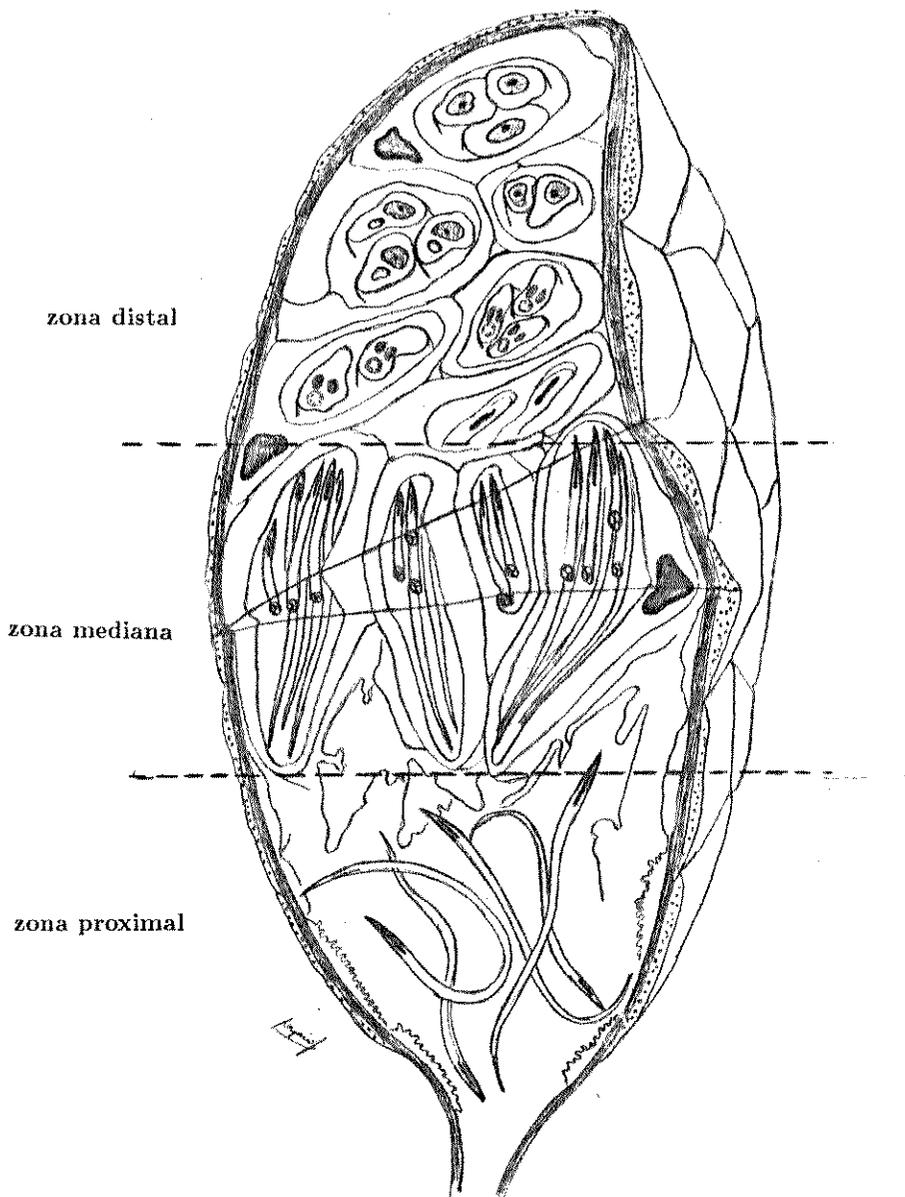
Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder  
Orientadora de Tese e Programa

Campinas, 1987

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

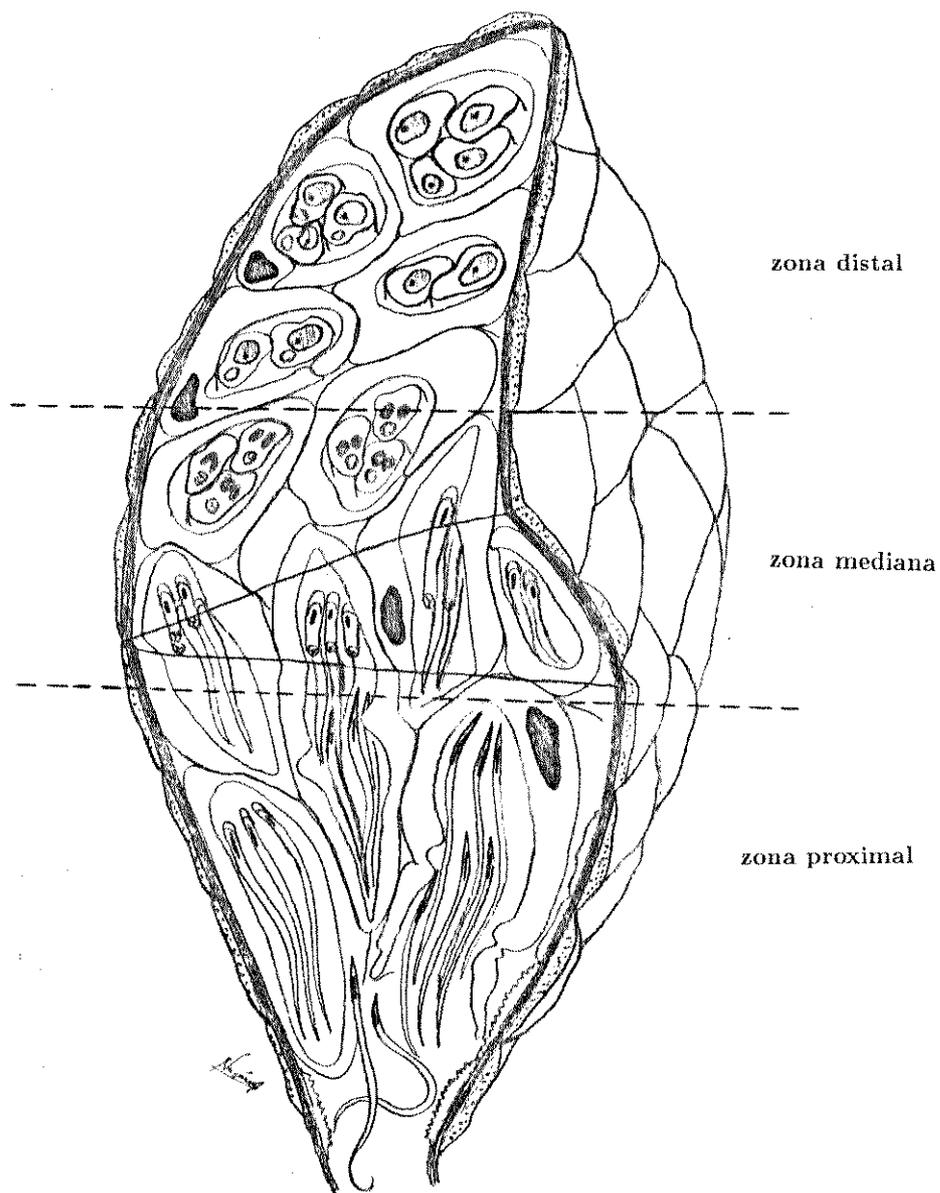
Volume II  
Ilustrações

O presente volume (Volume II) apresenta as micrografias organizadas em pranchas com as legendas explicativas referentes à cada figura. As abreviações e símbolos utilizados nas ilustrações constam das respectivas legendas.



### Desenho Esquemático 1

Organização do testículo em *Ceratitidis capitata*, linhagem selvagem.



## Desenho Esquemático 2

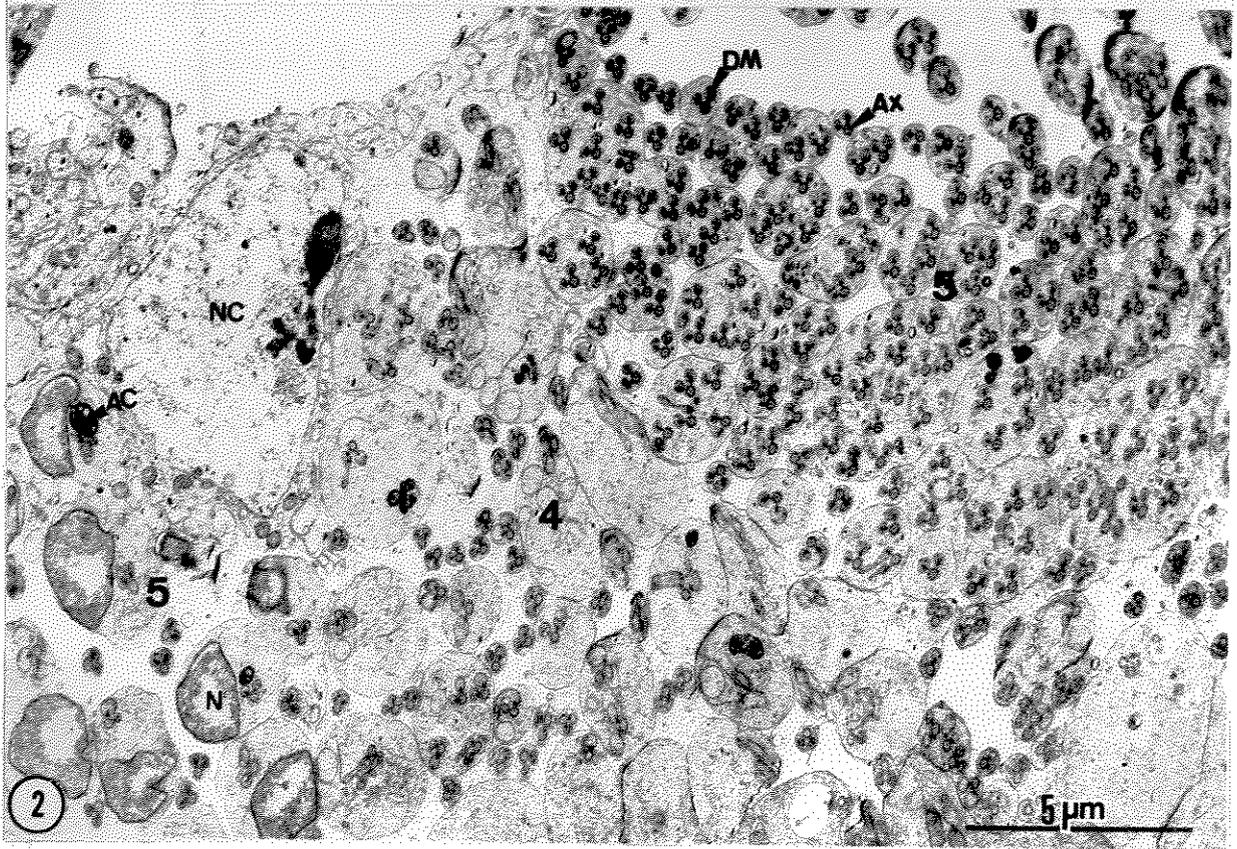
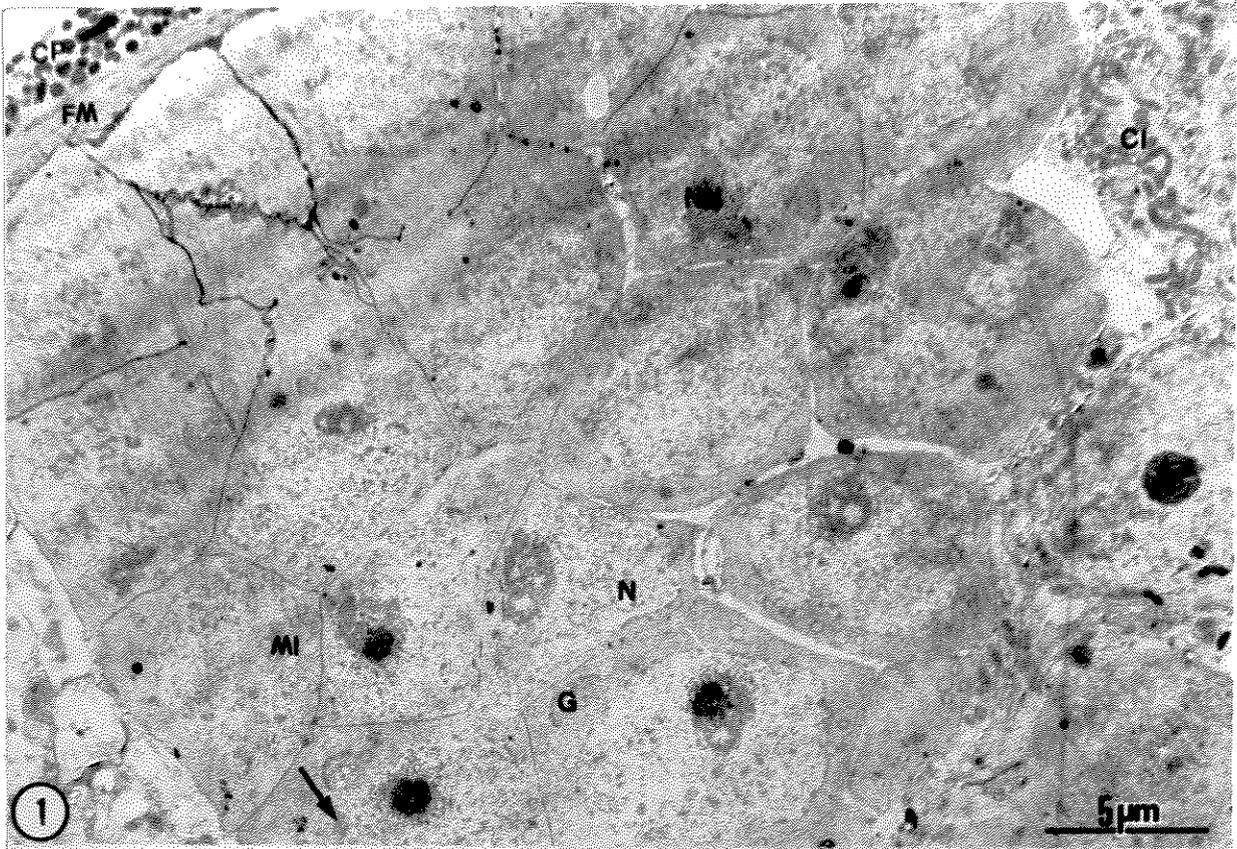
Organização do testículo em *Ceratitidis capitata*, mutante  
“olho róseo”.

## Figura 1 e 2

Cortes da zona distal (apical) de testículos de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 1** Espermatídes no estágio 1 do mutante “olho róseo”. A figura mostra: células pigmentadas (CP) e fibras musculares (FM) da parede do testículo; células que formam a parede dos cistos (CI). Nas espermatídes jovens observam-se núcleo (N) com áreas de cromatina condensada e com nucléolo (NU); lamelas anuladas (→); inúmeras mitocôndrias (MI) e complexo de Golgi (G). 4.400 X.

**Figura 2** Espermatídes nos estádios 4 e 5 de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. A figura mostra: núcleo de célula (NC) que forma a parede do cisto; nas espermatídes, núcleo (N) com áreas de cromatina condensada, adjunto do centríolo (AC), axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). 6.200 X.



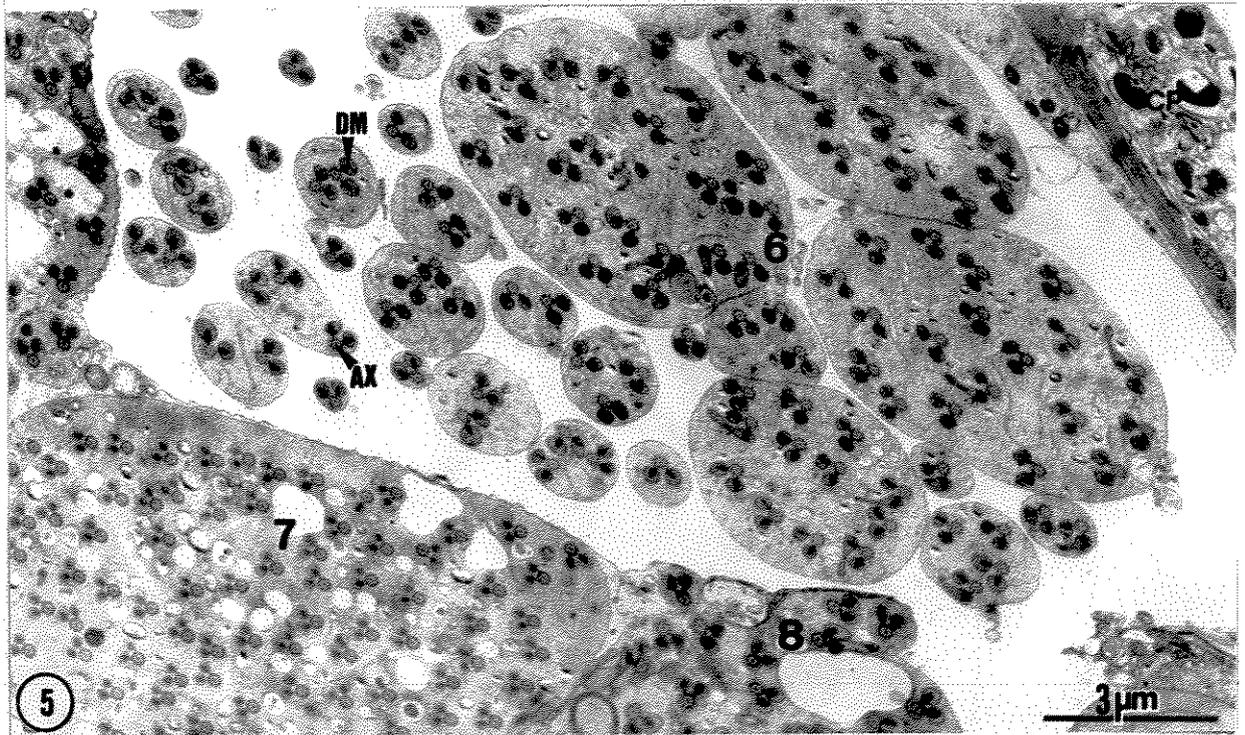
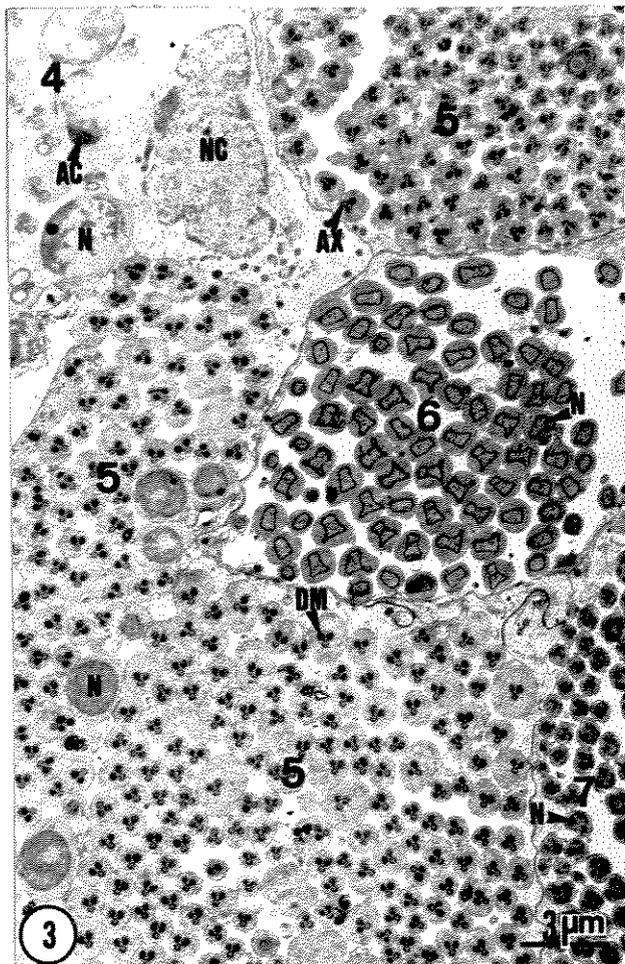
## Figuras 3 a 5

Cortes da zona mediana de testículos de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 3** Vários cistos com espermátides em estádios iniciais (4 e 5) e intermediários (6 e 7) de diferenciação do mutante "olho róseo". Observam-se: núcleo de célula (NC) que forma a parede do cisto; núcleos (N) de espermátides com cromatina em compactação; adjunto do centríolo (AC); axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). 3.900 X.

**Figura 4** Vários cistos de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, com espermátides em estádios intermediário (8) e adiantados no processo de maturação (9 e 10). Observam-se: células que formam a parede dos cistos (CI); núcleo (N) de espermátides com cromatina bastante compactada; axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). 3.400 X.

**Figura 5** Corte a nível da região caudal de espermátides de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, nos estádios intermediários (6, 7 e 8) de diferenciação. Observam-se: células pigmentadas (CP) e fibras musculares (FM) da parede do testículo; nas células espermáticas, axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). Vários flagelos estão no interior de uma massa citoplasmática comum. 7.700 X.



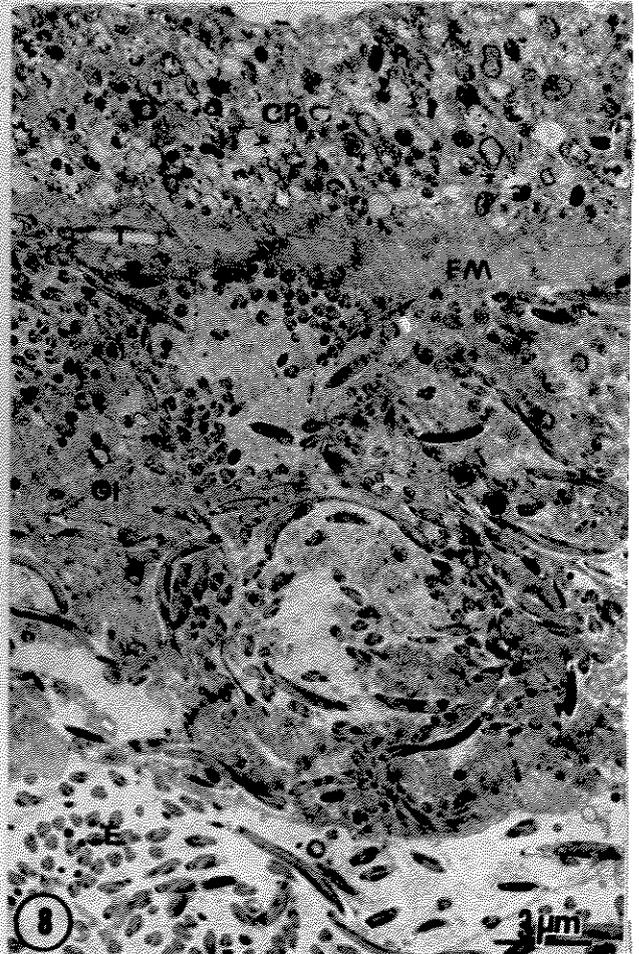
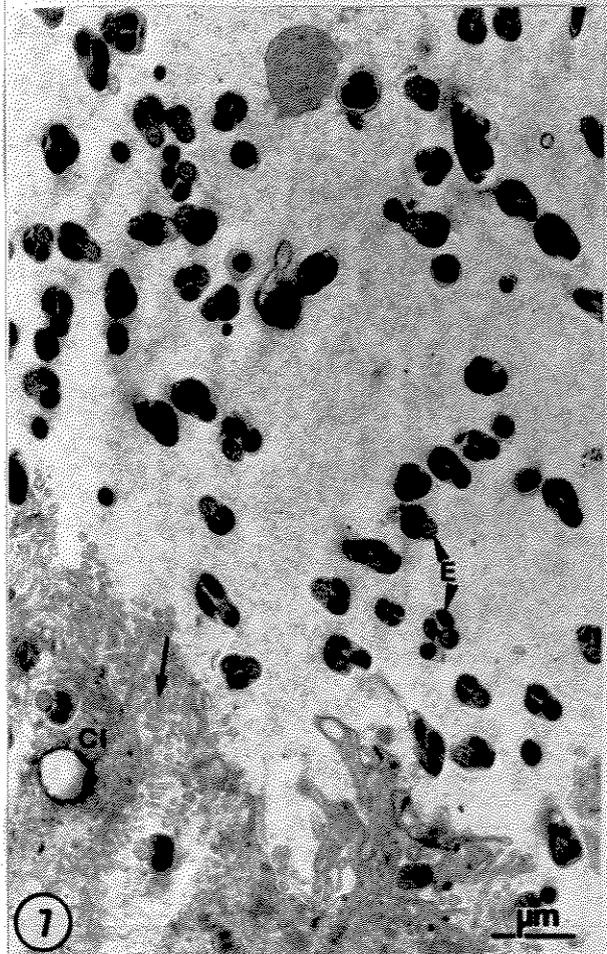
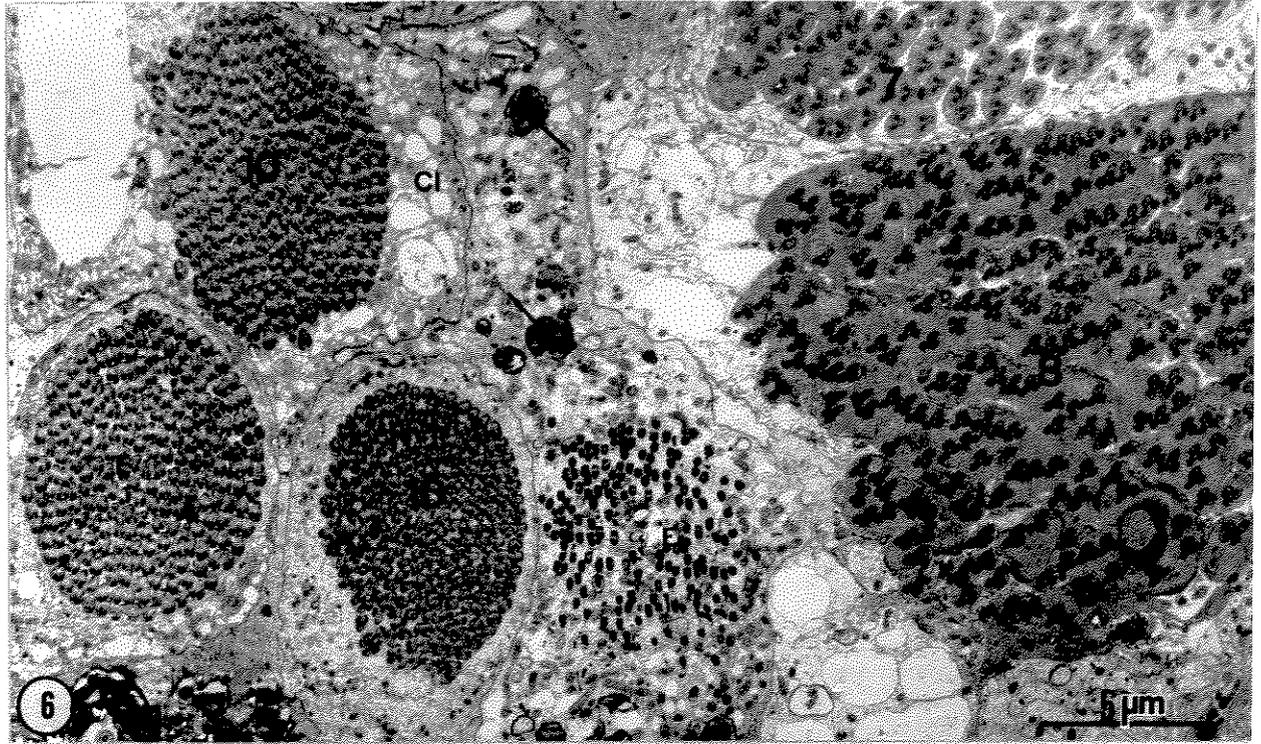
## Figuras 6 a 8

Cortes da zona proximal (basal) de testículos de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 6** Vários cistos, do mutante “olho róseo”, apresentando espermátides em estádios intermediários (7 e 8) e adiantado no processo de maturação (10), e espermatozóides maduros (E). A massa residual (→) de cisto contém ainda, espermatozóides em eliminação. As células císticas (CI) envolvem o conjunto de células germinativas. 4.800 X.

**Figura 7** Região terminal da zona proximal do testículo do mutante “olho róseo”. Observam-se: células que formam a parede dos cistos (CI) com inúmeras microvilosidades (→) e espermatozóides (E) sendo eliminados. 11.700 X.

**Figura 8** Região terminal da zona proximal do testículo de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. Observam-se: células pigmentadas (CP) e fibras musculares (FM) da parede do testículo; traquéia (T); células que formam a parede dos cistos (CI) em processo degenerativo e espermatozóides (E) sendo eliminados. 4.200 X.



## Figuras 9 a 13

Formação do complexo mitocondrial nos estádios iniciais do processo da espermiogênese em *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

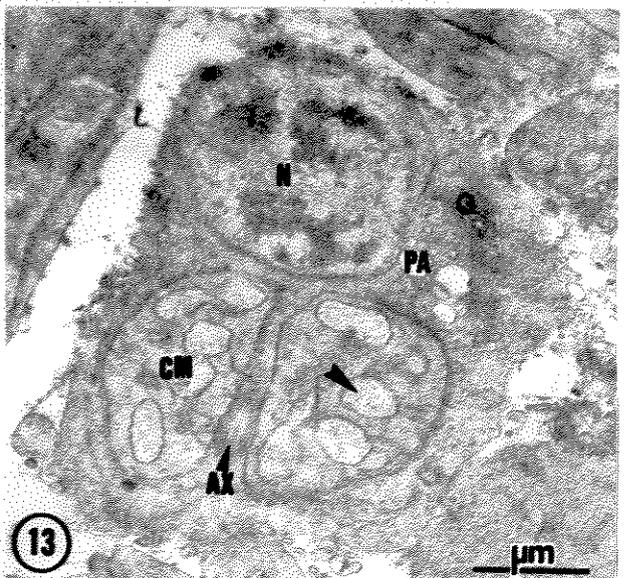
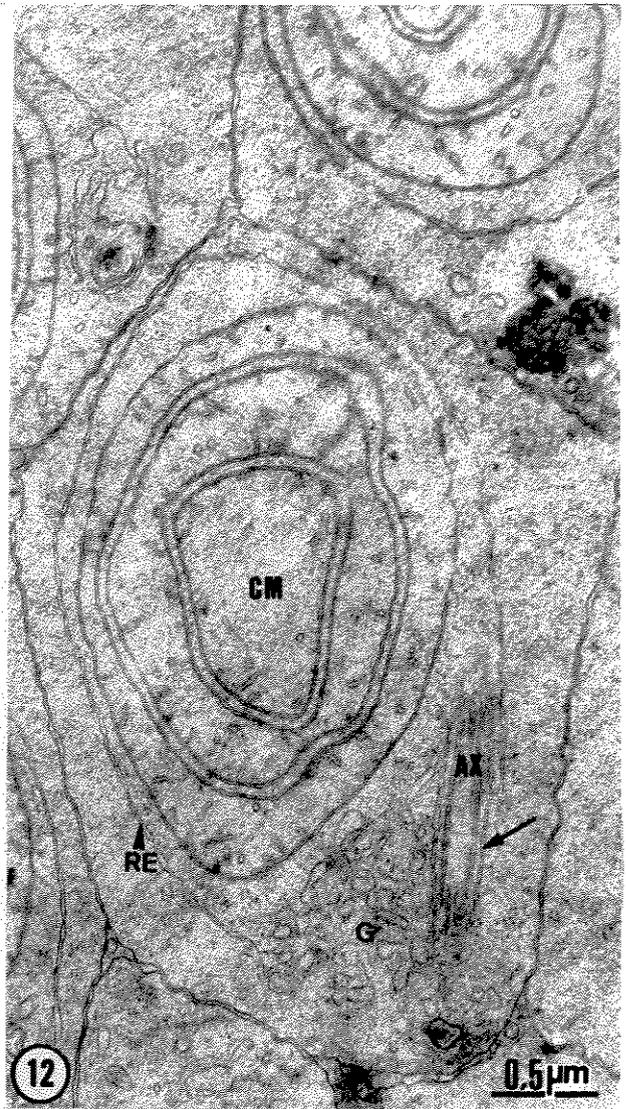
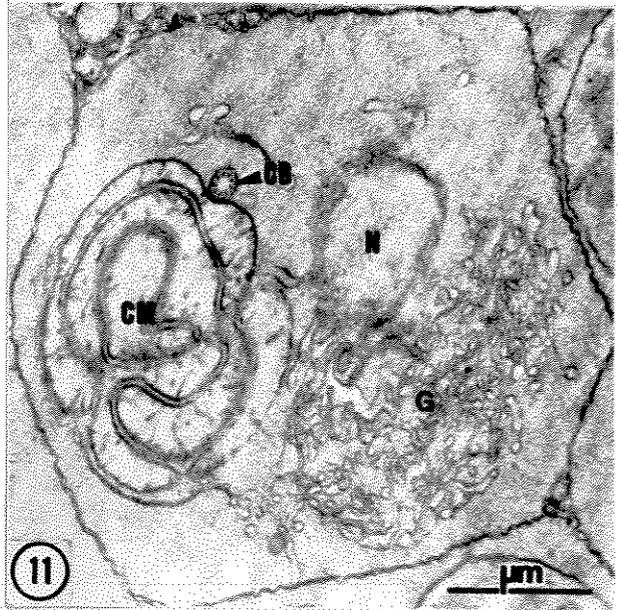
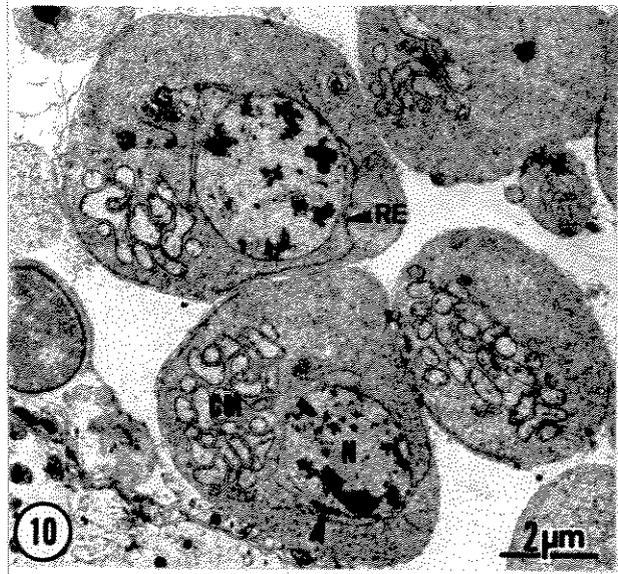
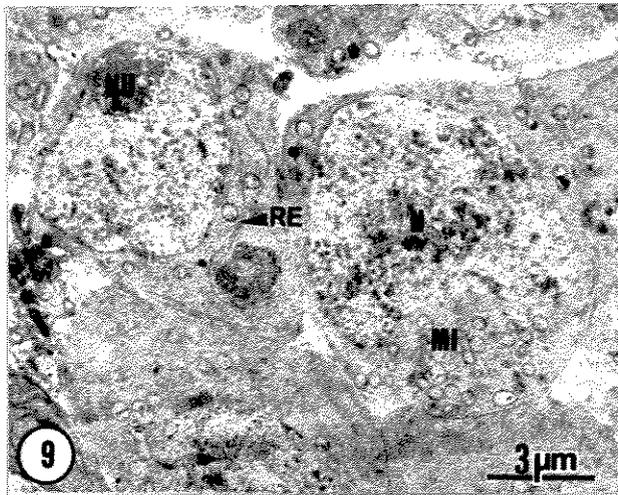
**Figura 9** Espermatídes, do mutante “olho róseo”, no estágio 1 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) com forma irregular e pequenas áreas de cromatina condensada; nucléolo (NU); conjunto de mitocôndrias (MI) e retículo endoplasmático (RE). 4.700 X.

**Figura 10** Espermatídes, do mutante “olho róseo”, no estágio 2 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) ovóide com áreas de cromatina condensada; complexos de poros nucleares (►); complexo mitocondrial (CM) em formação; complexo de Golgi (G) e retículo endoplasmático (RE). 6.600 X.

**Figura 11** A espermatíde no estágio 2, de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem, apresenta complexo mitocondrial (CM); corpúsculo basal (CB), zona de transição, em corte transversal; complexo de Golgi (G) bastante desenvolvido e núcleo (N) em corte tangencial. 19.600 X.

**Figura 12** A espermatíde no estágio 3, de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, apresenta complexo mitocondrial (CM) em forma de “cebola”; complexo de Golgi (G); axonema (AX) em corte oblíquo, circundado por dupla membrana lisa (→); cisternas do retículo endoplasmático (RE). 28.000 X.

**Figura 13** Espermatíde do mutante “olho róseo” no estágio 4 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) com áreas de cromatina condensada; complexo de Golgi (G); vesículas pró-acrossômicas (PA) em formação; axonema (AX) em corte oblíquo; complexo mitocondrial (CM) com porções citoplasmáticas (►) em seu interior. 15.300 X.



## Figuras 14 a 17

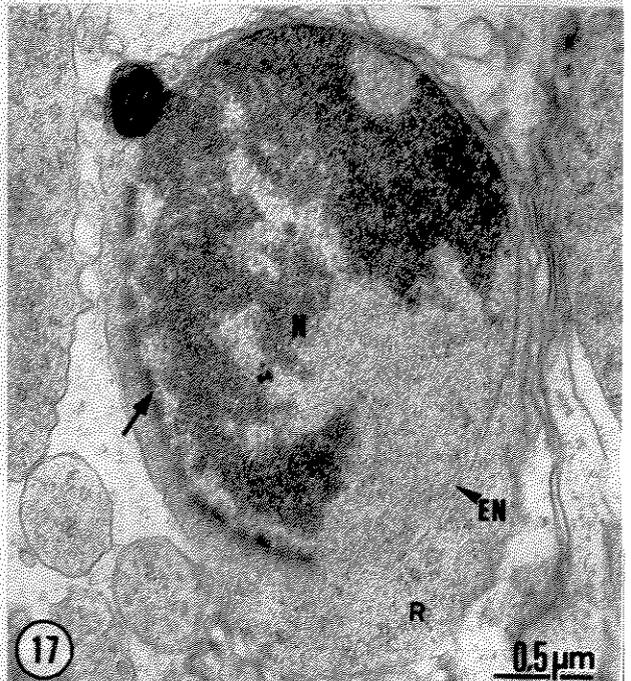
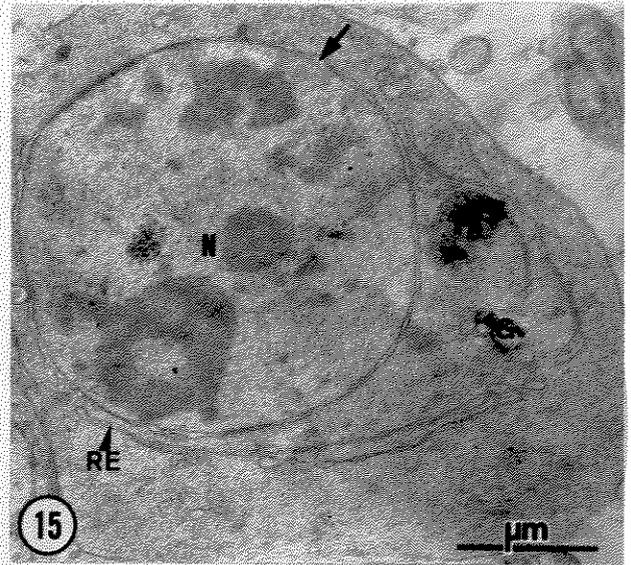
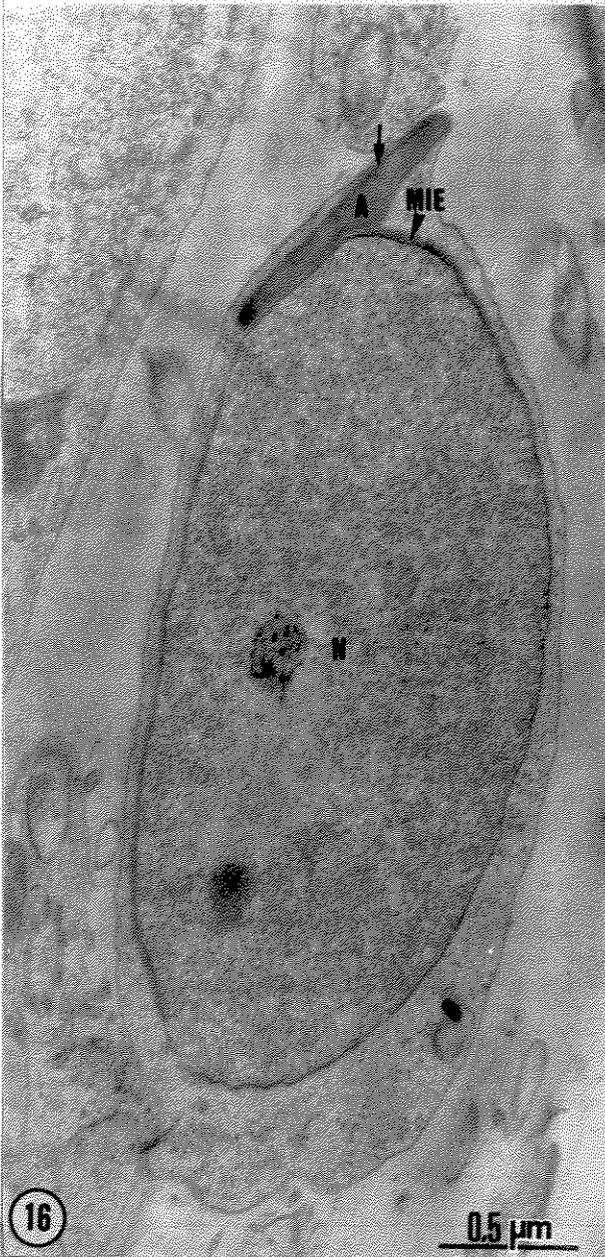
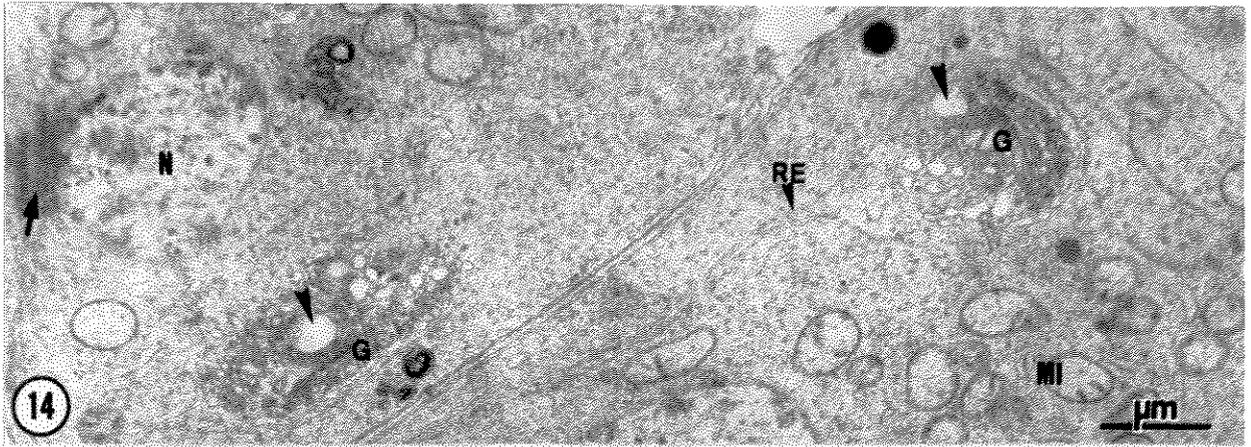
Formação do acrossoma nos estádios iniciais da espermiogênese do mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 14** As espermátides, no estágio 1 de diferenciação, apresentam lamelas anuladas (→) justapostas ao núcleo (N); mitocôndrias (MI); retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi (G) com inúmeras vesículas (▶). 14.400 X.

**Figura 15** Espermátide no estágio 3 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) ovóide com áreas de cromatina condensada; envólucro nuclear (→) bastante evidente; retículo endoplasmático (RE); algumas cisternas do complexo de Golgi (G) e vesícula pró-acrossômica (PA) pouco eletrondensa. 18.700 X.

**Figura 16** Na espermátide, no estágio 4 de diferenciação, encontram-se núcleo (N) em corte oblíquo, a cromatina com aspecto granular; acrossoma (A) com material eletrondenso, circundado por um complexo de dupla membrana (→); membrana intersticial eletrondensa (MIE) entre o acrossoma e o núcleo. 37.400 X.

**Figura 17** Espermátide no estágio 5 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) com extensas áreas de cromatina condensada; complexos de poros nucleares (→) em uma região específica do envólucro nuclear (EN) posterior ao acrossoma (A). Na região central do acrossoma, em corte transversal, a eletrondensidade é menor, em relação às porções periféricas. No citoplasma da espermátide ocorrem inúmeros ribossomos (R). 25.500 X.



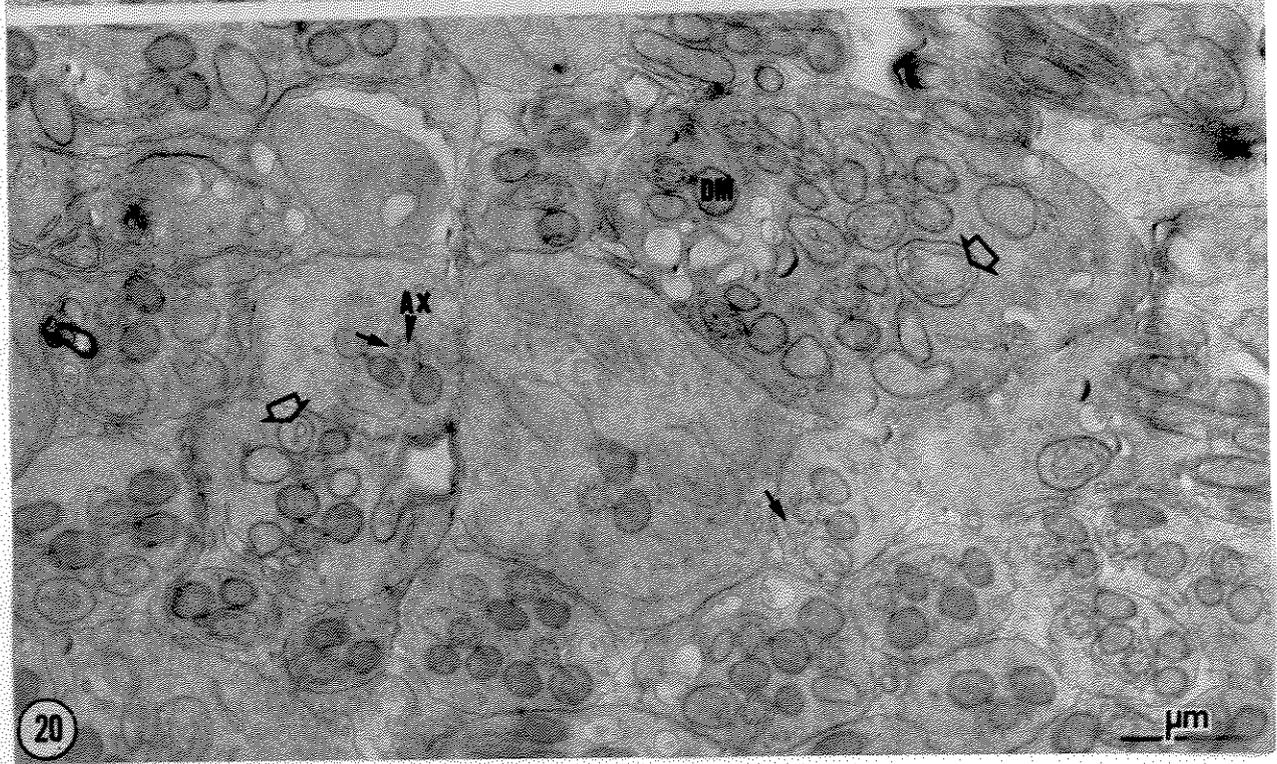
## Figuras 18 a 20

Cortes de testículo do mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%, pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 18** Espermátides no estágio 5 de diferenciação. A figura mostra: núcleo (N) com grandes áreas de cromatina condensada, anteriormente a este o acrossoma (A) bastante eletrondenso e posteriormente o adjunto do centríolo (AC). Em uma região específica do envólucro nuclear (EN), posterior ao acrossoma, agrupam-se complexos de poros nucleares ( $\rightarrow$ ); oposto a esta região, o envólucro não apresenta poros nucleares. No citoplasma de uma das espermátides encontra-se um corpúsculo multivesicular (\*). Observam-se ainda, axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). 13.900 X.

**Figura 19** Flagelos de espermátides no estágio 5 de diferenciação. Observam-se: centríolo (C); axonema (AX) com os microtúbulos acessórios em formação ( $\rightarrow$ ); adjunto do centríolo (AC); derivados mitocondriais (DM) com a deposição de material eletrondenso em arranjo paracristalino (\*); inúmeros microtúbulos citoplasmáticos (MT). 36.500 X.

**Figura 20** Conjunto de flagelos, com espermátides, no estágio 6 de diferenciação. A figura mostra: axonema (AX), em sua maioria circundados por dupla membrana lisa ( $\rightarrow$ ); derivados mitocondriais (DM). Encontram-se derivados mitocondriais extranumerários e com características morfológicas ( $\Leftrightarrow$ ) que diferem do padrão normal, para o estágio 6 de maturação. Inúmeros flagelos estão no interior de uma massa citoplasmática comum. 16.100 X.



## Figuras 21 a 25

Cortes de células espermáticas durante a formação da dupla membrana lisa que circunda o axonema e separa flagelos e/ou núcleos. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

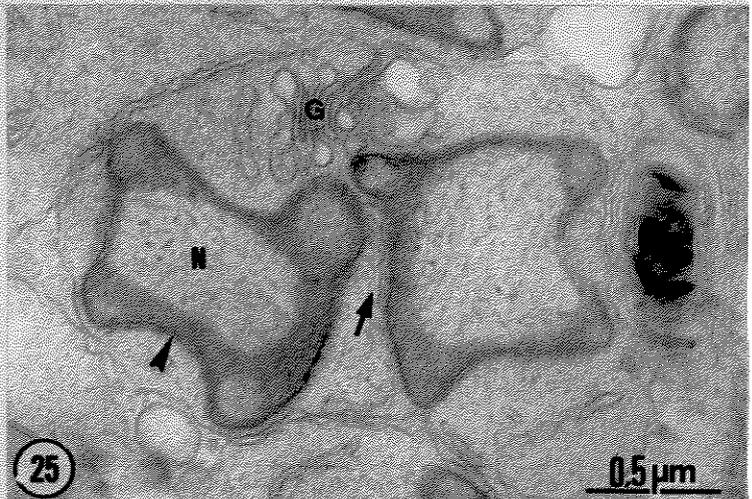
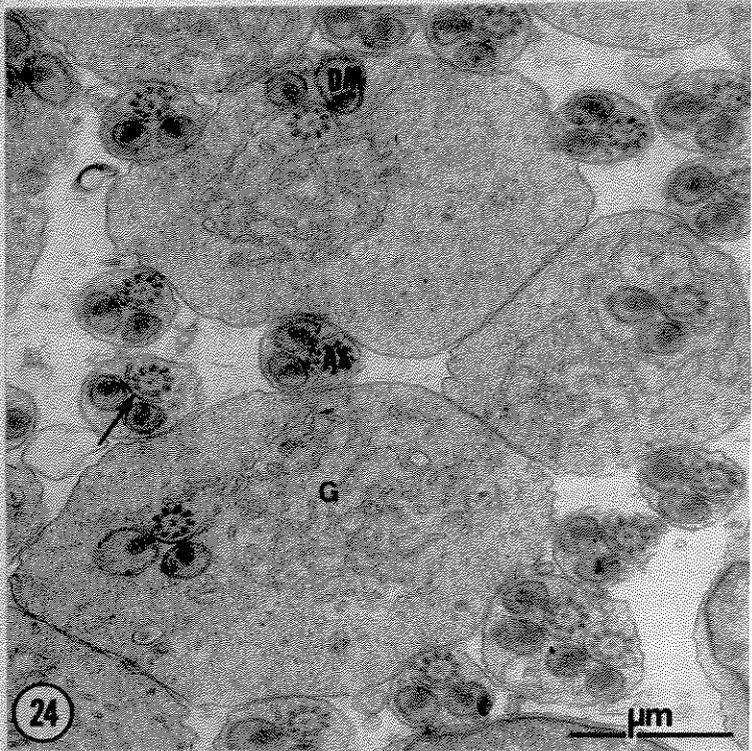
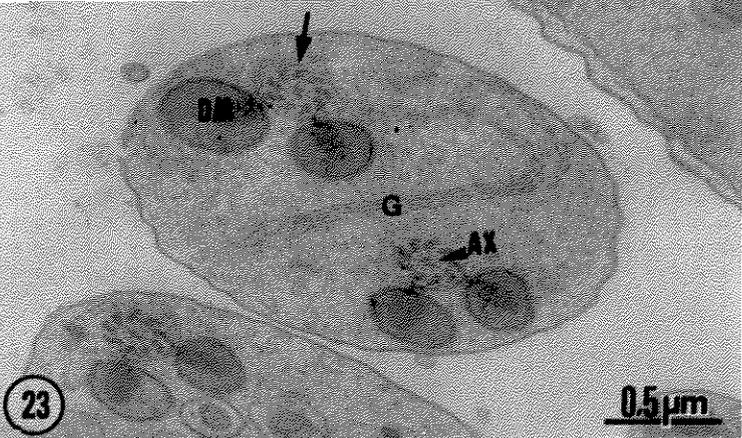
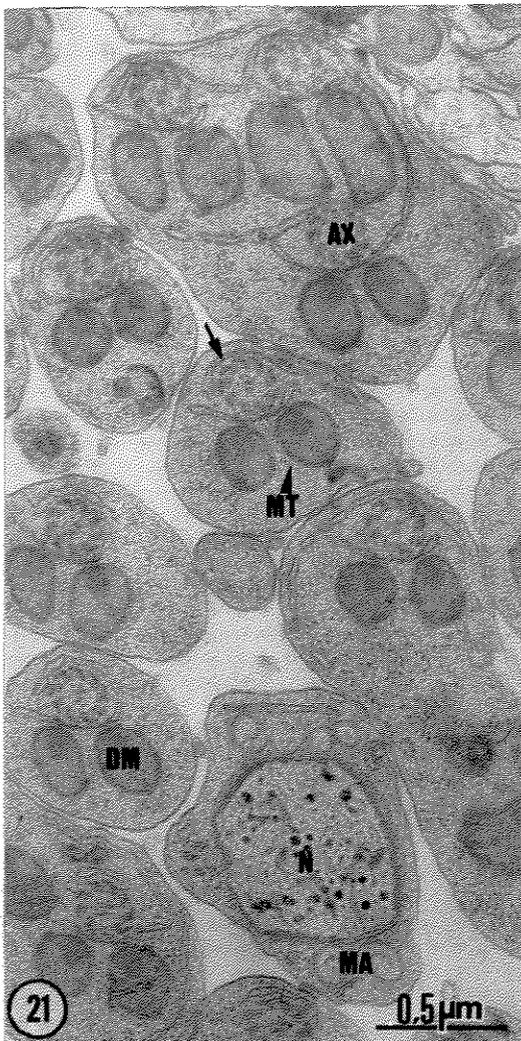
**Figura 21** Células espermáticas, do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, no estágio 6 de diferenciação. Observam-se: axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares, circundado por dupla membrana lisa (→); derivados mitocondriais (DM) com deposição de material eletrondenso; microtúbulos citoplasmáticos (MT); núcleo (N) com padrão anormal no processo de condensação da cromatina; membranas adjacentes ao núcleo (MA). 33.800 X.

**Figura 22** Espermátides, do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, no estágio 5 de diferenciação. A figura mostra: axonema (AX) com os microtúbulos acessórios em formação (▶); dupla membrana lisa (→) entre o axonema e os dois derivados mitocondriais (DM); microtúbulos citoplasmáticos (MT); complexo de Golgi (G). 34.700 X.

**Figura 23** Células espermáticas de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, no estágio 6 de diferenciação. O axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares encontra-se circundado por dupla membrana lisa (→). Os derivados mitocondriais (DM) apresentam uma deposição de material eletrondenso; observam-se ainda, prováveis cisternas do complexo de Golgi (G). 30.100 X.

**Figura 24** Espermátides, de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem, no estágio 5 de diferenciação, apresentando dupla membrana lisa (→) entre o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM); complexo de Golgi (G). 20.900 X.

**Figura 25** Espermátides, de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, no estágio 6 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) com a cromatina compactada junto à face interna do envólucro nuclear; formação inicial das membranas adjacentes ao núcleo (▶); complexo de Golgi (G); dupla membrana lisa (→) separando a massa citoplasmática das células espermáticas na região nuclear. 36.500 X.

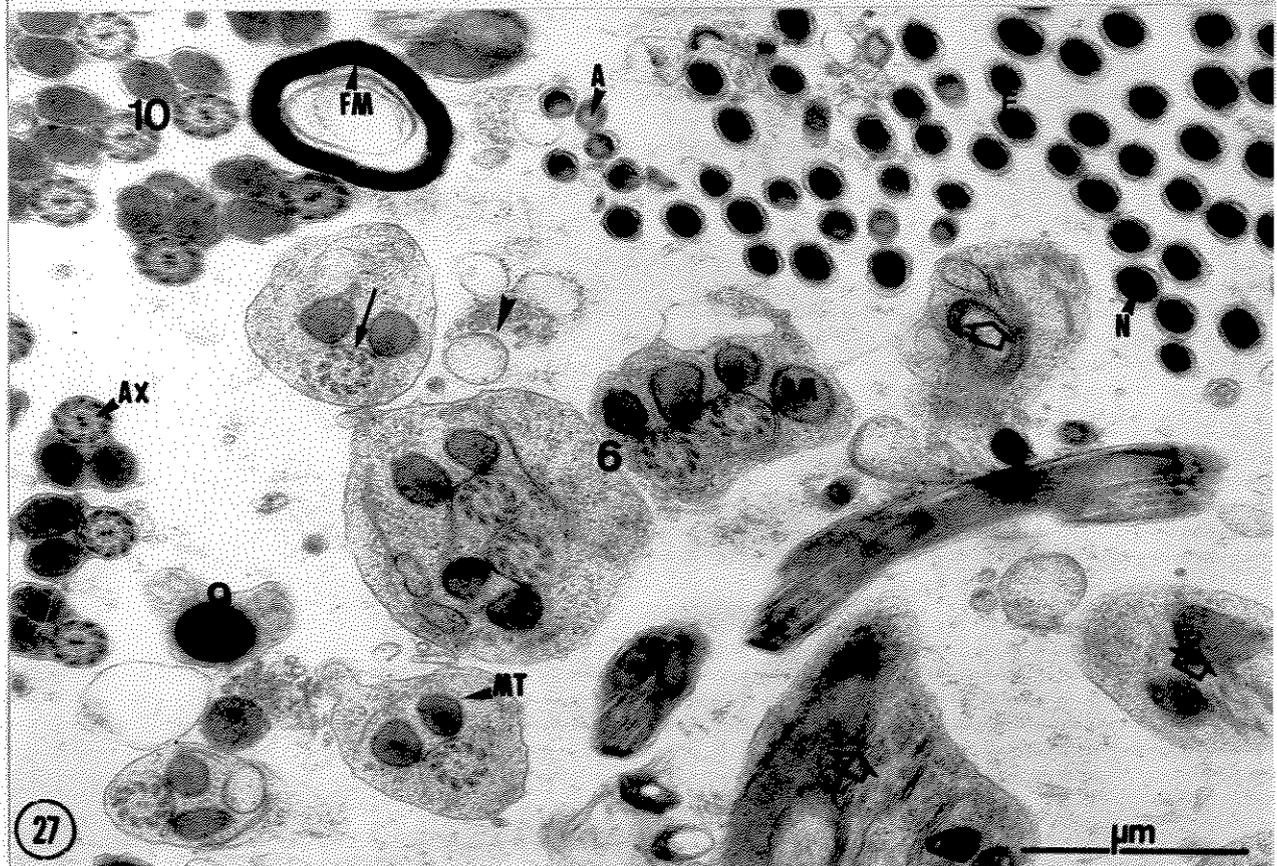
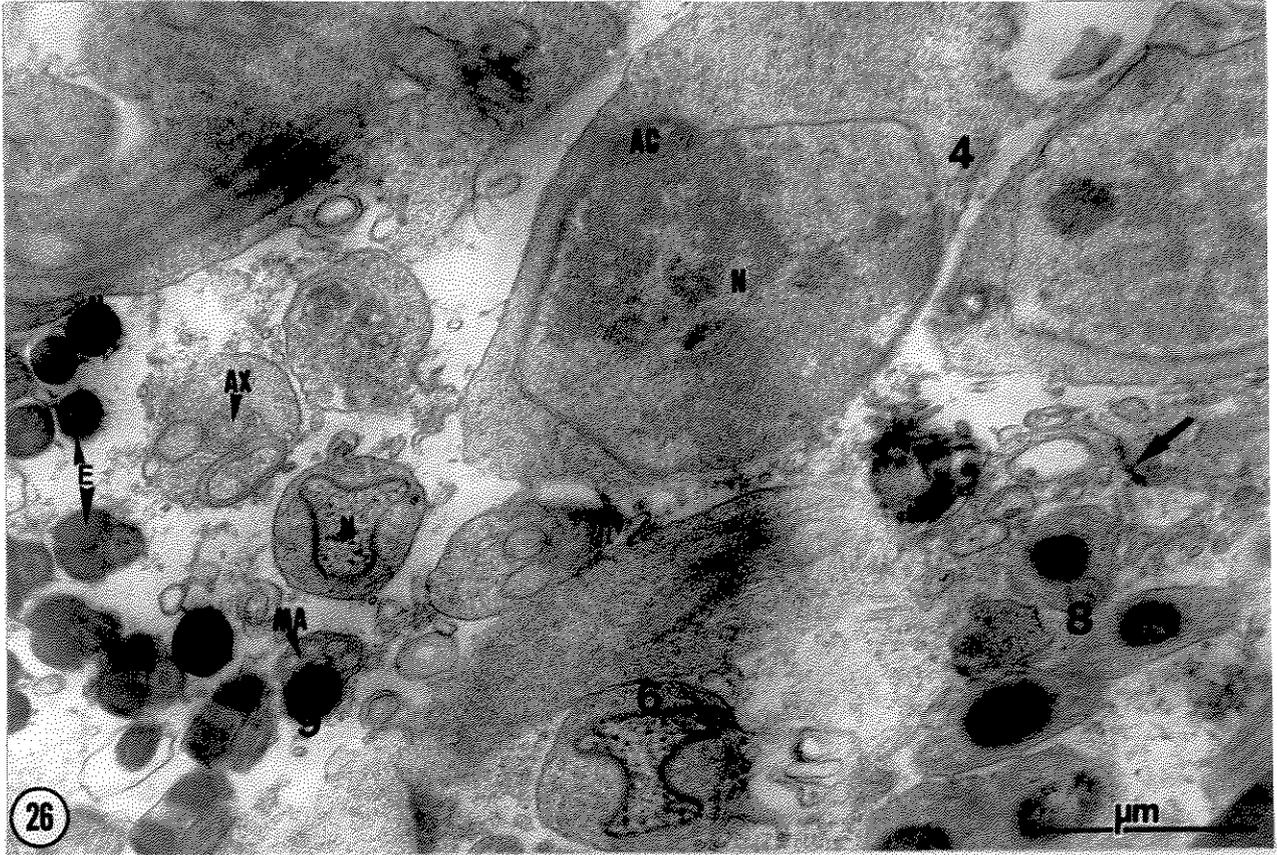


**Figura 26 e 27**

Espermátides em diferentes estádios de maturação do mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 26** Espermátides em estádios inicial (4), intermediários (6 e 8) e final (9) de diferenciação, e espermatozóides (E) maduros. A figura mostra: núcleo (N); adjunto do centríolo (AC); membranas adjacentes ao núcleo (MA); axonema (AX); derivados mitocondriais (DM) e resíduos de células císticas (→). 29.200 X.

**Figura 27** Espermátides em estádios intermediário (6) e finais (9 e 10) de diferenciação, e espermatozóides (E) maduros. Observam-se: núcleo (N); acrossoma (A); dupla membrana lisa (→) circundando o axonema (AX); derivados mitocondriais (DM); microtúbulos citoplasmáticos (MT); estruturas tipo figuras mielínicas (FM); resíduos de células císticas (▶); células espermáticas com alterações morfológicas (⇔). 29.900 X.

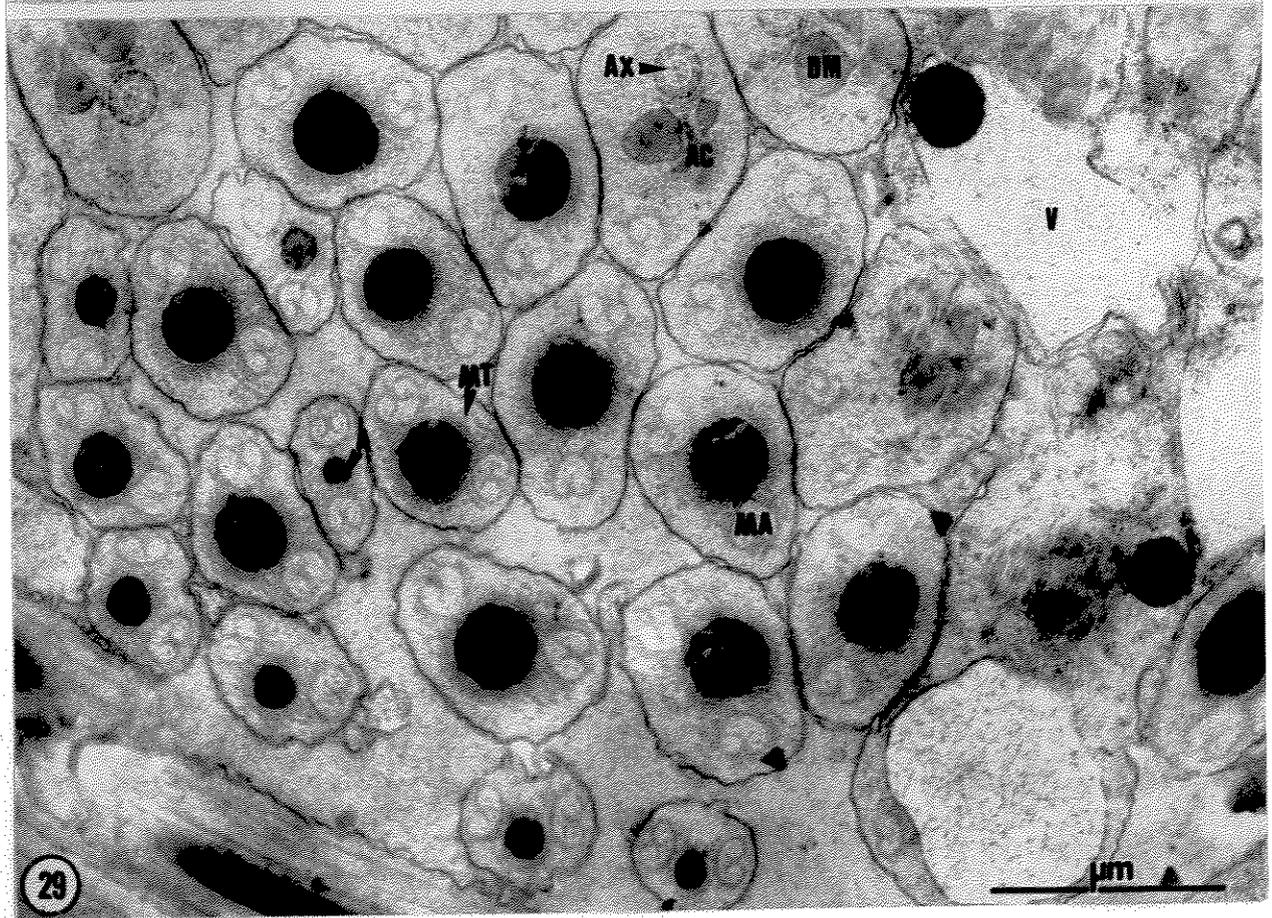
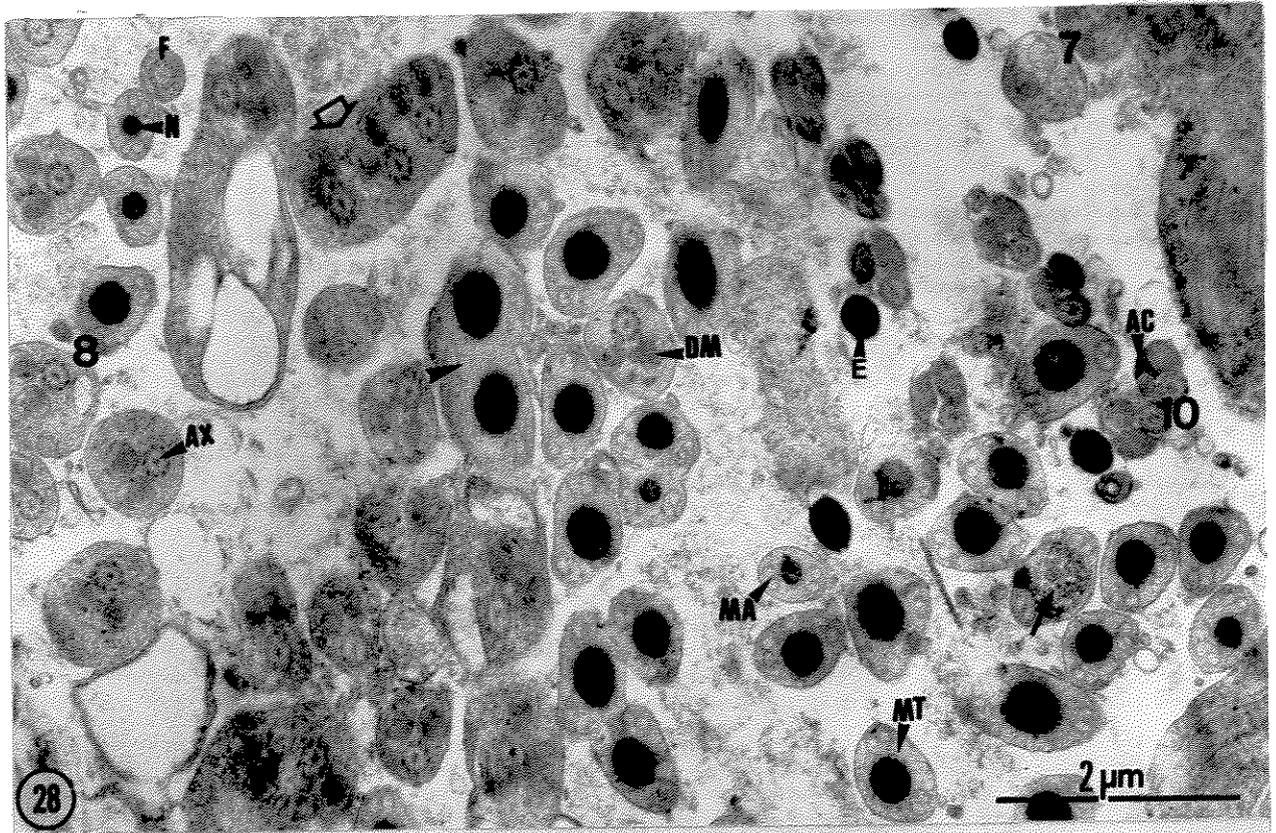


## Figuras 28 e 29

Espermátides em diferentes estádios de maturação de *Ceratitís capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 28** Conjunto de espermátides em diferentes estádios de maturação e com aspecto desorganizado do mutante "olho róseo". Os estádios 7, 8, 10 e espermatozóides (E) maduros estão indicados. Observam-se: membranas adjacentes ao núcleo (MA); axonema (AX); adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM); microtúbulos citoplasmáticos (MT); extremidade do flagelo (F) junto à região anterior do núcleo (N). Alguns núcleos (►) e flagelos (↔) encontram-se no interior de massas citoplasmáticas comuns; um núcleo (→) apresenta-se com cromatina condensada de forma anormal. 16.100 X.

**Figura 29** Grupo de espermátides de *Ceratitís capitata*, tipo selvagem, no estádio 8 do processo de maturação. Presença de espermátides cortadas a nível da cabeça e região inicial da cauda. Nas espermátides observam-se: núcleo (N) com cromatina em fase final de compactação; acrossoma (A); membranas adjacentes ao núcleo (MA); microtúbulos citoplasmáticos (MT); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM); vacúolos (V) com áreas eletrólúcidas e eletrondensas, típicas deste estádio. 30.800 X.



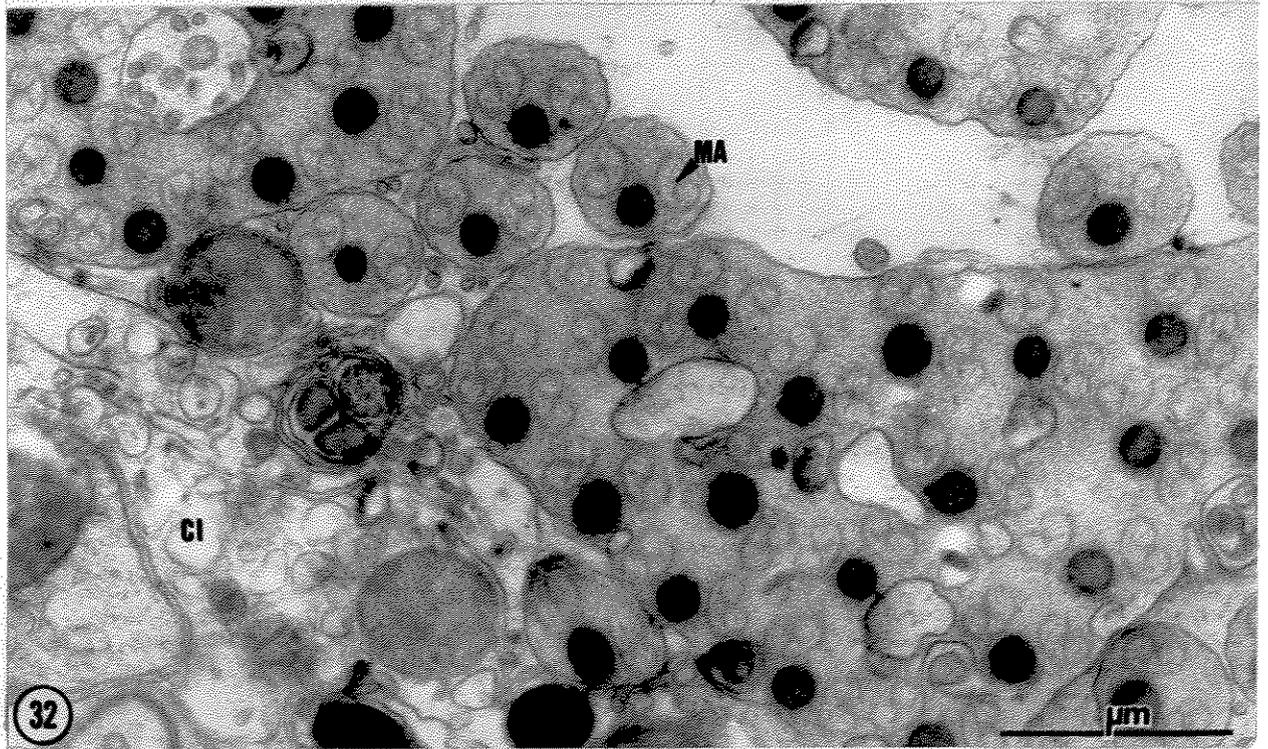
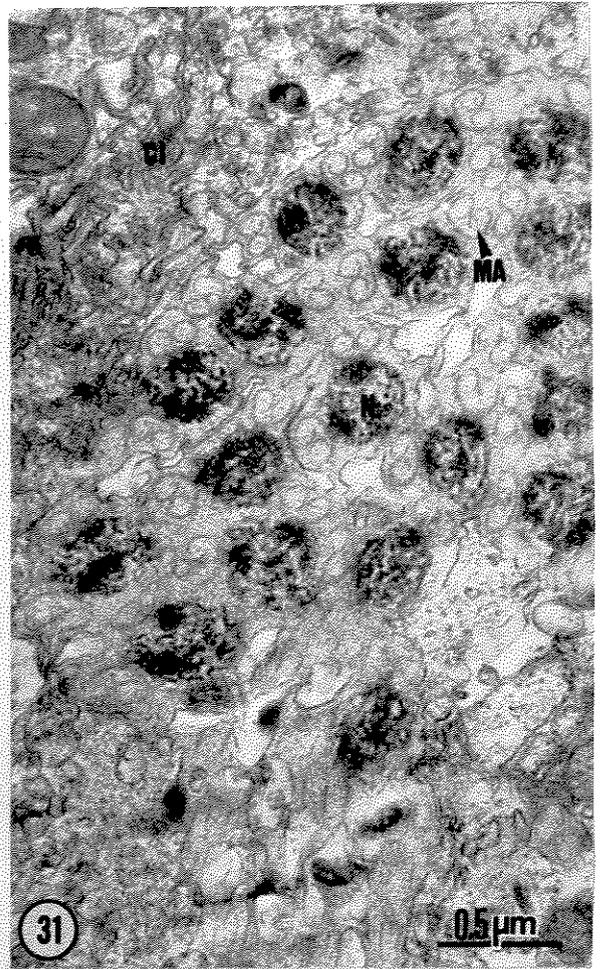
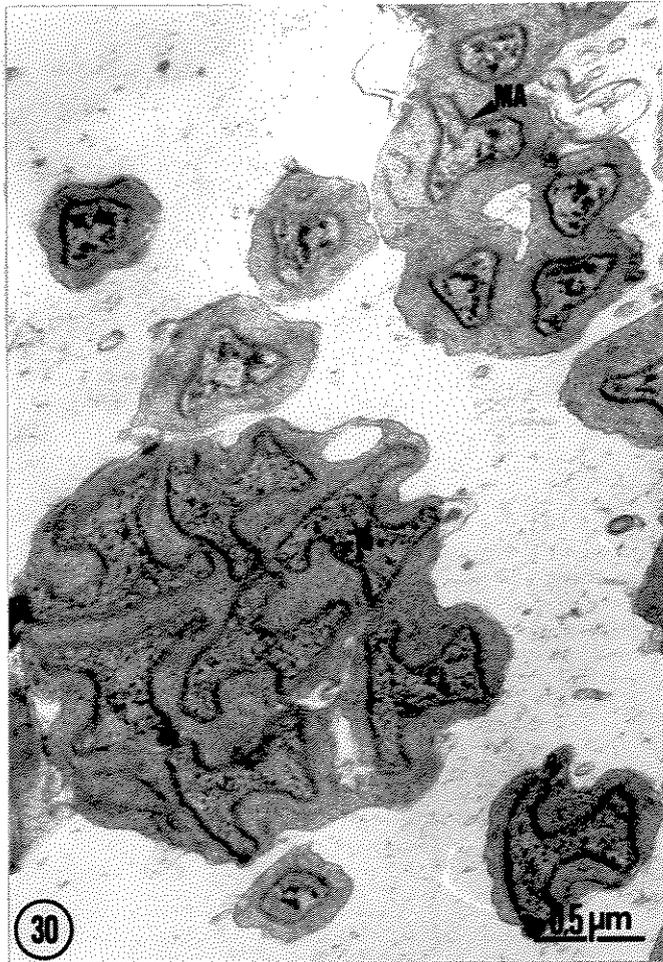
## Figuras 30 a 32

Células espermáticas fundidas na região nuclear, de *Ceratitis capitata*, nos estádios intermediários de diferenciação. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 30** Nas espermátides, do mutante "olho róseo", no estádio 6 do processo de maturação, observam-se núcleo (N) com concavidades laterais e cromatina em compactação, e membranas adjacentes ao núcleo (MA) em formação. 28.000 X.

**Figura 31** Espermátides, da mosca tipo selvagem, no estádio 7 do processo de maturação. Observam-se: núcleo (N) com áreas de cromatina bastante compactada; membranas adjacentes ao núcleo (MA); conteúdo citoplasmático das células que formam a parede do cisto (CI). 32.700 X.

**Figura 32** Espermátides, da mosca tipo selvagem, no estádio 8 do processo de maturação. Observam-se: núcleo (N) com cromatina bastante compactada; e membranas adjacentes ao núcleo (MA). Estão presentes ainda, flagelo (F) e núcleo (N') de espermatozóides maduros; e conteúdo citoplasmático das células que formam a parede do cisto (CI). 31.000 X.



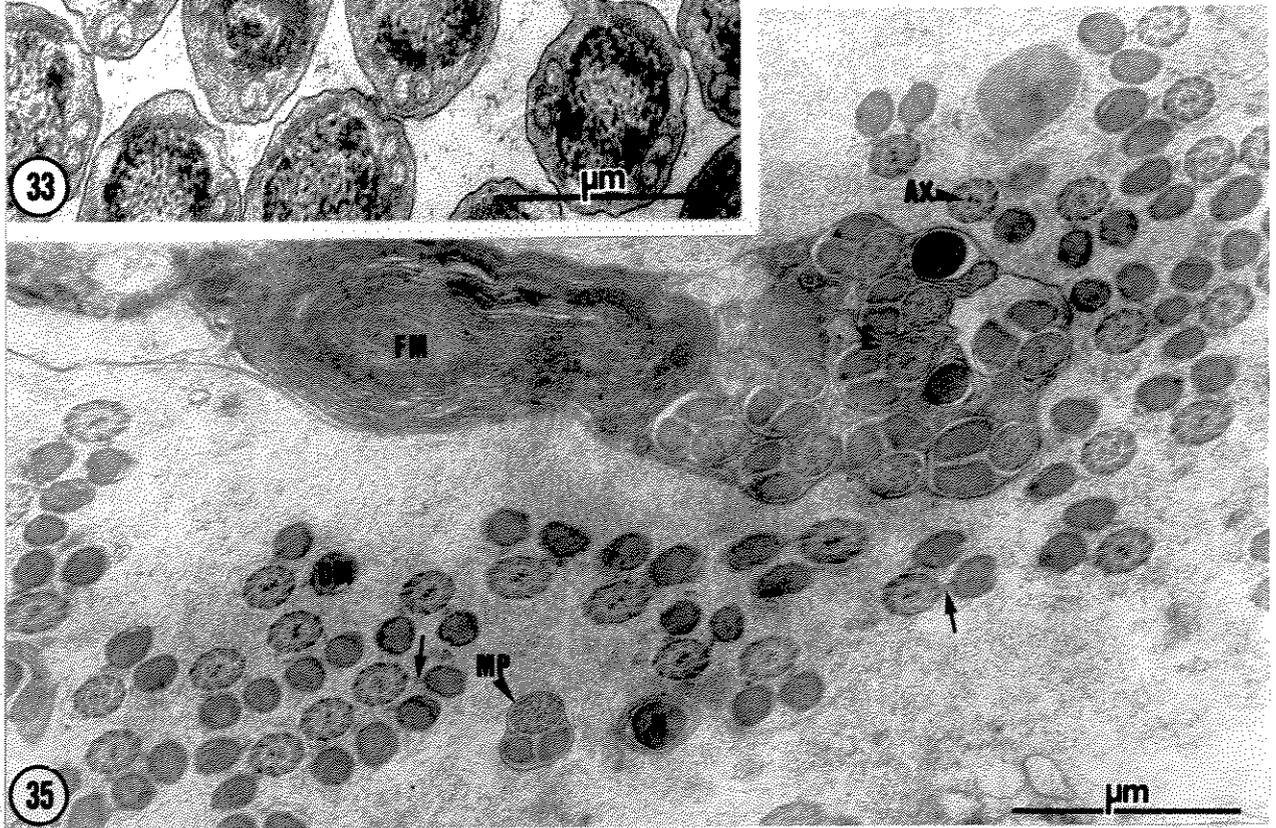
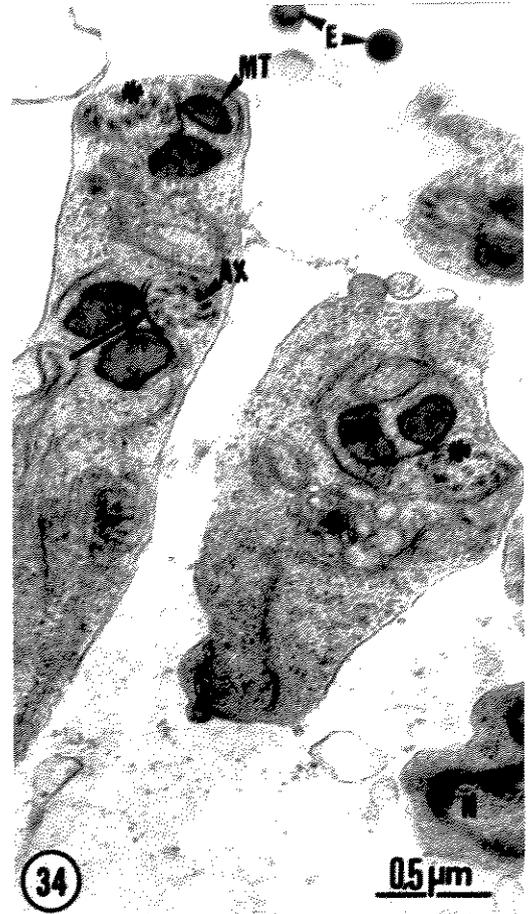
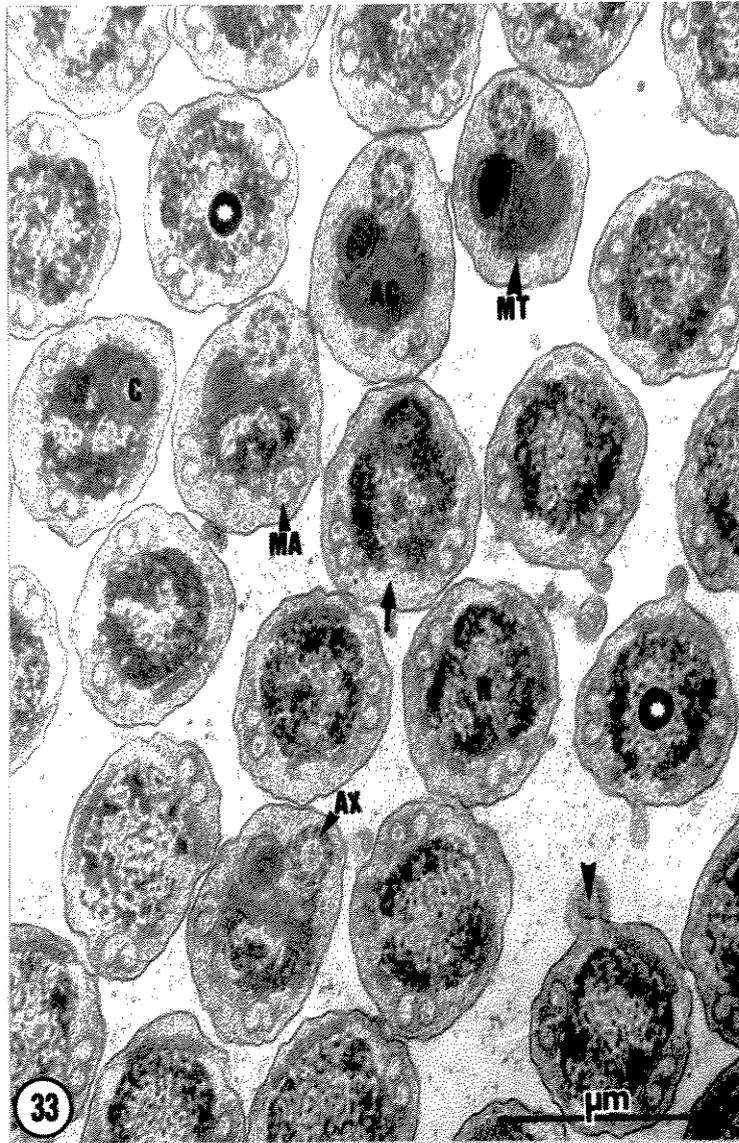
## Figuras 33 a 35

Espermátide do mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata* com alterações morfológicas. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 33** Espermátides no estágio 7 do processo de maturação. Presença de células cortadas a nível da cabeça e região inicial da cauda. Nas espermátides observam-se: núcleo (N) sem concavidades laterais e com cromatina em compactação; membranas adjacentes ao núcleo (MA); microtúbulos citoplasmáticos (MT); centríolo (C); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; adjunto do centríolo (AC) entre os dois derivados mitocondriais (DM). Em duas células espermáticas no interior do núcleo encontra-se uma área (\*) com intensa eletrondensidade. Nas regiões (→) sem os microtúbulos e as membranas adjacentes ao núcleo o envólucro nuclear não é distinguível. Em algumas espermátides estão presentes expansões citoplasmáticas (▶). 29.200 X.

**Figura 34** Espermátides no estágio 6 do processo de maturação. Corte transversal a nível do flagelo. Em dois axonemas (\*) os elementos tubulares estão distribuídos de forma desorganizada. Observam-se ainda, dupla membrana lisa (→) circundando o axonema (AX); derivados mitocondriais (DM); microtúbulos citoplasmáticos (MT); complexo de Golgi (G); núcleo (N). Espermatozóides (E) maduros também estão presentes. 29.900 X.

**Figura 35** Espermátides nos estádios 9 e 10 do processo de maturação e espermatozóides (E) maduros. Observam-se: núcleo (N); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso; região eletrondensa (→) entre os derivados mitocondriais e o axonema; membrana plasmática (MP). Os flagelos das espermátides nos estádios 9 e 10 não estão circundados por membrana plasmática. Encontra-se presente ainda, uma estrutura lembrando fígura mielínica (FM). 29.900 X.



## Figuras 36 a 38

Aglomerado de espermátides, em diferentes estádios de maturação, do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, com degeneração das células que formam a parede dos cistos. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 36** Espermátides nos estádios 4, 5 e 6 do processo de maturação.

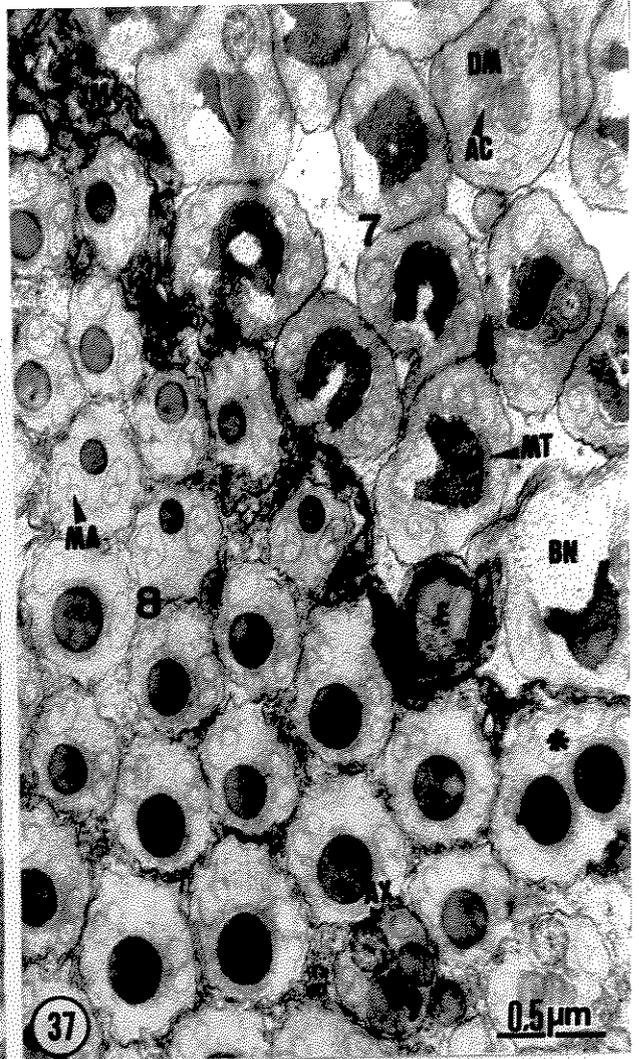
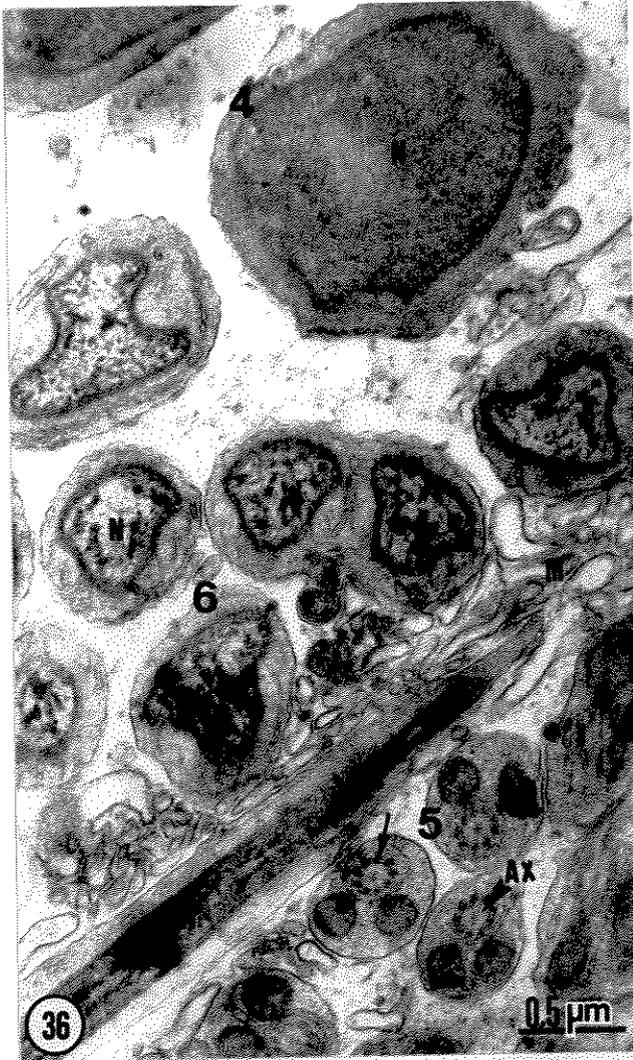
Está presente uma grande quantidade de membranas (M) resultantes do processo degenerativo das células que formam a parede dos cistos. Nas células espermáticas observam-se: núcleo (N); acrossoma (A) em corte longitudinal; axonema (AX) com as fibras acessórias (→) em formação; derivados mitocondriais (DM) com deposição de material eletrondenso. 27.700 X.

**Figura 37** Espermátides nos estádios 7 e 8 do processo de maturação e

espermatozóides (E) maduros. Encontra-se uma grande quantidade de membranas (M) resultantes do processo degenerativo das células que formam a parede dos cistos. Nas células espermáticas observam-se: núcleo (N); bulbo nuclear (BN) formado pelo excesso de nucleoplasma e envólucro nuclear a serem eliminados; membranas adjacentes ao núcleo (MA); microtúbulos citoplasmáticos (MT); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM). Estão presentes ainda, dois núcleos no interior de uma massa citoplasmática comum (\*). 27.700 X.

**Figura 38** Espermátides nos estádios 8 e 10 do processo de maturação e

espermatozóides (E) maduros. Encontram-se massas residuais (→) provenientes do processo degenerativo das células que formam a parede dos cistos. Nas células germinativas observam-se: núcleo (N); membranas adjacentes ao núcleo (MA); microtúbulos citoplasmáticos (MT); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso. 33.600 X.



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## Figuras 39 a 42

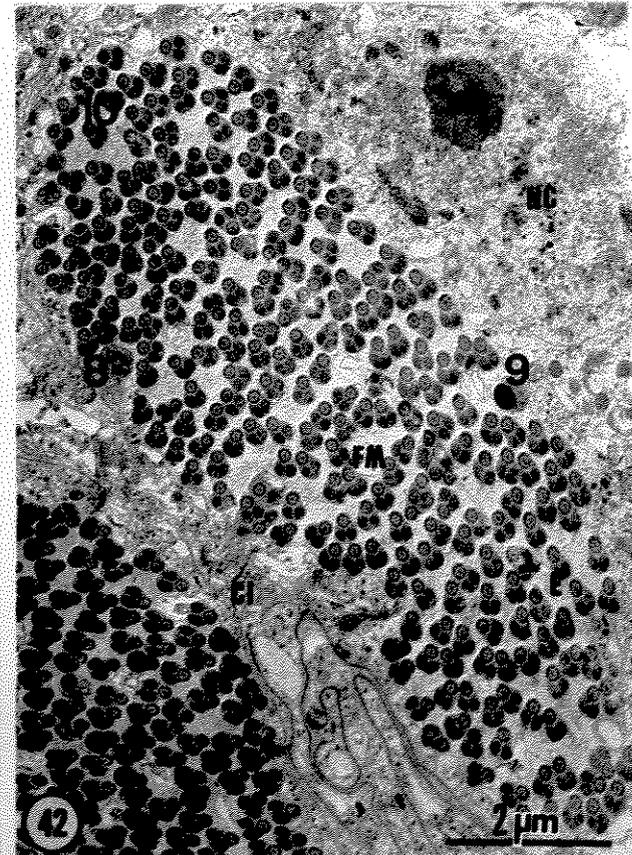
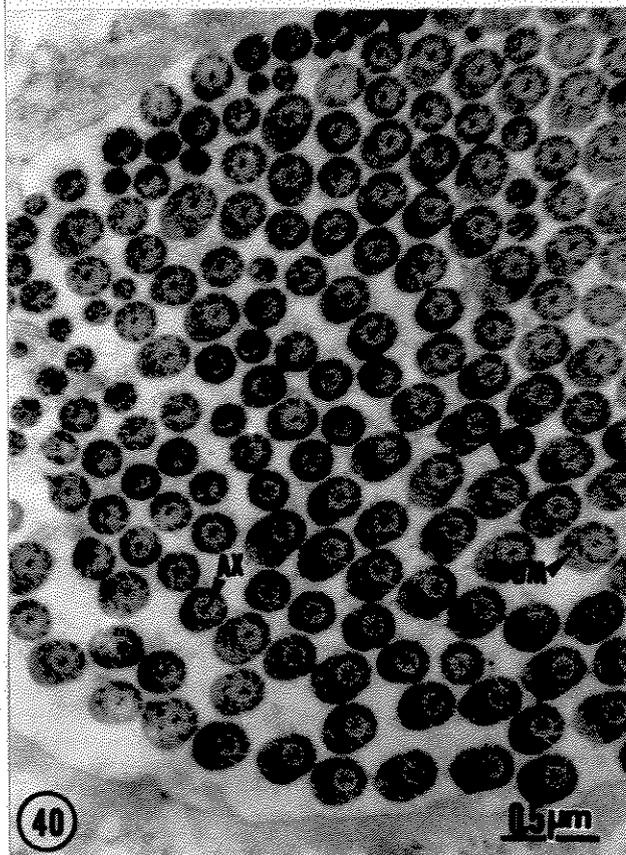
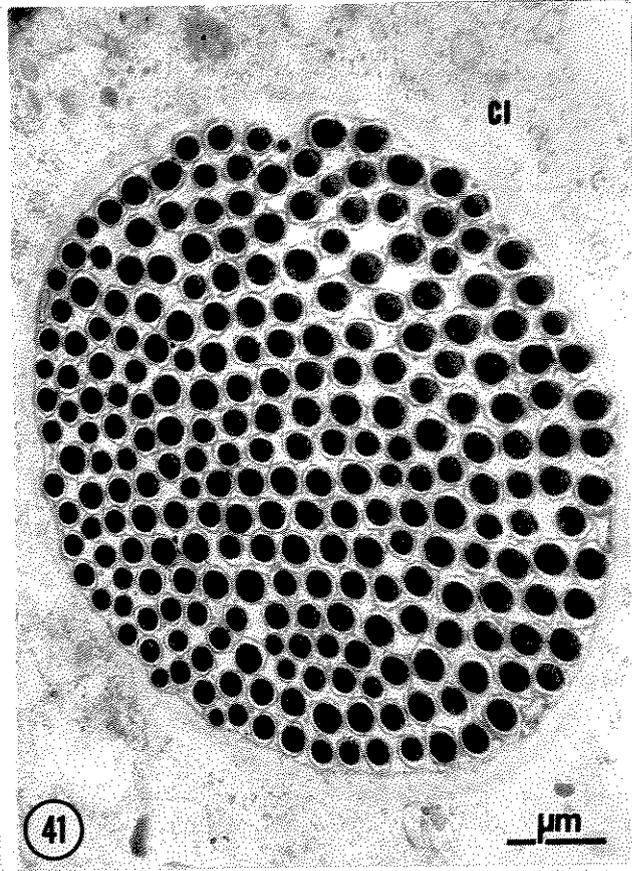
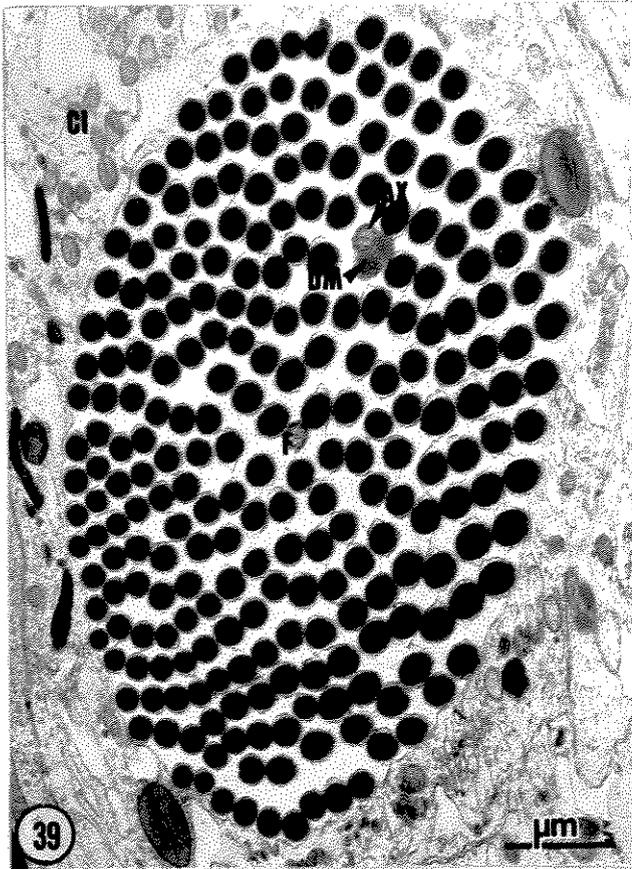
Cistos organizados, com espermátides nos estádios finais de maturação, de *Ceratitidis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 39** Cisto organizado do mutante “olho róseo” com 249 espermatozóides. Observam-se: núcleo (N); axonema (AX); derivados mitocondriais (DM); extremidade do flagelo (F); células que formam a parede do cisto (CI). 14.300 X.

**Figura 40** Região de um cisto organizado de *Ceratitidis capitata*, linhagem selvagem. No corte, a nível da extremidade do flagelo de espermatozóides maduros, estão presentes axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares e porção terminal dos derivados mitocondriais (DM). 25.500 X.

**Figura 41** Cisto organizado de *Ceratitidis capitata*, tipo selvagem com 246 espermatozóides, seccionados a nível de núcleo (N). Observam-se também, as células que formam a parede do cisto (CI). 12.600 X.

**Figura 42** Cisto do mutante “olho róseo” com espermátides em estádios de diferenciação atrasados (8, 9 e 10) em relação à grande maioria, espermatozóides (E) maduros. Entre as células espermáticas encontram-se membranas que lembram a formação de figuras mielínicas (FM). Observam-se ainda, núcleo (NC) de células que formam a parede dos cistos (CI) com nucléolo (NUC) evidente. 10.800 X.

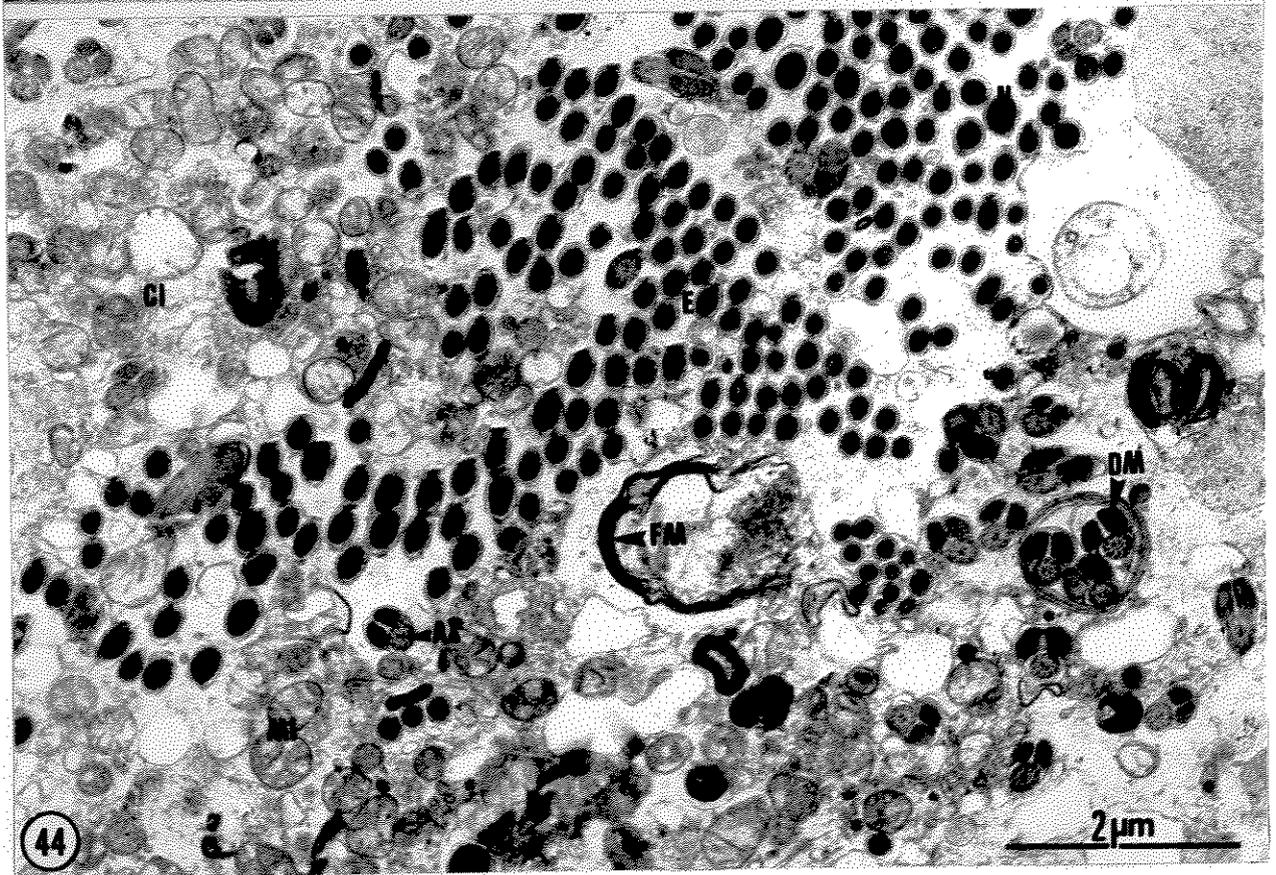
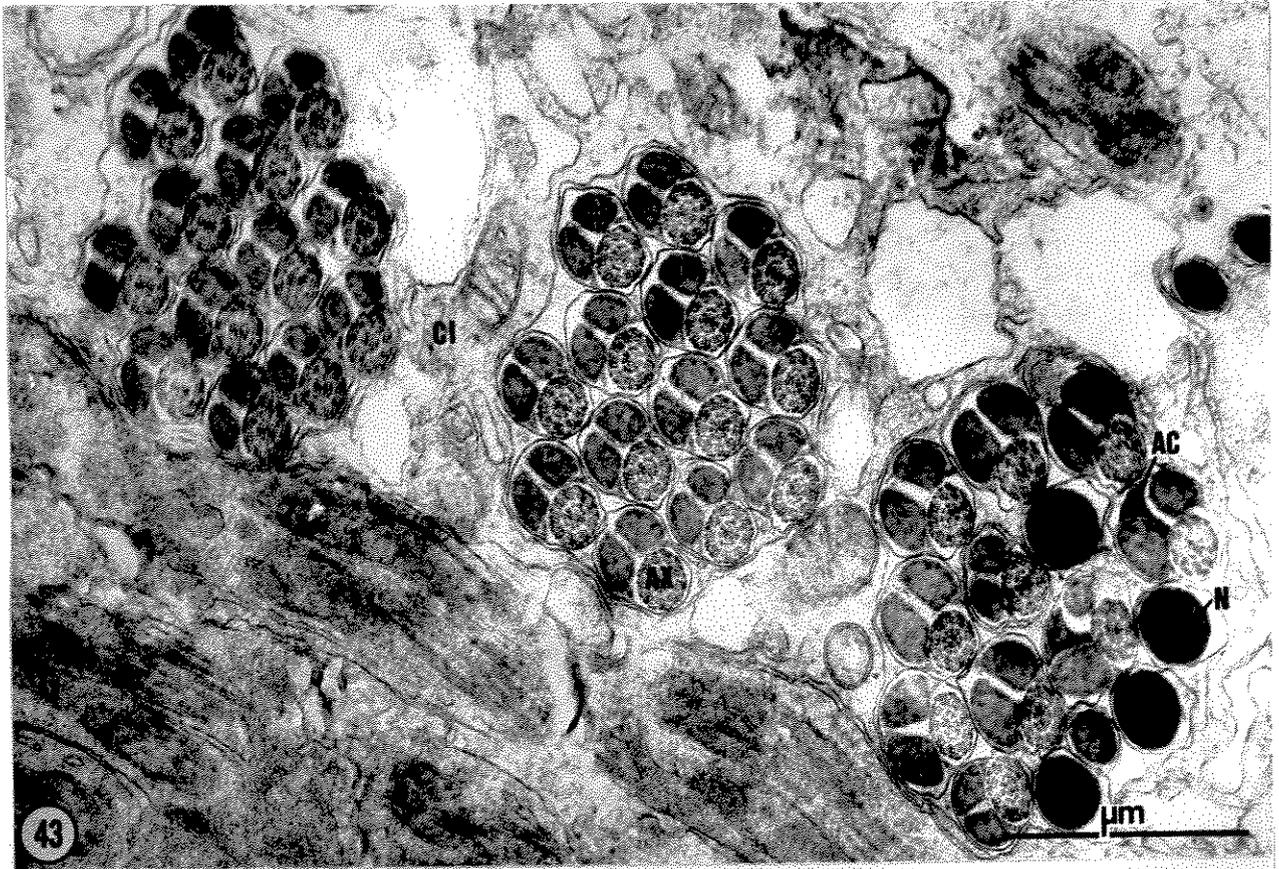


## Figuras 43 e 44

Espermatozoides do mutante "olho róseo" de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 43** Agrupamento de espermatozoides, corte a nível das regiões terminal da cabeça, inicial e mediana da cauda. Observam-se: núcleo (N); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso; e células que formam a parede dos cistos (CI). 31.700 X.

**Figura 44** Cisto com aspecto desorganizado; as células que formam a parede dos cistos (CI) estão em processo degenerativo e os espermatozoides (E) maduros sendo eliminados. Observam-se: núcleo (N); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso; estruturas tipo figuras mielínicas (FM); e mitocôndrias (MI) das células que formam a parede dos cistos. 15.200 X.



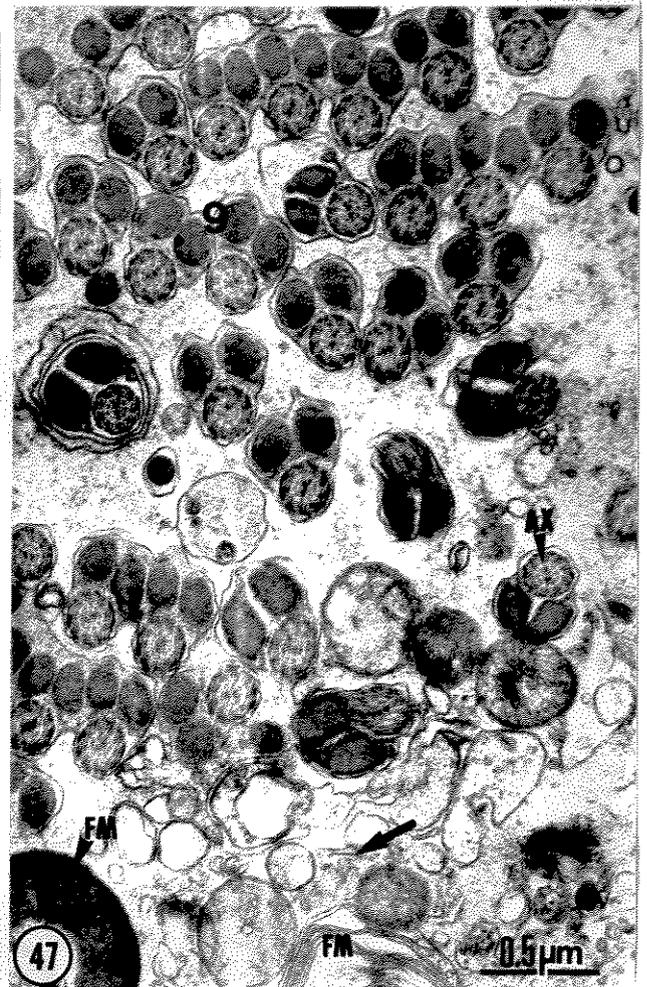
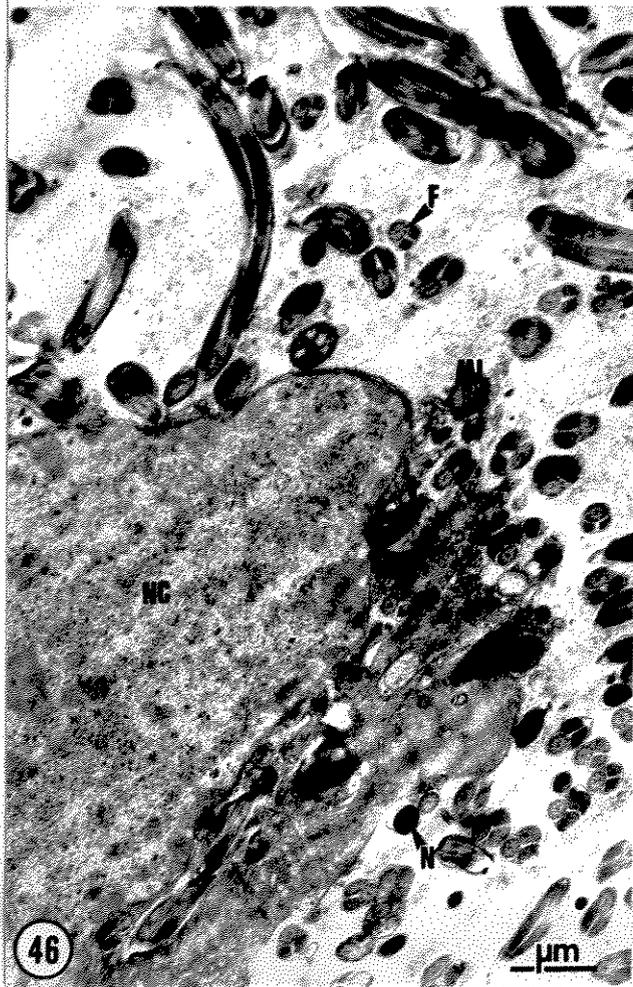
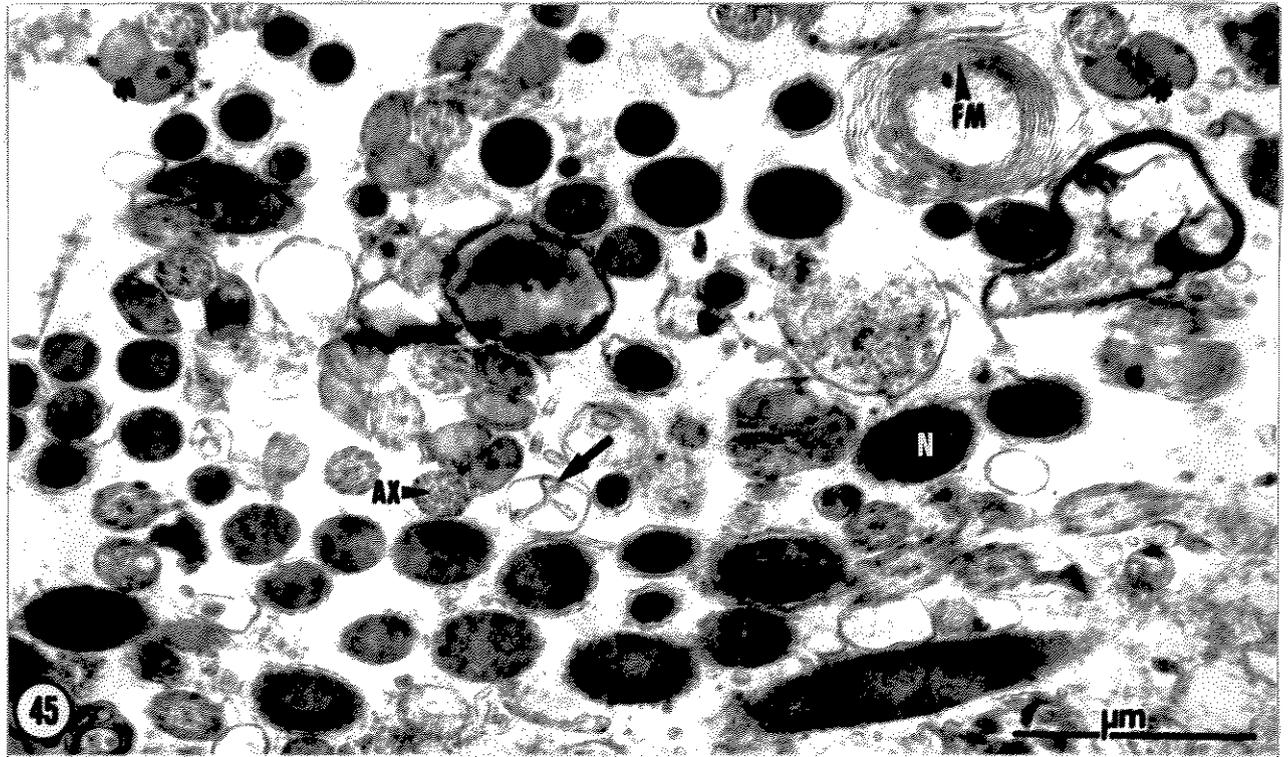
## Figuras 45 a 47

Desorganização das células que formam a parede dos cistos de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 45** Cisto desorganizado do mutante “olho róseo” apresentando estruturas tipo figuras mielínicas (FM); prováveis lisossomos (L); núcleo (N) de espermatozóide; axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso; resíduos (→) de células que formam a parede dos cistos. Observa-se a ausência da membrana plasmática em todos os flagelos (\*). 31.700 X.

**Figura 46** Célula da parede do cisto de mutante “olho róseo” em processo degenerativo. Na célula que forma a parede do cisto observam-se núcleo (NC); mitocôndriais (MI) e prováveis lisossomos (L). Dos espermatozóides em eliminação identificam-se núcleo (N) e flagelo (F). 11.200 X.

**Figura 47** Células da parede do cisto de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem, em processo degenerativo. Observam-se: resíduos (→) de células que formam a parede do cisto; estruturas tipo figuras mielínicas (FM); espermatozóides (E) maduros; células espermáticas no estágio 9 de diferenciação; axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; derivados mitocondriais (DM). 29.900 X.



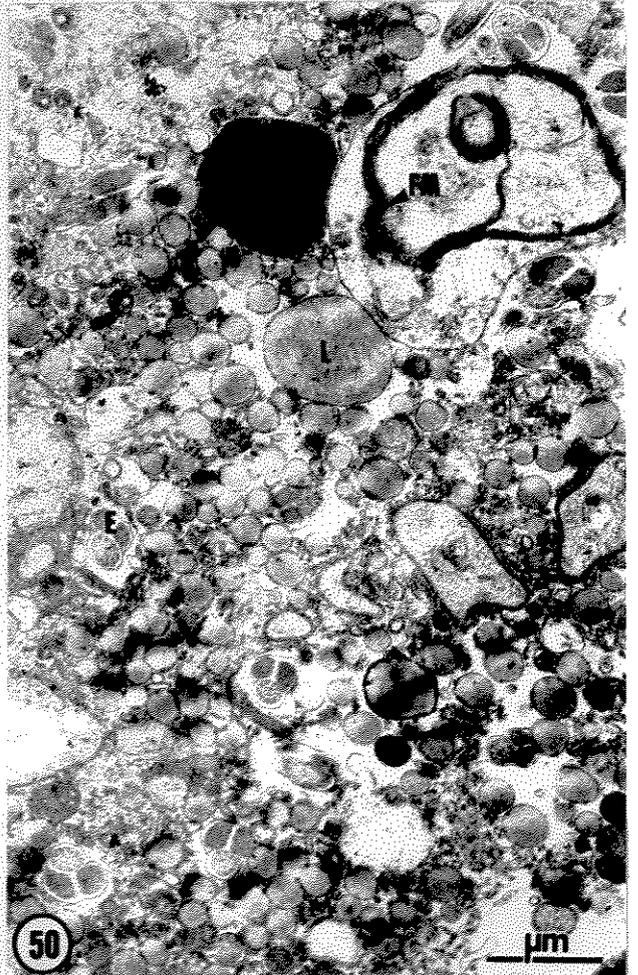
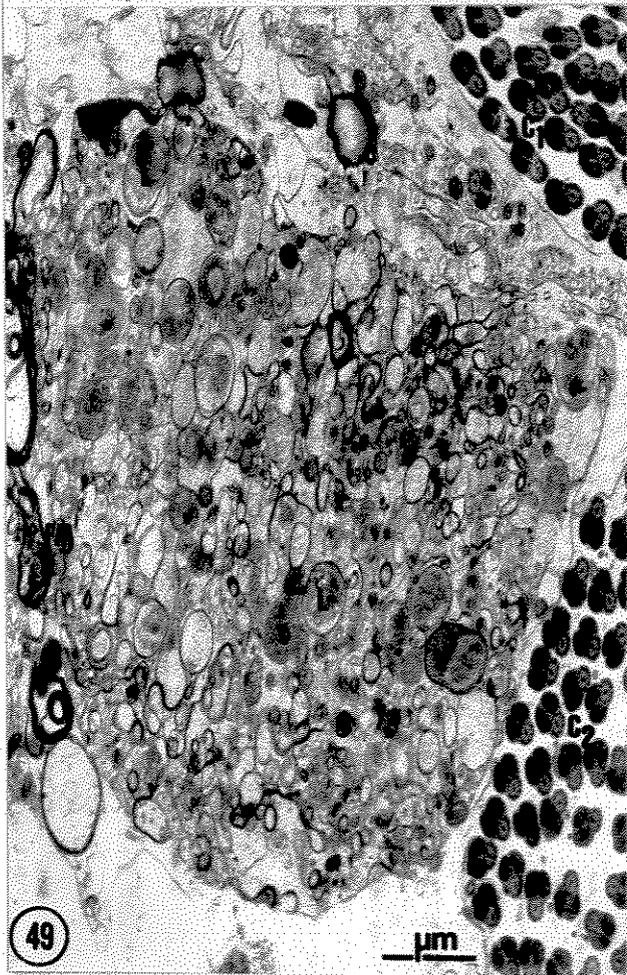
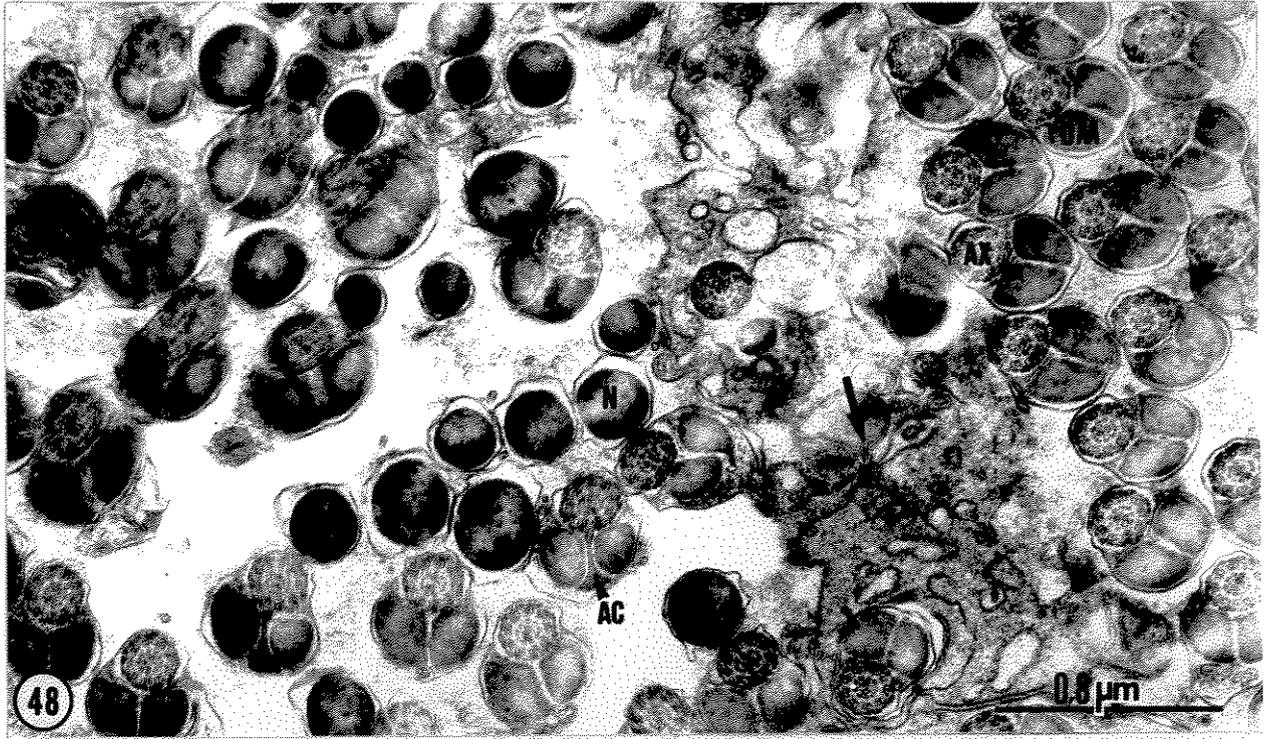
## Figuras 48 a 50

Espermatozóides maduros de *Ceratitis capitata* em eliminação. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%..

**Figura 48** Espermatozóides maduros de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem sendo eliminados. A figura mostra: resíduos (→) de células que formam a parede dos cistos; núcleo (N) de espermatozóides; axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; adjunto do centríolo (AC) e derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso. 37.300 X.

**Figura 49** Massa residual de um cisto, do mutante "olho róseo", após eliminação dos espermatozóides maduros. A massa residual é rica em vesículas lisossômicas (L) e estruturas tipo figuras mielínicas (FM). Observam-se ainda, dois cistos ( $C_1$  e  $C_2$ ) com espermatozóides maduros seccionados a nível da região mediana da cauda. 11.700 X.

**Figura 50** Na massa residual do cisto, de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, ocorrem vesículas lisossômicas (L); estruturas tipo figuras mielínicas (FM) e alguns espermatozóides (E). 15.200 X.



## Figuras 51 a 56

Cortes de espermateca de *Ceratitis capitata*. Fixação em glutaraldeído 3%; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% seguido por ácido tânico 2%.

**Figura 51** Espermateca vazia, da mosca tipo selvagem, onde observa-se somente a camada de quitina (QT) e no interior do órgão um material tubular (MAT). 25.500 X.

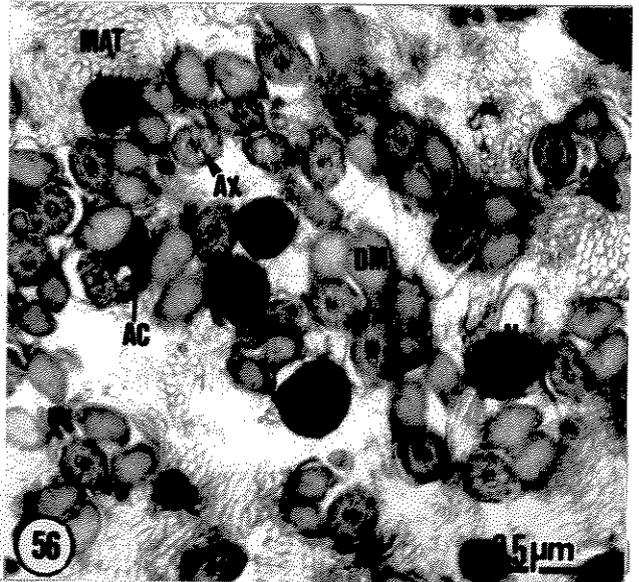
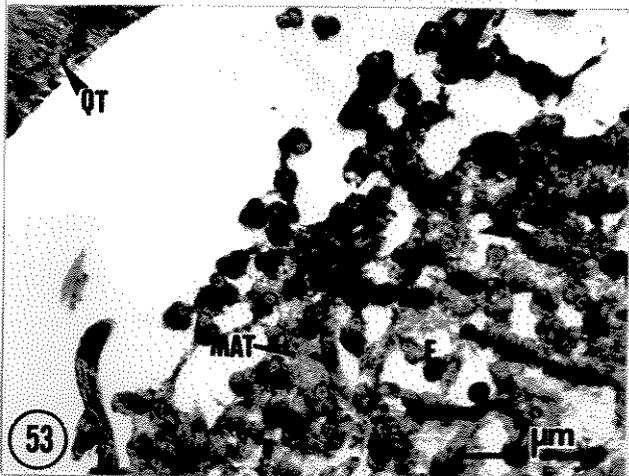
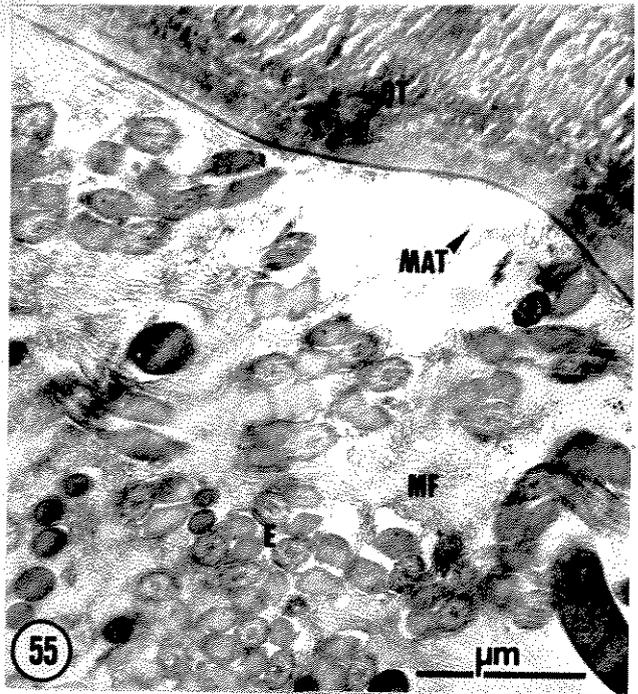
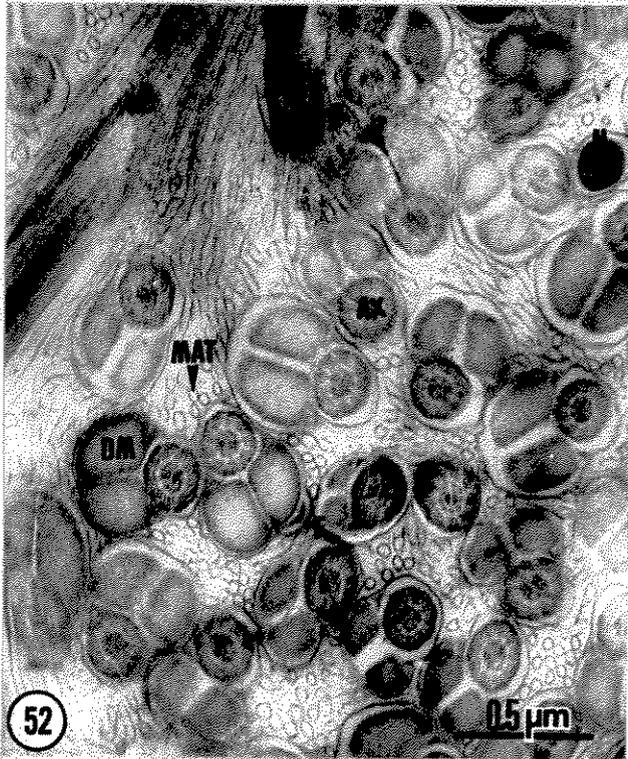
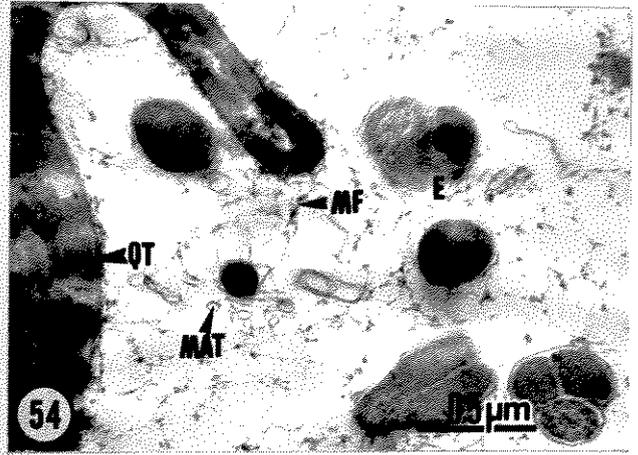
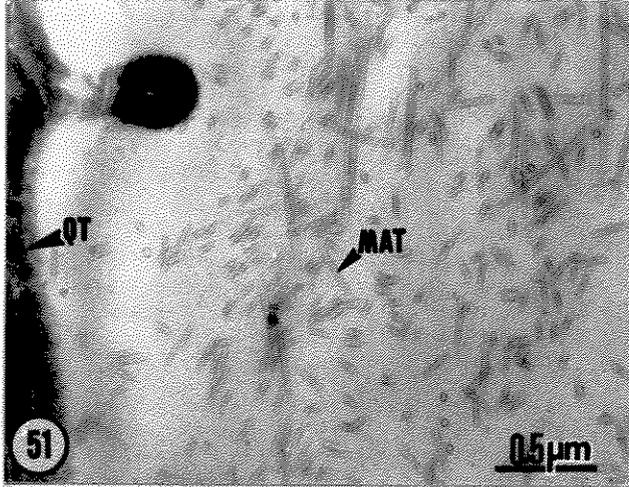
**Figura 52** Espermatozóides no interior da espermateca, da mosca tipo selvagem. Observam-se: núcleo (N); axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM) elementos que formam o flagelo (F) do espermatozóide. O material tubular (MAT) envolve os espermatozóides no interior da espermateca. 36.500 X.

**Figura 53** Espermateca, da mosca tipo selvagem que já eliminou parte dos espermatozóides que se encontravam no seu interior. A camada de quitina (QT) localiza-se perifericamente. No interior da espermateca a massa de espermatozóides (E) está envolvida por material tubular (MAT). 9.300 X.

**Figura 54** Espermateca da mosca tipo selvagem. A figura mostra: a camada de quitina (QT); alguns espermatozóides (E) no interior da espermateca; o material tubular (MAT) e o material fibrilar (MF) entre os espermatozóides. 30.100 X.

**Figura 55** Espermateca do mutante "olho róseo" com a camada de quitina (QT). No interior da espermateca os espermatozóides (E) estão envolvidos por material tubular (MAT) e material fibrilar (MF). 21.900 X.

**Figura 56** Espermatozóides no interior da espermateca do mutante "olho róseo". Observam-se: núcleo (N); axonema (AX); adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM); e material tubular (MAT) envolvendo os espermatozóides. 27.700 X.



## Figura 57

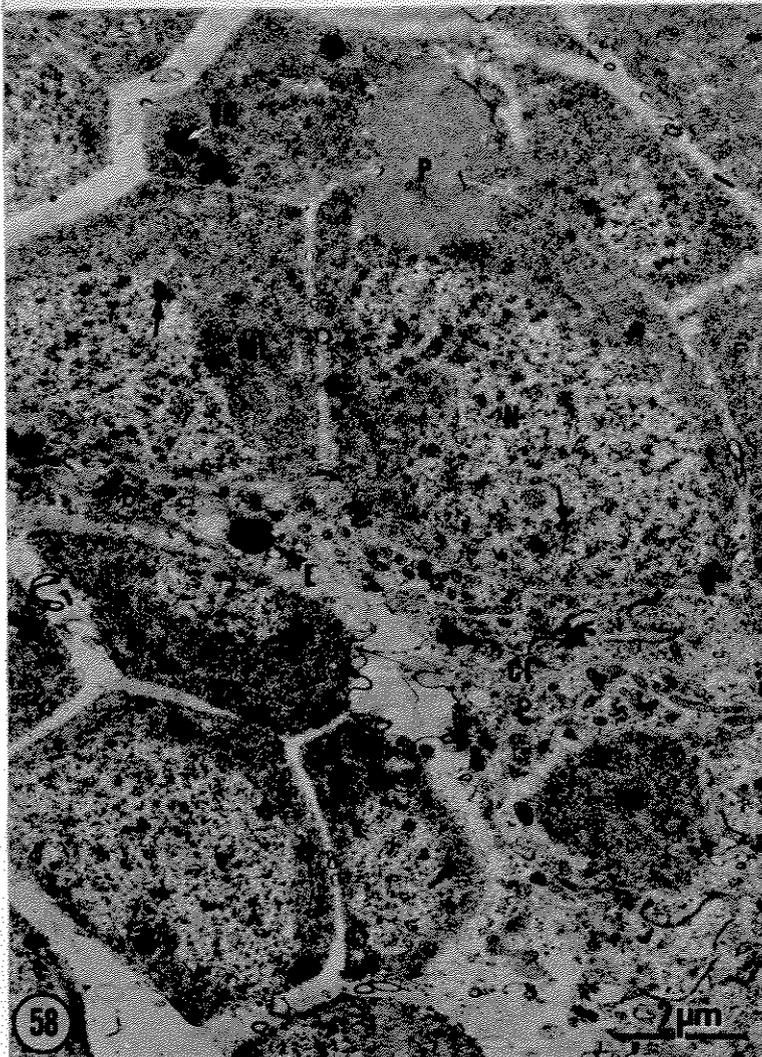
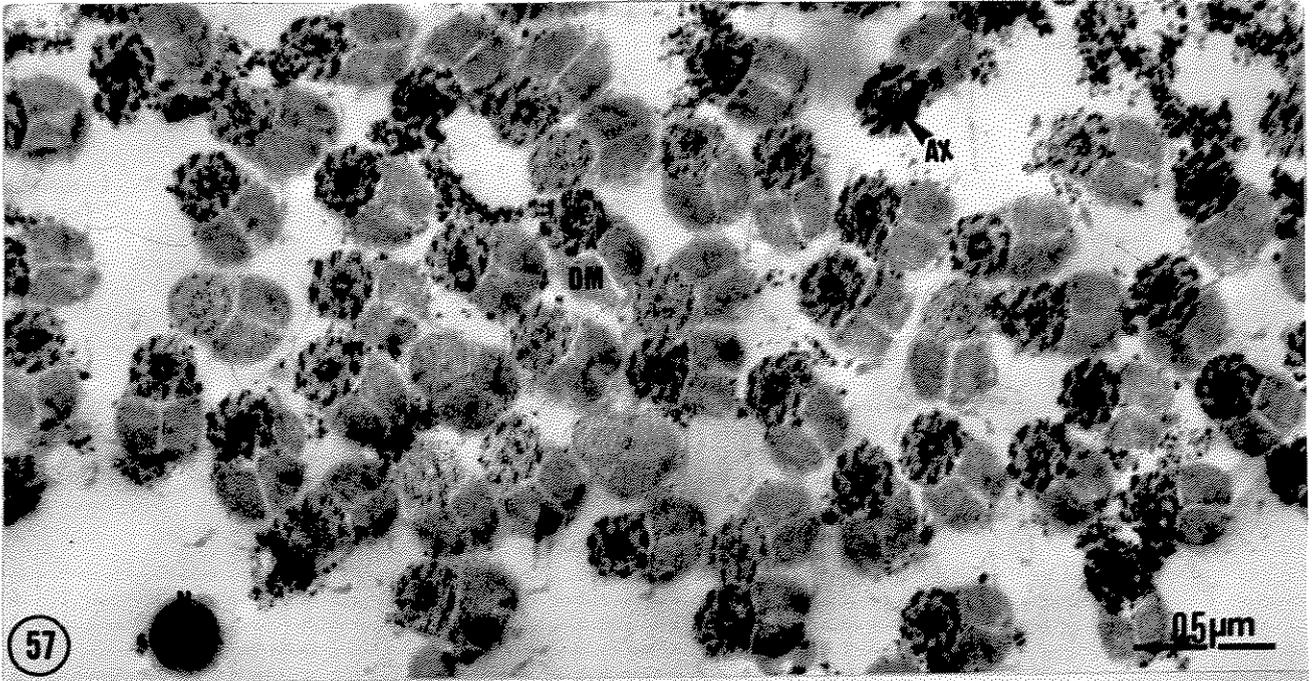
**Figura 57** Grupo de espermatozóides de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. Reação citoquímica para fosfatase ácida segundo GÖMÖRI. Precipitados resultantes da ação da fosfatase ácida localizam-se a nível do axonema (AX). Observam-se ainda, derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletrondenso, e núcleo (N). 35.500 X.

## Figuras 58 e 59

Grupos de espermátides, do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, no estágio 1 de maturação. Reação citoquímica para fosfatase ácida segundo BARKA & ANDERSON.

**Figura 58** Nesta figura observam-se: núcleo com precipitados finos (→) a nível das áreas de cromatina mais compactada; e vesículas Golgianas (VG) com intensos precipitados resultantes da ação enzimática. Estão presentes ainda, inúmeras mitocôndrias (MI) e ponte citoplasmática (P) entre duas espermátides vizinhas, ambos sem produtos da reação. A célula que forma a parede do cisto (CI) apresenta núcleo (NC) e lisossoma (L), este intensamente marcado pela reação enzimática. 8.600 X.

**Figura 59** Nesta figura observam-se: núcleo (N) com alguns precipitados (→) a nível de cromatina mais condensada; nucléolo (NU) evidente; e complexo de Golgi (G) com precipitados resultantes da reação enzimática. Os núcleos (NC) das células que formam a parede dos cistos (CI) apresentam precipitados (►) principalmente na cromatina que se encontra junto ao envólucro nuclear. 9.000 X.



## Figuras 60 a 63

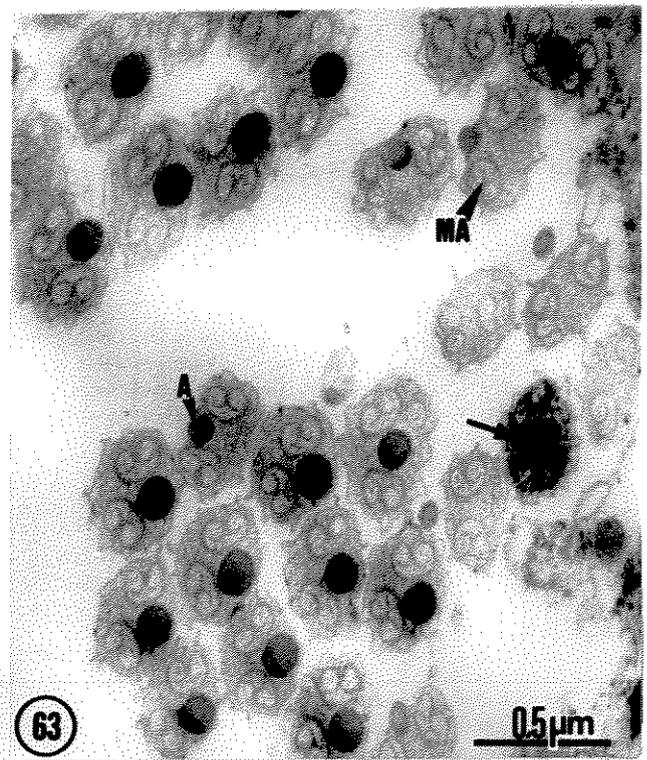
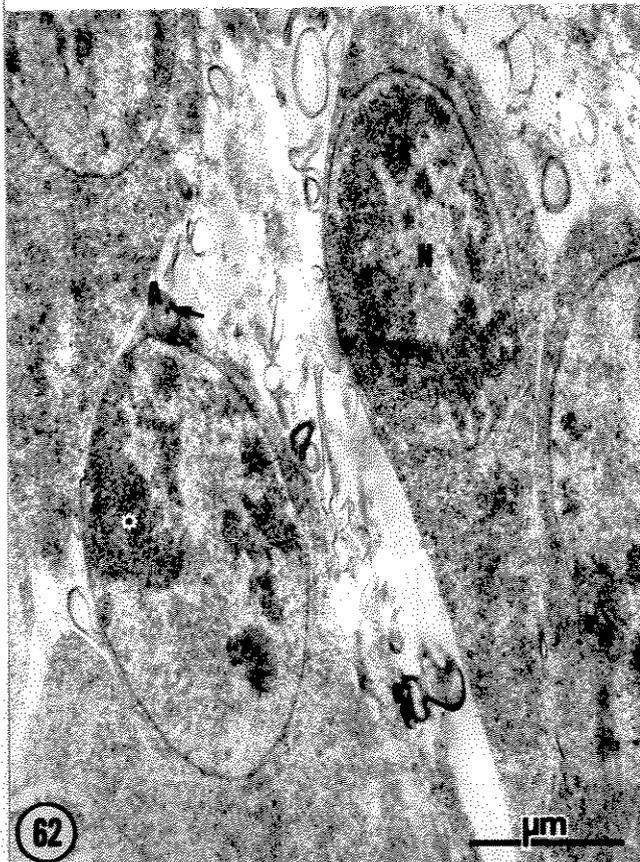
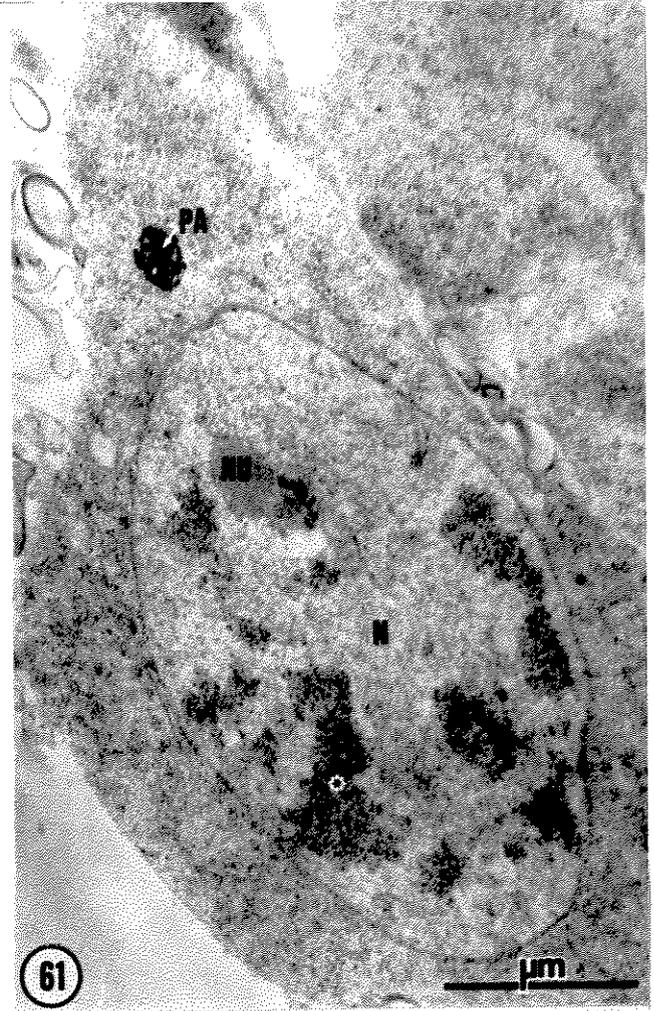
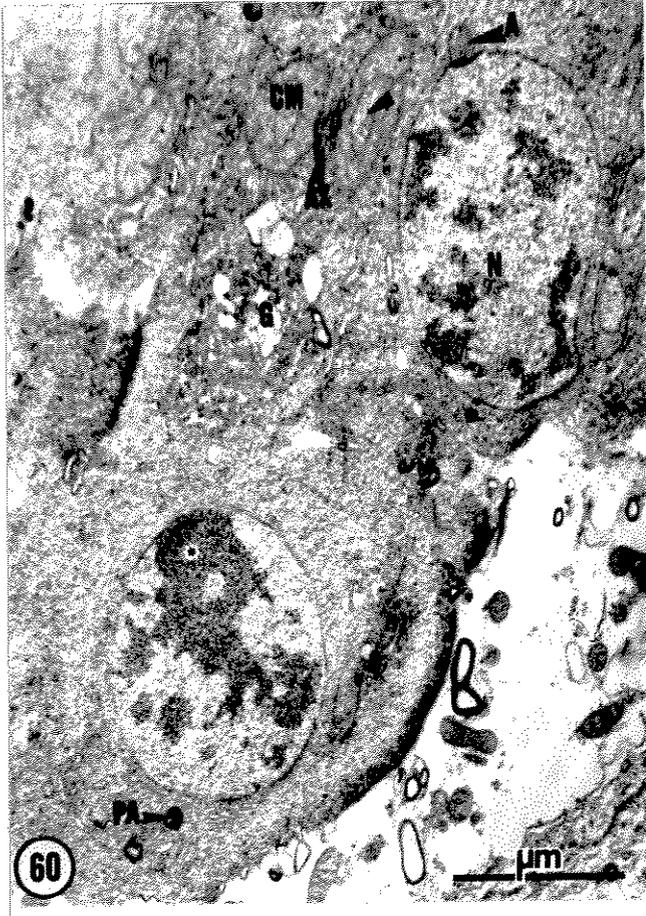
Reação citoquímica para fosfatase ácida, segundo BARKA & ANDERSON, em espermátides de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem, durante o processo de formação do acrossoma.

**Figura 60** Espermátides em estádios iniciais do processo de maturação. Precipitados resultantes da ação enzimática estão presentes nas áreas de cromatina mais condensada (\*) do núcleo (N) ovóide, nas cisternas do complexo de Golgi (G) e na vesícula pró-acrossômica; acrossoma (A) com leve marcação. Observam-se ainda, axonema (AX) em corte oblíquo e complexo mitocondrial (CM) com porções citoplasmáticas (►) em seu interior. 21.900 X.

**Figura 61** Espermátide no estágio 3 de diferenciação. A figura mostra: núcleo (N) ovóide com precipitados resultantes da ação enzimática nas áreas de cromatina mais condensada (\*); nucléolo (NU) com alguns precipitados, restritos às regiões periféricas; vesícula pró-acrossômica (PA) com densos depósitos de fosfato de chumbo. 24.600 X.

**Figura 62** Espermátides no estágio 4 de diferenciação. Precipitados resultantes da ação enzimática estão presentes nas áreas de cromatina mais condensada (\*) do núcleo (N) ovóide. Apenas dois grânulos (►) de depósitos de fosfato de chumbo são observados a nível do acrossoma (A). 19.800 X.

**Figura 63** Espermátides no estágio 8 de diferenciação. Observam-se: núcleo (N) com cromatina em fase final de compactação; membranas adjacentes ao núcleo (MA); e acrossoma (A) sem precipitados. O conteúdo citoplasmático de uma espermátide (►) encontra-se com grande quantidade de precipitados resultantes da ação da fosfatase ácida. 34.700 X.

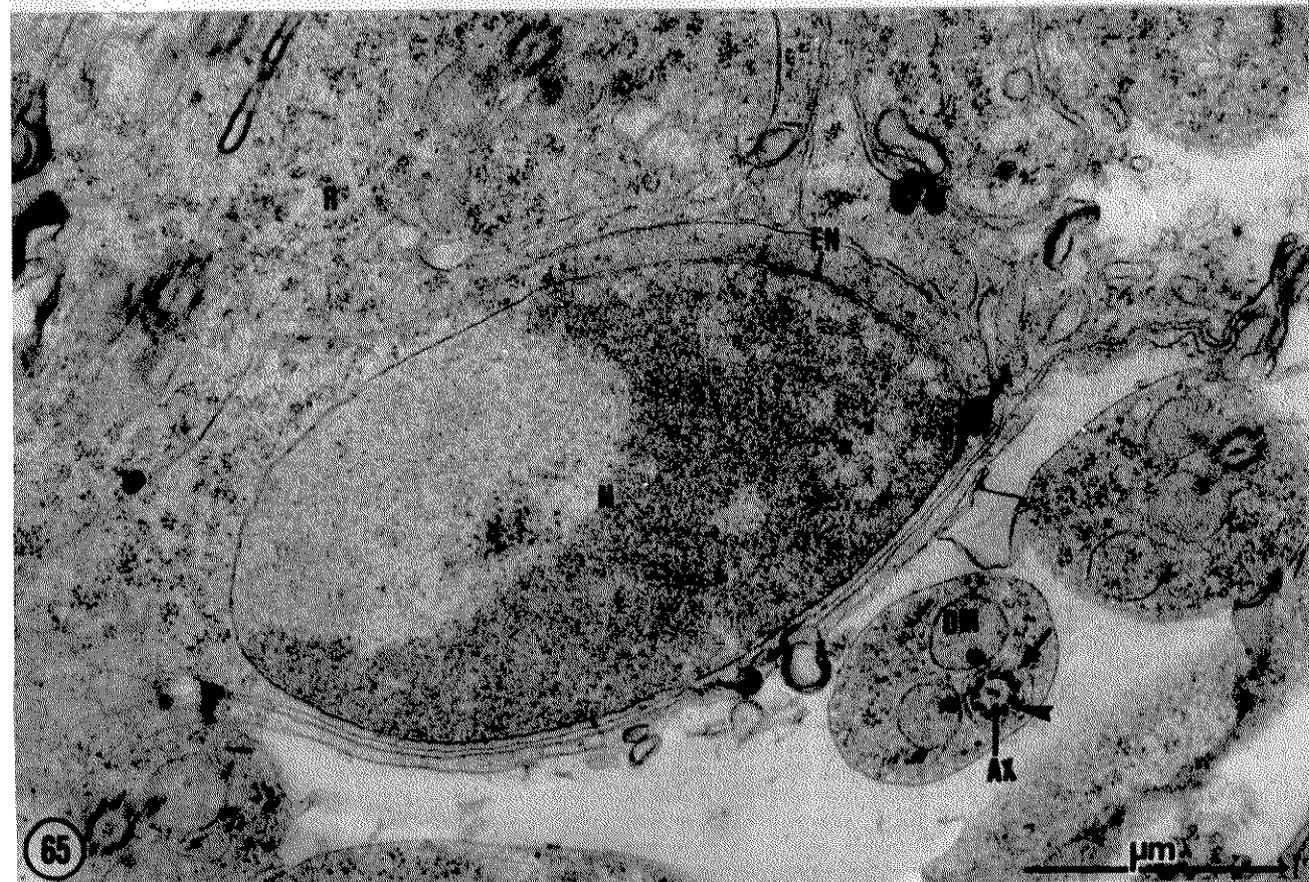
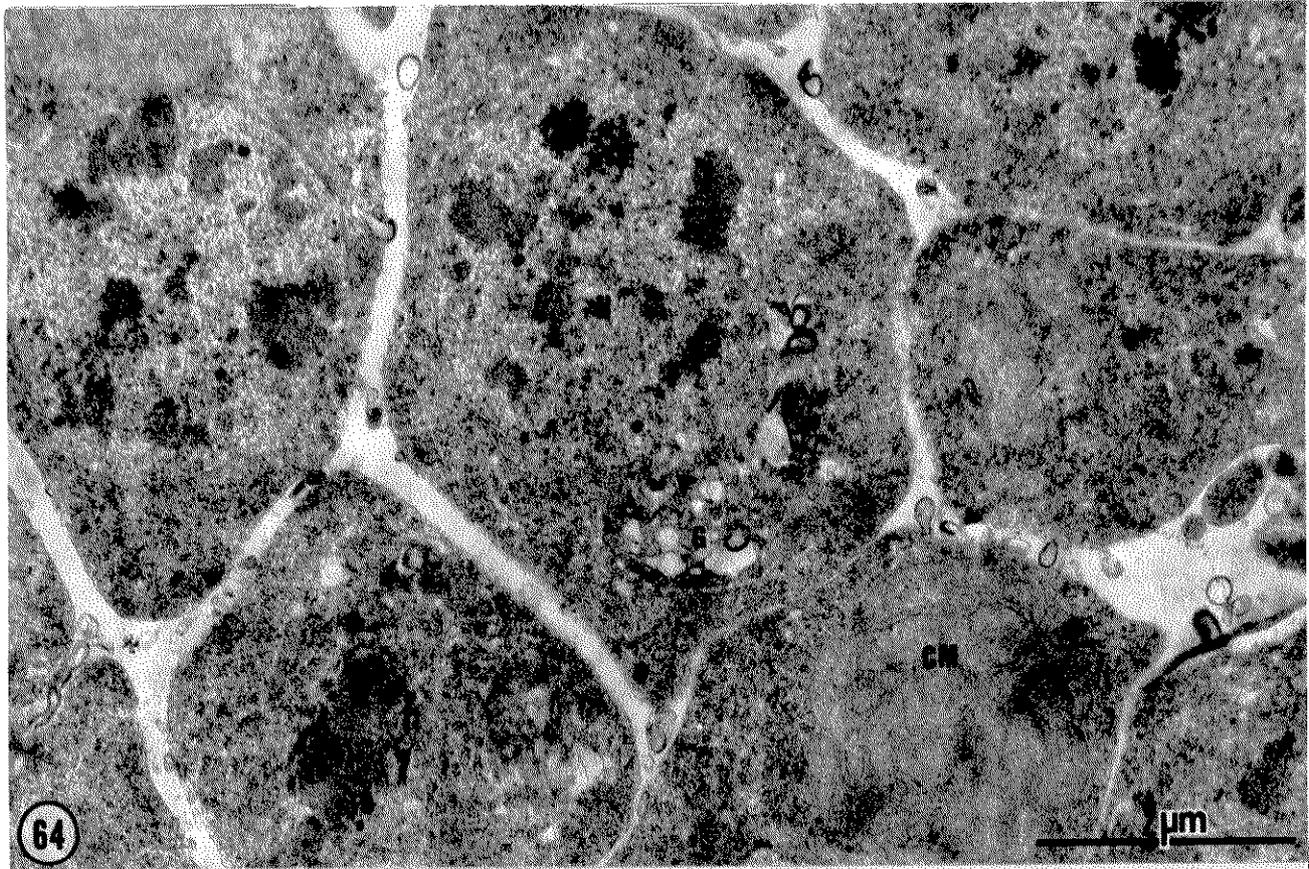


## Figuras 64 e 65

Controles da reação citoquímica para fosfatase ácida. Método BARKA & ANDERSON; meio de incubação sem o substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio.

**Figura 64** Espermátides de *Ceratitidis capitata*, tipo selvagem, no estágio 2 de diferenciação. Não ocorrem precipitados no núcleo (N) ovóide com áreas de cromatina mais compactada, nucléolo (NU), complexo de Golgi (G) e complexo mitocondrial (CM). 16.200 X.

**Figura 65** Espermátides de *Ceratitidis capitata*, linhagem selvagem, no estágio 2 de diferenciação. A figura mostra: núcleo (N) ovóide com uma grande área de cromatina condensada sem a presença do produto da reação enzimática; envólucro nuclear (EN) com complexos de poros em uma região específica; acrossoma (A); axonema (AX) com as fibras acessórias (►) em formação, circundado por dupla membrana lisa (→); derivados mitocondriais (DM) com material eletrondenso em arranjo paracristalino; e inúmeros ribossomos (R). 32.800 X.



## Figuras 66 a 70

Atividade fosfatásica ácida a nível do núcleo, de células espermáticas em diferenciação, de *Ceratitis capitata*. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 66** Espermátides do mutante “olho róseo”, no estágio 6 de diferenciação.

Observam-se: núcleo (N) bicôncavo, com cromatina em compactação formando uma camada eletrondensa junto a face interna do envólucro nuclear; densos precipitados resultantes da reação fosfatase ácida em alguns núcleos (→); regiões de células que formam a parede do cisto (CI) com lisossoma (L) apresentando depósitos de fosfato de chumbo. 26.500 X.

**Figura 67** Espermátide do mutante “olho róseo”, no estágio 7 de diferenciação.

O núcleo (N) sem concavidades laterais e com cromatina em compactação apresenta alguns precipitados (▶) resultantes da reação para fosfatase ácida. A reação enzimática também, pode ser observada no envólucro nuclear (EN). Observam-se ainda, membranas adjacentes ao núcleo (MA). 108.300 X.

**Figura 68** Espermátides da mosca tipo selvagem, no estágio 7 de diferenciação.

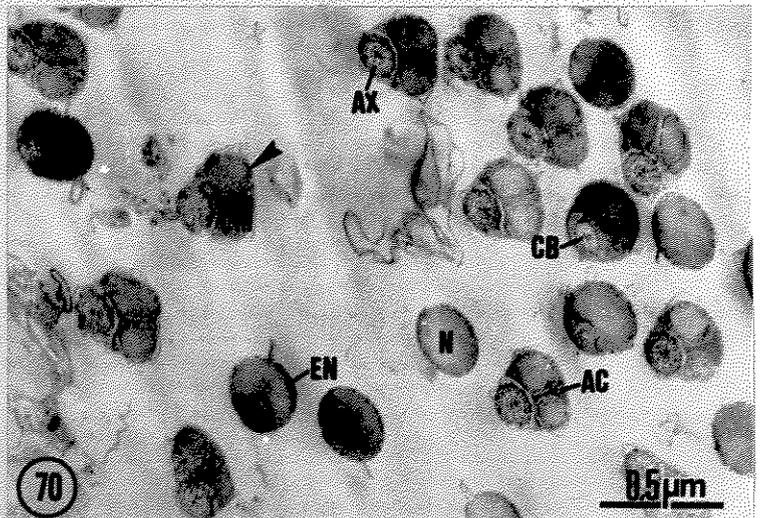
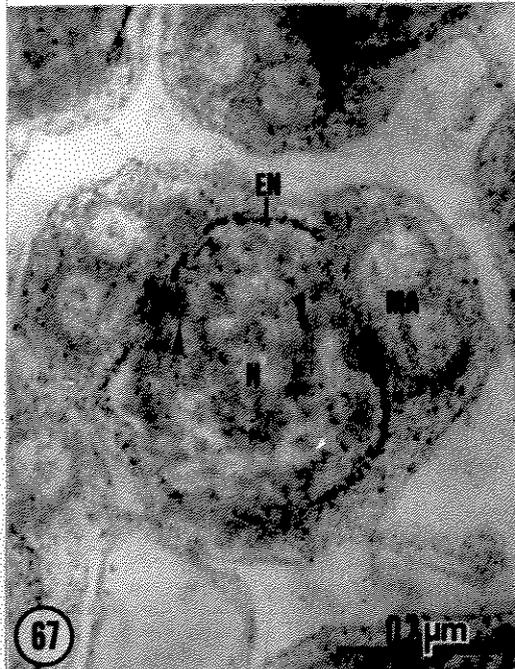
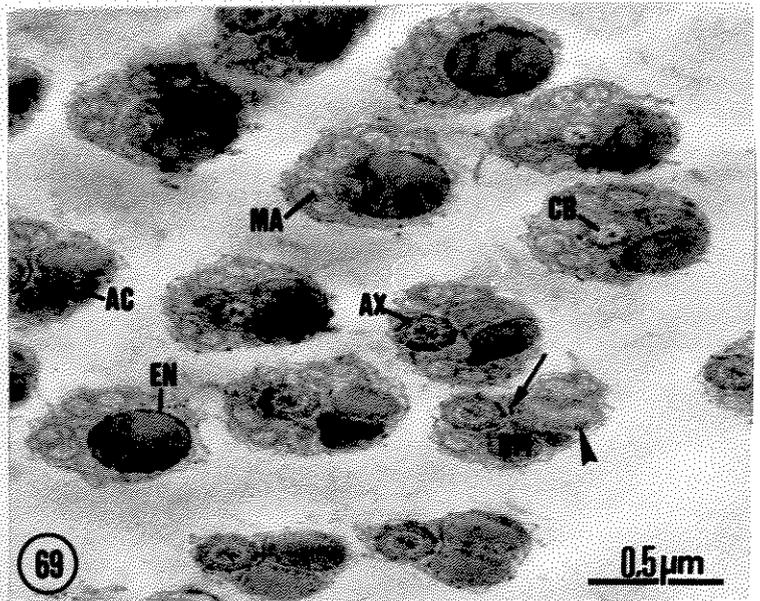
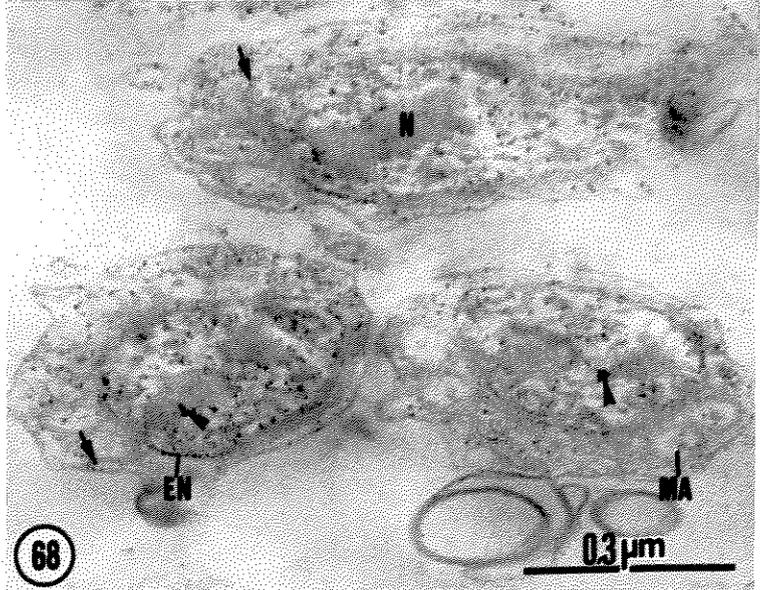
A figura mostra: núcleo (N) sem concavidades e com precipitados (▶), resultantes da reação fosfatase ácida, principalmente nas regiões de cromatina menos compactadas; produtos da reação, presentes também, em regiões do envólucro nuclear (EN) e a nível citoplasmático (→); membranas adjacentes ao núcleo (MA). 78.500 X.

**Figura 69** Espermátides da mosca tipo selvagem, no estágio 9 de diferenciação.

Na figura observam-se: núcleo (N) com cromatina em fase final de compactação; envólucro nuclear (EN) com depósitos de fosfato de chumbo; membranas adjacentes ao núcleo (MA); corpúsculo basal (CB) e adjunto do centríolo (AC). São encontrados precipitados resultantes da reação para fosfatase ácida nas porções periféricas (▶) dos derivados mitocondriais (DM) e na dupla membrana lisa (→) entre os derivados mitocondriais e o axonema (AX). 34.700 X.

**Figura 70** Espermátides da mosca tipo selvagem, no estágio 10 de diferenciação.

A figura mostra: núcleo (N) com cromatina compactada; corpúsculo basal (CB); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; e adjunto do centríolo (AC). São observados precipitados resultantes da atividade fosfatásica ácida no envólucro nuclear (EN) e regiões periféricas (▶) dos derivados mitocondriais (DM). 31.900 X.



## Figuras 71 e 72

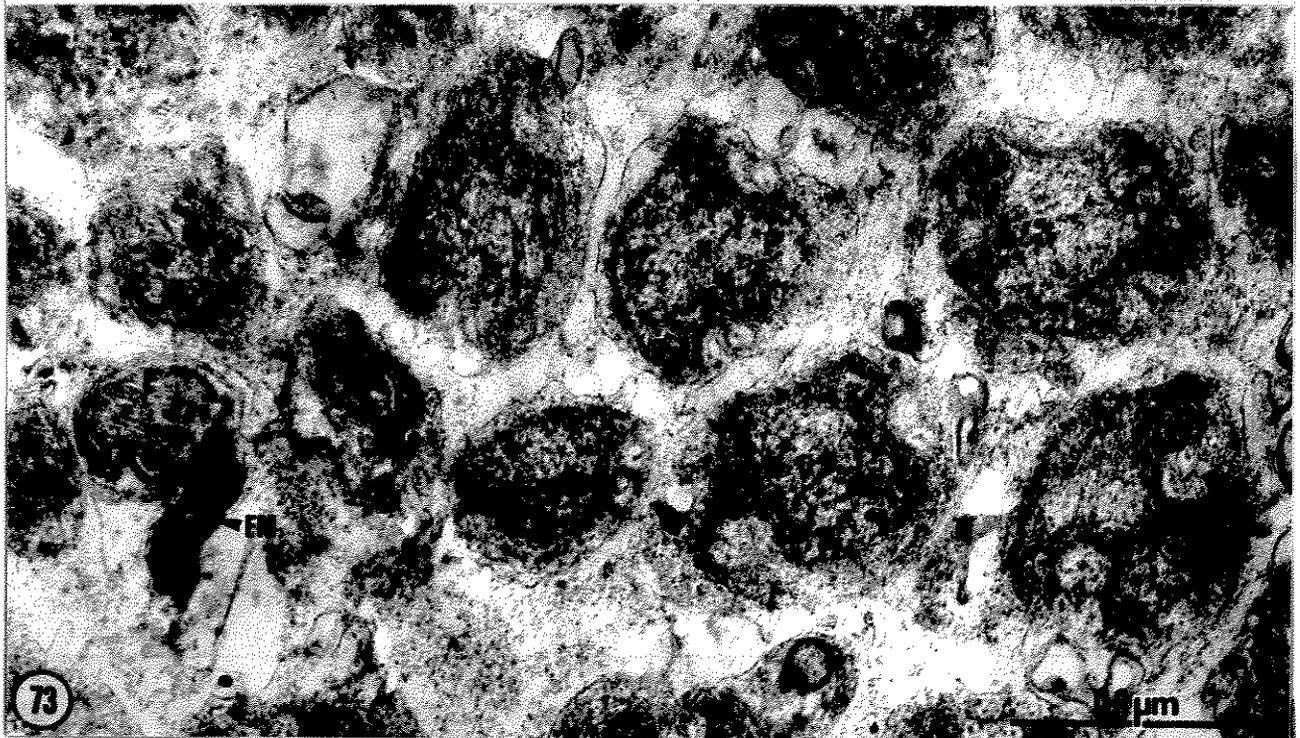
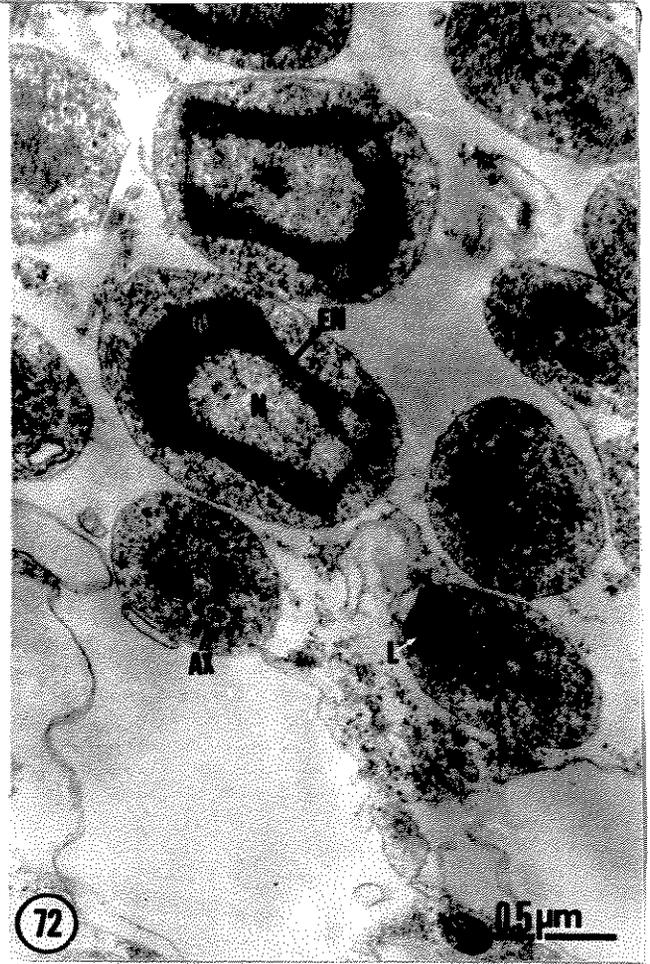
Reação citoquímica para fosfatase ácida em espermátides do mutante “olho róseo” de *Ceratitis capitata*, no estágio 6 de diferenciação. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 71** O produto da reação enzimática está presente no núcleo (N) bicôncavo, principalmente na cromatina que forma uma camada eletrondensa (\*) junto à face interna do envólucro nuclear; e em uma vesícula lisossômica (L) que se encontra no citoplasma. 43.800 X.

**Figura 72** Finos precipitados resultantes da reação enzimática são observados no núcleo (N) bicôncavo e no envólucro nuclear (EN). Na vesícula lisossômica (L) densos depósitos de fosfato de chumbo estão presentes. Observam-se ainda, axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM). 40.100 X.

## Figura 73

**Figura 73** Controle da reação citoquímica para fosfatase ácida. Método BARKA & ANDERSON, meio de incubação sem o substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio. Na figura observam-se: núcleo (N) com cromatina em compactação; flagelo (F); e estruturas tipo figuras mielínicas (FM). O produto da reação enzimática encontra-se ausente nas referidas estruturas. 39.200 X.



## Figuras 74 a 77

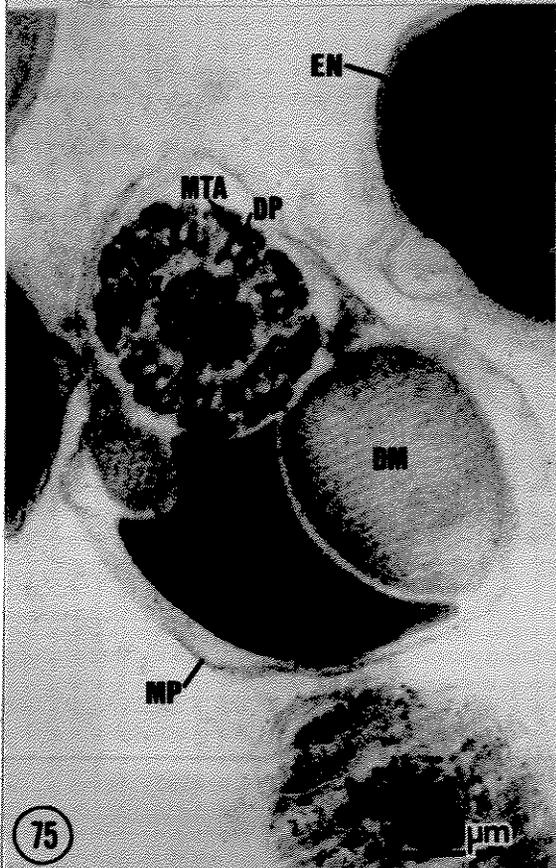
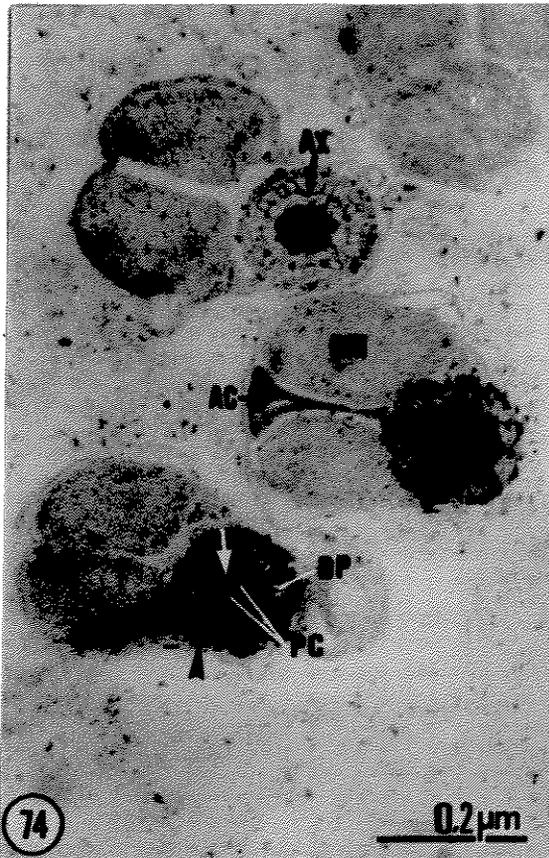
Atividade fosfatásica ácida em flagelos de espermátides de *Ceratitis capitata*. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 74** Corte transversal da cauda de espermatozóides de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem. A figura mostra: adjunto do centríolo (AC) entre os dois derivados mitocondriais (DM); axonema (AX) com depósitos de fosfato de chumbo nas fibras eletrondensas (→) localizadas entre o par central (PC) e as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP), e nas fibras eletrondensas (▶) encontradas entre os microtúbulos acessórios. 83.300 X.

**Figura 75** Corte transversal da região nuclear e inicial da cauda de espermatozóides da mosca, tipo selvagem. Observam-se: adjunto do centríolo (AC) entre os dois derivados mitocondriais (DM) com material eletrondenso em arranjo paracristalino; axonema (AX) com finos precipitados resultantes da reação fosfatase ácida nas fibras eletrondensas (→) localizadas entre o par central e as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP); microtúbulos acessórios (MTA), núcleo (N) com cromatina compactada, envólucro nuclear (EN) e membrana plasmática (MP) sem produtos da reação. 142.200 X.

**Figura 76** Corte longitudinal do axonema, de espermatozóide de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, demonstrando produto da reação fosfatase ácida nas fibras eletrondensas (→) localizadas entre o par central (PC) e as nove duplas periféricas de microtúbulos, e nas fibras eletrondensas (▶) encontradas entre os microtúbulos acessórios. 108.300 X.

**Figura 77** Conjunto de flagelos do mutante "olho róseo", no estágio 8 de diferenciação. Precipitados resultantes da reação enzimática fosfatásica ácida podem ser observados nas regiões periféricas dos derivados mitocondriais (DM); no axonema (AX) especificamente, nas fibras eletrondensas (▶) localizadas entre o par central e as nove duplas periféricas de microtúbulos, e nas fibras eletrondensas (▶▶) encontradas entre os microtúbulos acessórios; e na dupla membrana lisa (→) que circunda o axonema. 34.700 X.



## Figuras 78 e 79

Reação citoquímica para fosfatase ácida em células espermáticas do mutante "olho róseo" de *Ceratitís capitata*. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 78** Corte na região mediana da cauda de espermatozóides, no estágio 8 de diferenciação. Depósitos de fosfato de chumbo são observados no local do axonema (AX) da maioria das células, e no conteúdo citoplasmático de algumas espermátides (\*). Observam-se ainda, derivados mitocondriais (DM) sem produto da reação. 31.900 X.

**Figura 79** Região de um cisto, corte na região mediana da cauda, de células espermáticas na fase final de maturação. Observam-se: derivados mitocondriais (DM); axonemas (AX) de espermátides apresentando intensidade variável da reação enzimática; regiões das células que formam a parede do cisto (CI) e vesícula lisossômica (L) com depósitos de fosfato de chumbo. 15.700 X.

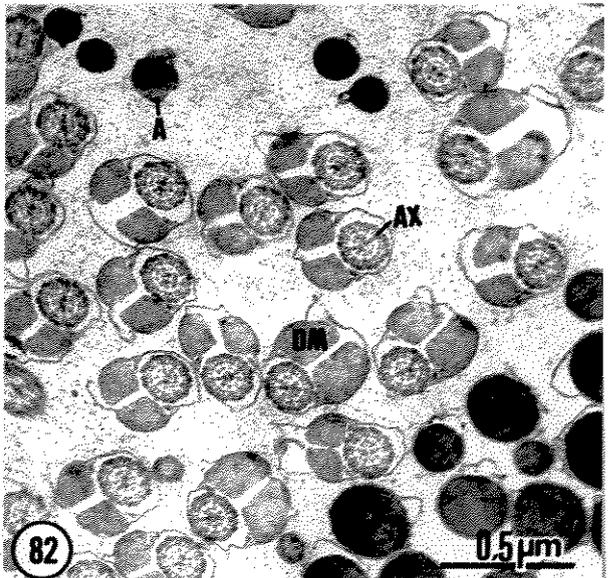
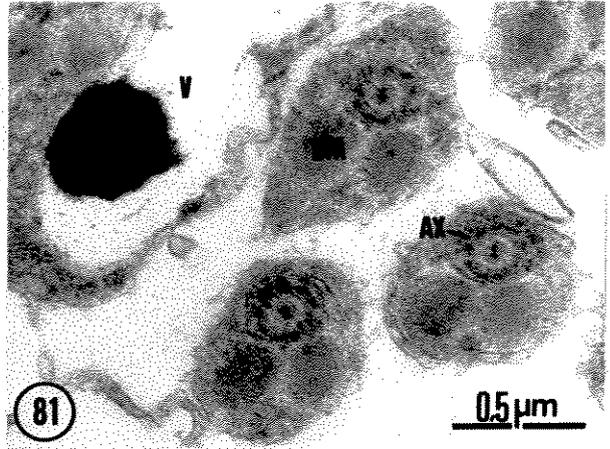
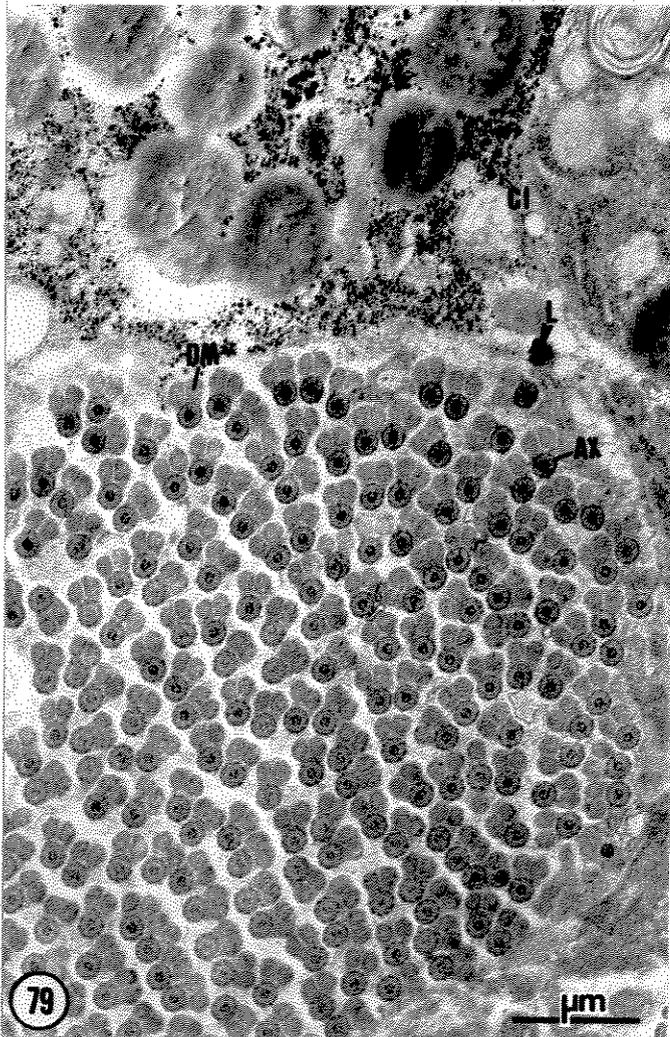
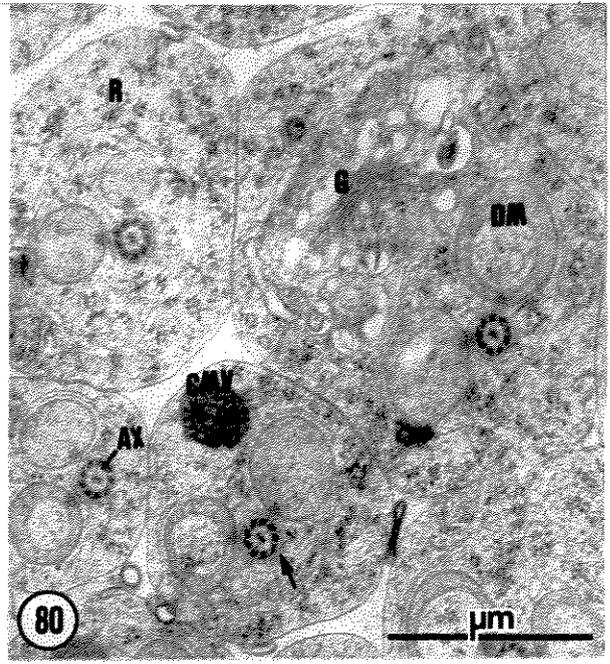
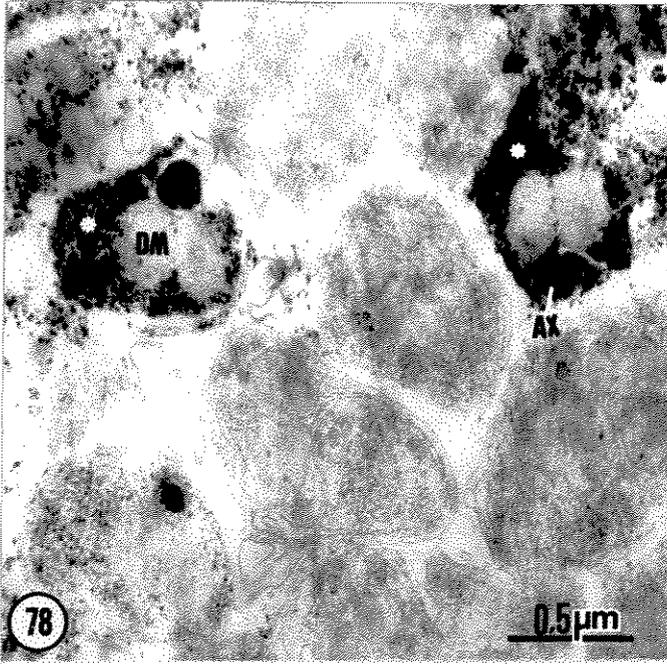
## Figuras 80 a 82

Controles da reação citoquímica para fosfatase ácida. Método BARKA & ANDERSON, meio de incubação sem o substrato,  $\beta$ -glicerofosfato de sódio.

**Figura 80** Espermátides de *Ceratitís capitata*, linhagem selvagem, no estágio 4 de diferenciação, corte a nível da região caudal. A figura mostra: axonema (AX), com os dois micotúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos, circundado pela dupla membrana lisa ( $\rightarrow$ ); derivados mitocondriais (DM) com porções citoplasmáticas em seu interior; complexo de Golgi (G); corpúsculo multivesicular (CMV); grande quantidade de ribossomos (R) no citoplasma.. Verifica-se a ausência do produto da reação enzimática nas estruturas celulares. 26.500 X.

**Figura 81** Espermátides do mutante "olho róseo", no estágio 8 de diferenciação. Nos componentes flagelar, axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM), verifica-se a ausência de depósitos de fosfato de chumbo. Observa-se ainda, vacúolo (V) com áreas eletrólúcidas e eletron densas típicas deste estágio. 33.800 X.

**Figura 82** Espermatozóides do mutante "olho róseo". Observam-se: núcleo (N) com cromatina bastante compactada; acrossoma (A); axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares; e derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eletron denso. O produto da reação enzimática fosfatásica ácida encontra-se ausente nas estruturas celulares. 33.800 X.



## Figuras 83 a 86

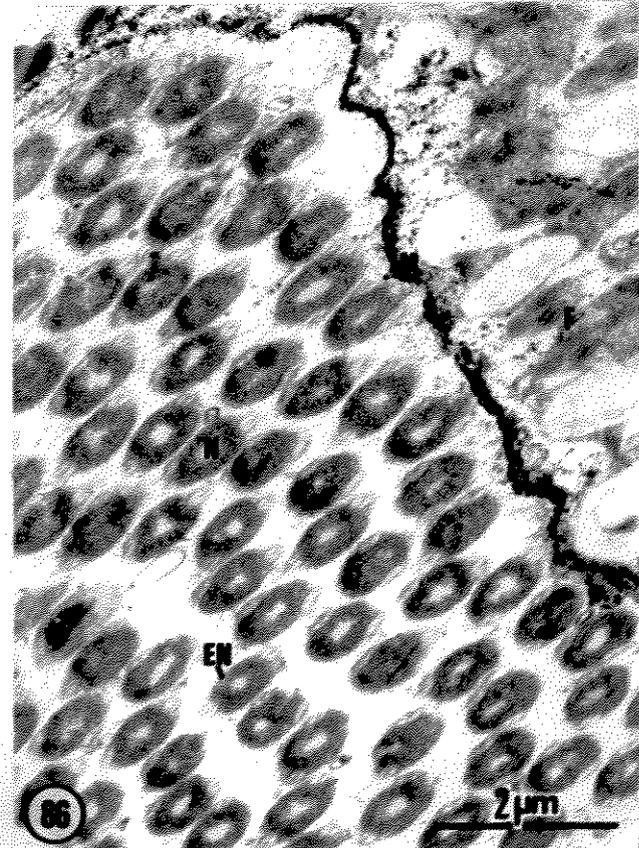
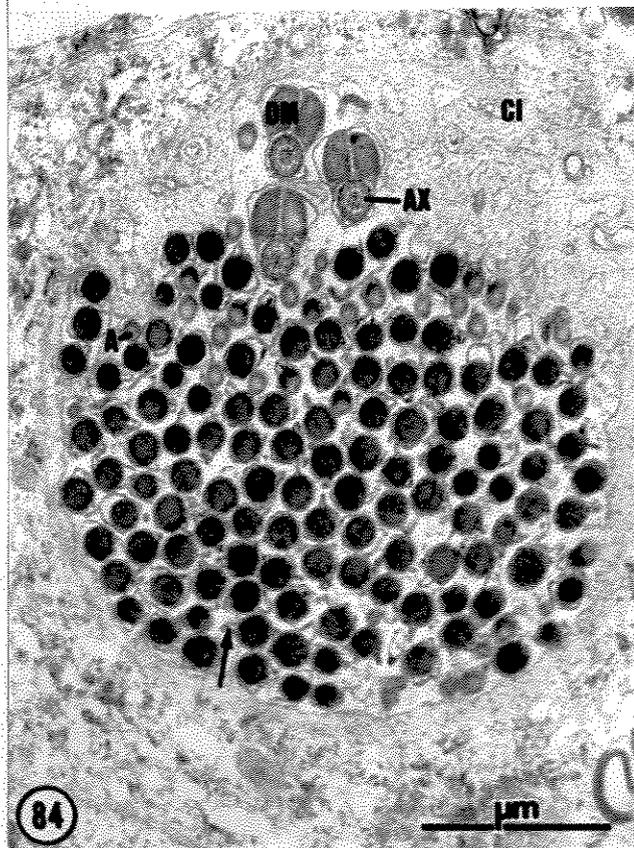
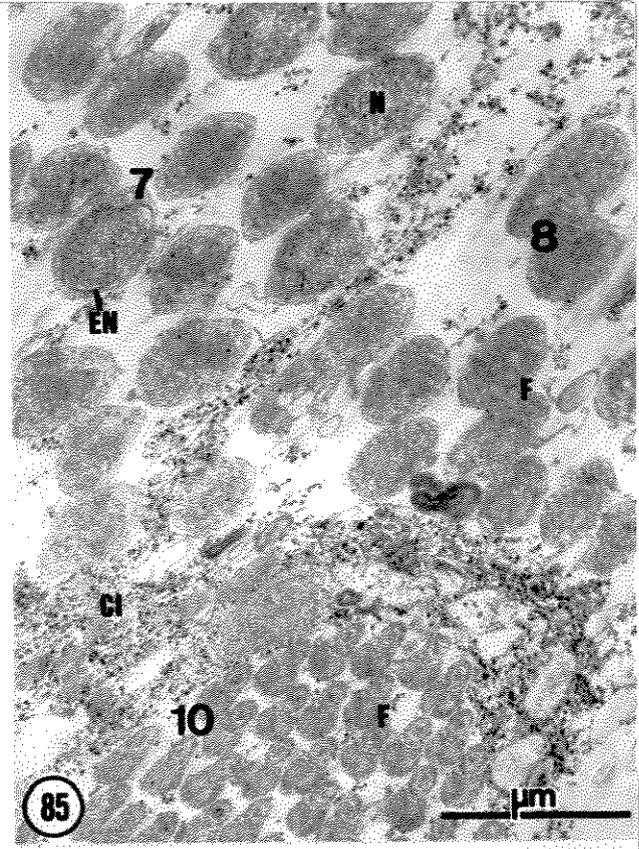
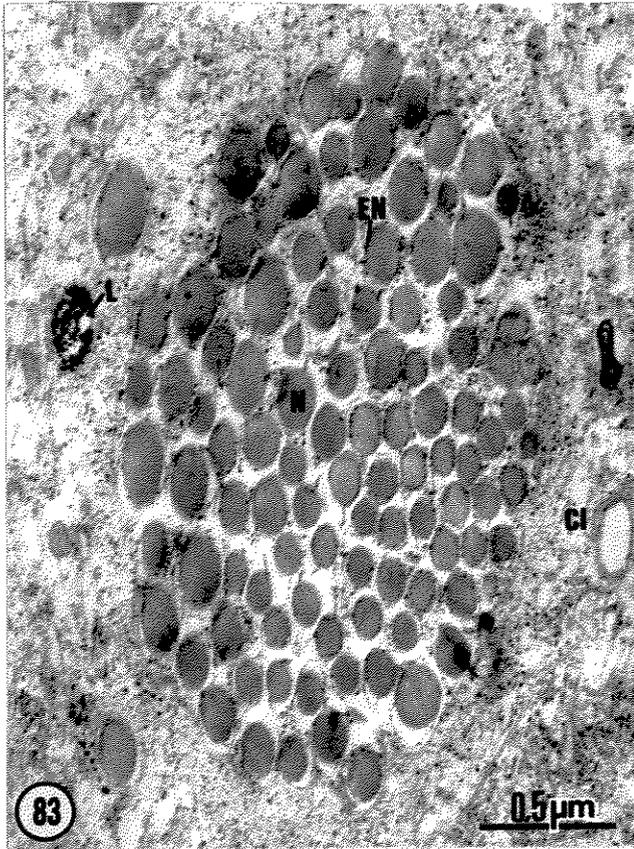
Atividade fosfatásica ácida nas células que formam a parede dos cistos. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 83** Cisto organizado, com células espermáticas em fase final de maturação, de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, corte na região do núcleo (N). Observam-se depósitos de fosfato de chumbo no envólucro nuclear (EN) de algumas células. Nas células que formam a parede do cisto (CI) uma vesícula lisossômica (L) apresenta densos precipitados resultantes da atividade enzimática. 34.700 X.

**Figura 84** Cisto organizado, com espermatozoides maduros, do mutante "olho róseo". Controle da reação citoquímica para fosfatase ácida. A figura mostra: núcleo (N) com cromatina bem compactada e acrosoma (A), componentes da cabeça do espermatozoide; axonema (AX) e derivados mitocondriais (DM), componentes do flagelo do espermatozoide. Observam-se expansões da membrana citoplasmática (→) nos espermatozoides. Nas células que formam a parede do cisto (CI) o produto da reação enzimática está ausente. 24.600 X.

**Figura 85** Porções de três cistos do mutante "olho róseo". As células que formam a parede dos cistos (CI) encontram-se em processo degenerativo e apresentam precipitados resultantes da atividade enzimática fosfatásica ácida. Nas células espermáticas observam-se: núcleos (N) de espermatídes no estágio 7 de diferenciação, com cromatina em compactação e envólucro nuclear (EN) com produtos da reação enzimática; flagelos (F) de espermatídes nos estádios 8 e 10 de maturação. 24.600 X.

**Figura 86** Porções de dois cistos do mutante "olho róseo". Os resíduos de membranas (M), resultantes da destruição das células que formam a parede dos cistos, apresentam densos depósitos de fosfato de chumbo. Nas células espermáticas observam-se: núcleo (N); envólucro nuclear (EN) com fino precipitado resultante da reação enzimática; e flagelo (F). 12.100 X.



## Figuras 87 a 90

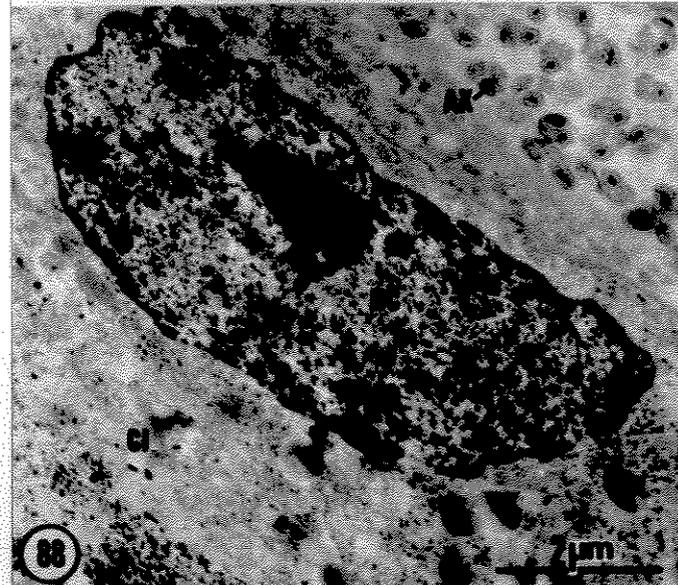
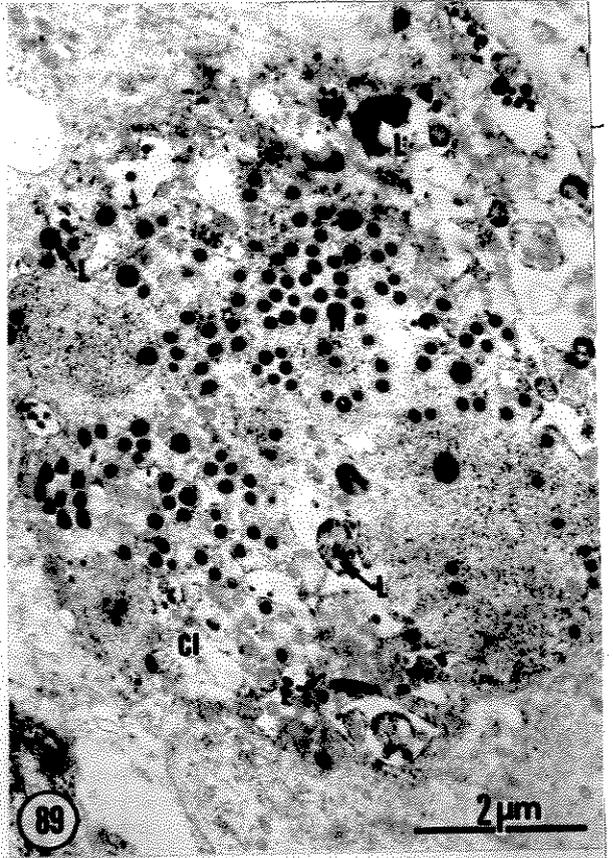
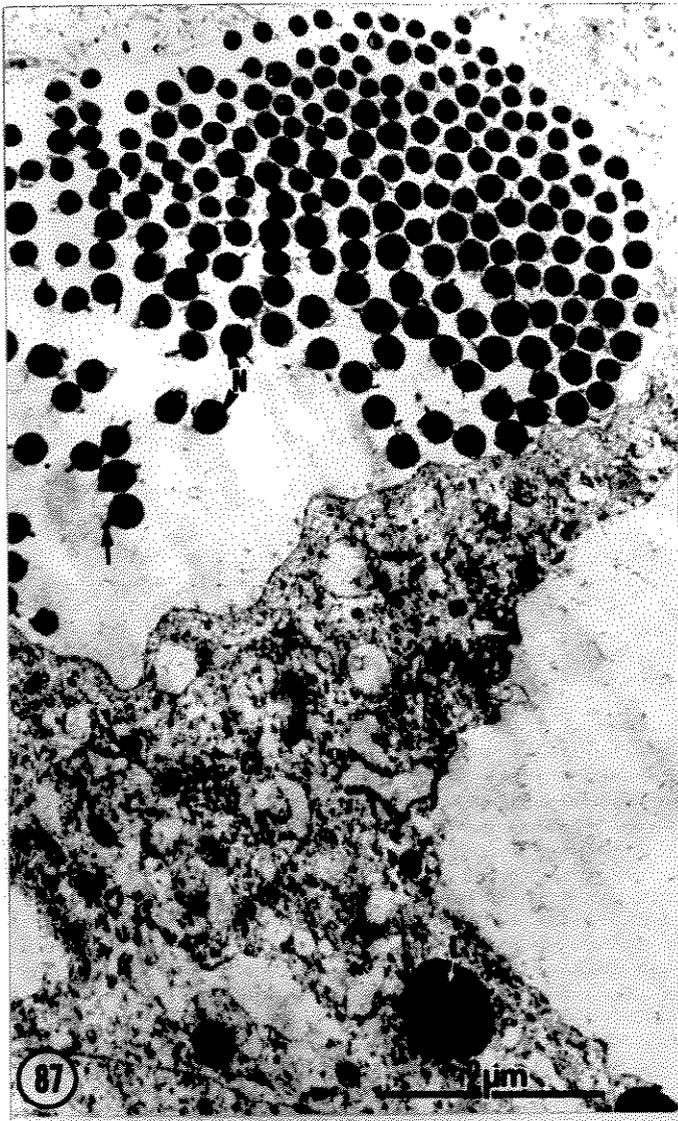
Reação citoquímica para fosfatase ácida nas células que formam a parede dos cistos. Método BARKA & ANDERSON.

**Figura 87** Cisto organizado do mutante "olho róseo", corte transversal na região do núcleo (N). A membrana citoplasmática dos espermatozóides apresenta-se com expansões (→). Na célula cística (CI) observa-se uma vesícula lisossômica (L) com densos depósitos de fosfato de chumbo. 14.800 X.

**Figura 88** Célula que forma a parede do cisto e espermatozóides de *Ceratitidis capitata*, linhagem selvagem. A figura mostra: núcleo (NC) da célula cística (CI) com precipitados de fosfato de chumbo, principalmente na cromatina (→) que se encontra em contato com a face interna do envólucro nuclear; nucléolo (NUC) da célula cística; axonemas (AX) dos flagelos com produto da reação enzimática. 11.200 X.

**Figura 89** Cisto do mutante "olho róseo", com espermatozóides em eliminação. Observam-se: núcleo (N) de espermatozóides; inúmeros lisossomos (L) com depósitos de fosfato de chumbo. Encontra-se também, o produto da reação enzimática distribuído em todo o conteúdo citoplasmático das células císticas (CI). 10.800 X.

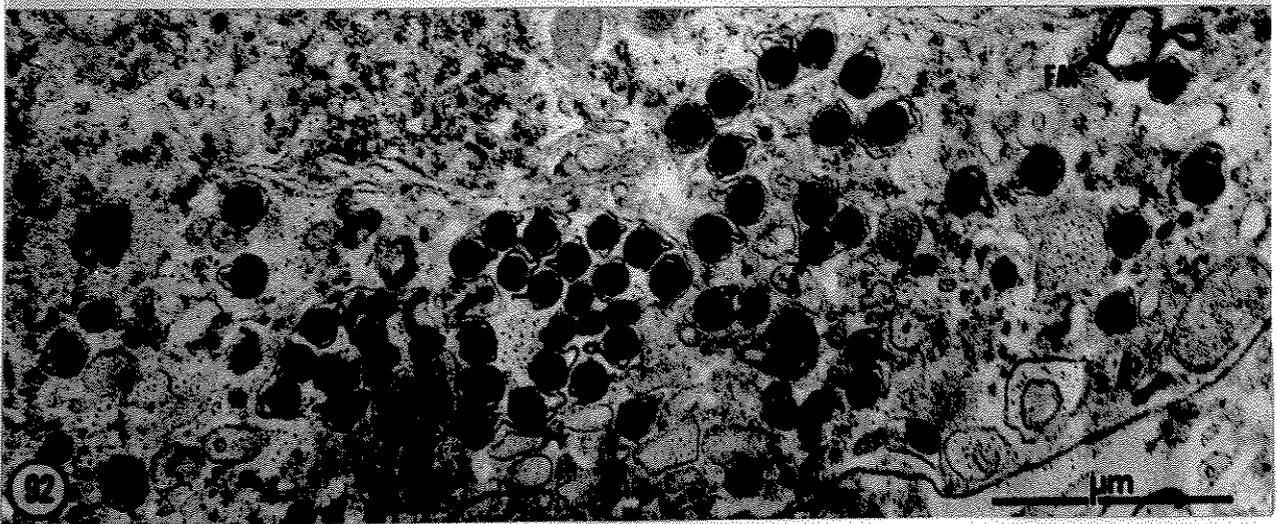
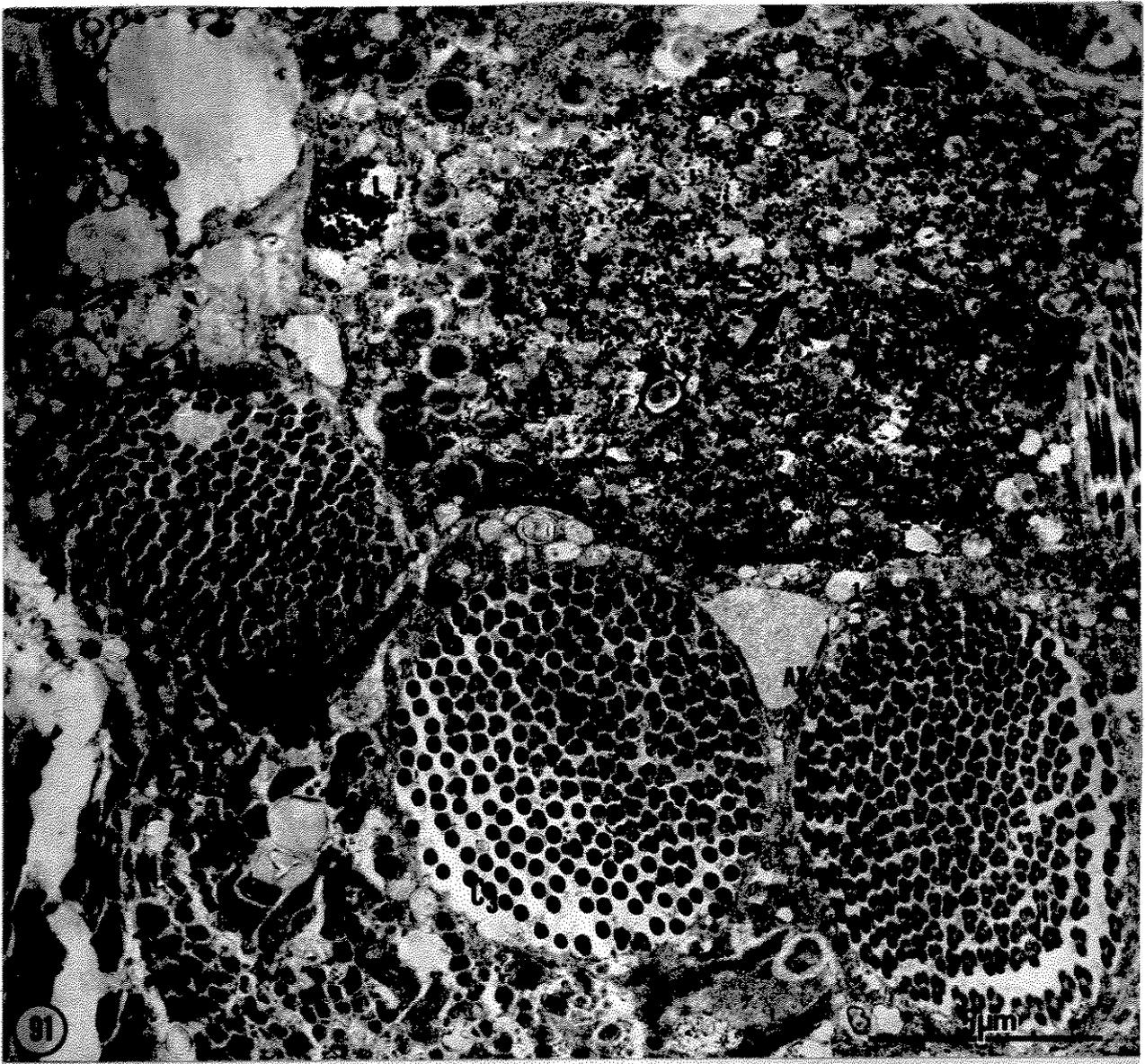
**Figura 90** Região proximal (basal) do testículo de *Ceratitidis capitata*, tipo selvagem. As células císticas (CI) encontram-se em processo degenerativo e apresentam precipitados (→) resultantes da atividade enzimática. Observam-se também, espermatozóides (E) sendo eliminados. 5.500 X.



## Figuras 91 e 92

**Figura 91** Atividade fosfatásica ácida em massas residuais de cistos e espermatozoides do mutante "olho róseo". Observam-se dois cistos ( $C_1$  e  $C_2$ ) em corte transversal na região mediana da cauda e um cisto ( $C_3$ ) em corte transversal na região terminal da cabeça e inicial da cauda. Depósitos de fosfato de chumbo são observados no axonema (AX) de muitos flagelos, nos lisossomos (L) das células císticas (CI) e massa residual de um cisto (→). 6.800 X.

**Figura 92** Controle para a atividade fosfatásica ácida em células císticas e espermatozoides em eliminação de *Ceratitis capitata*, linhagem selvagem. A figura mostra: núcleo (N) e acrossoma (A) de espermatozoides; conteúdo citoplasmático das células que formam a parede do cisto (CI) e estruturas tipo figuras mielínicas (FM) sem produtos da reação enzimática. 31.900 X.



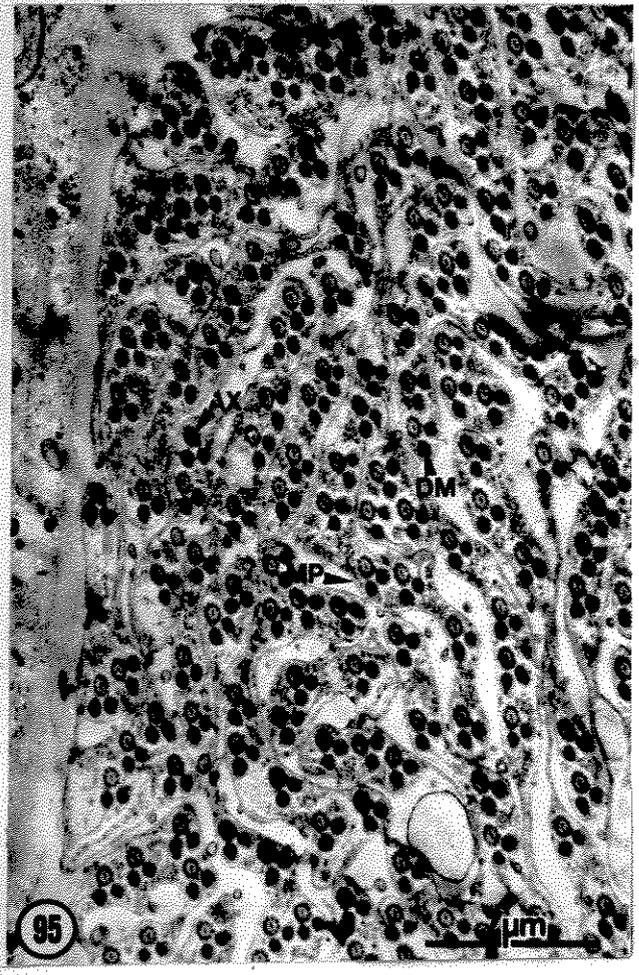
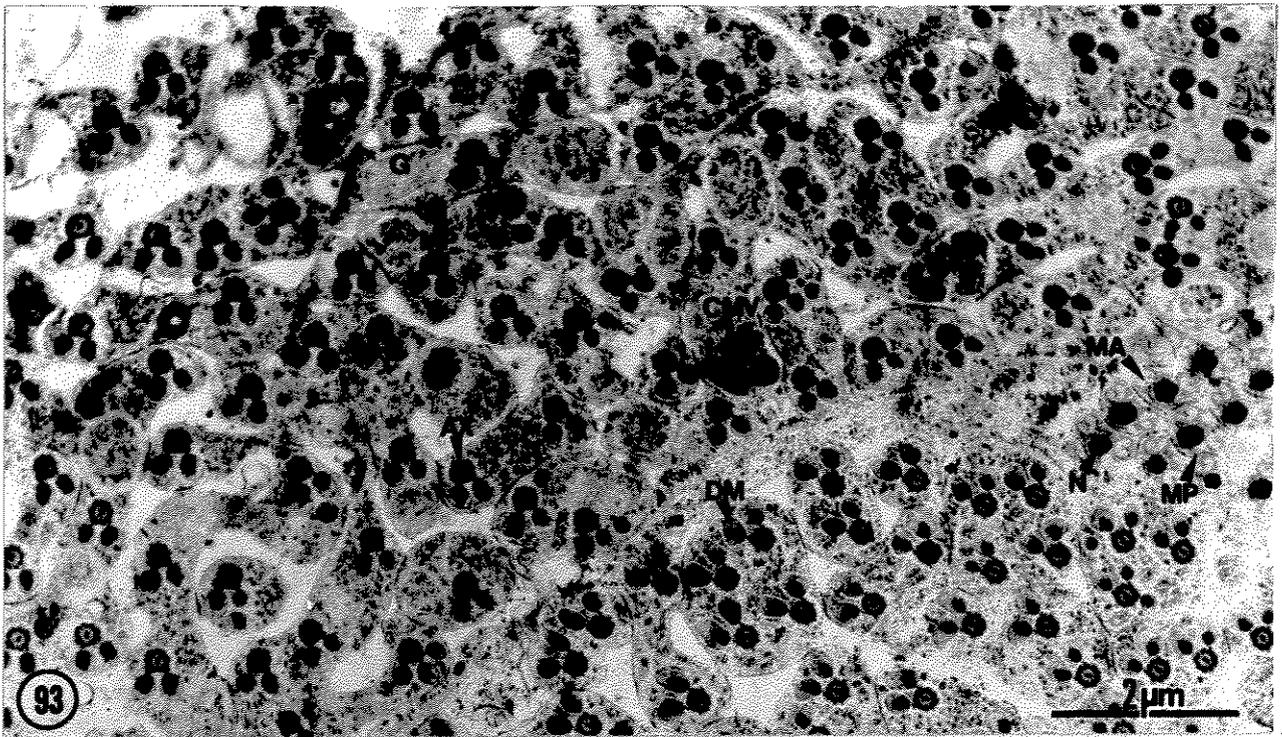
## Figuras 93 a 95

Atividade arilsulfatase em células espermáticas de *Ceratitis capitata*. Método HOPUSU-HAVU *et alii*.

**Figura 93** Espermátides de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, no estágio 8 de diferenciação. Na figura observam-se: núcleo (N) com cromatina em fase final de compactação; membranas adjacentes ao núcleo (MA); axonema (AX); e derivados mitocondriais (DM). Precipitados resultantes da atividade enzimática arilsulfatase localizam-se em corpúsculos multivesiculares (CMV), complexo de Golgi (G) e regiões da membrana plasmática (MP). Vários flagelos estão no interior de uma massa citoplasmática comum. 12.400 X.

**Figura 94** Espermátides do mutante “olho róseo”, no estágio 8 de diferenciação. Corte a nível da região mediana do flagelo. Observam-se axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares e derivados mitocondriais (DM). No complexo de Golgi (G), nas estruturas lembrando figuras mielínicas (FM) e em regiões da membrana plasmática (MP) encontram-se depósitos de sulfato de bário. Vários flagelos estão no interior de uma massa citoplasmática comum. 14.800 X.

**Figura 95** Controle para a atividade arilsulfatase. Espermátides do mutante “olho róseo”, no estágio 8 de diferenciação. Corte a nível da região mediana do flagelo. O produto da reação enzimática está ausente em todas as estruturas celulares observadas, como axonema (AX), derivados mitocondriais (DM) e membrana plasmática (MP). Vários flagelos estão no interior de uma massa citoplasmática comum. 11.500 X.



## Figuras 96 a 99

Atividade arilsulfatase em células espermáticas e células císticas de *Ceratitis capitata*. Método HOPSU-HAVU *et alii*.

**Figura 96** Espermátides, em estágio inicial de diferenciação, do mutante “olho róseo”. O núcleo (N) apresenta áreas de cromatina compactada. Na vesícula lisossômica (L) e nas estruturas tipo figuras mielínicas (FM) observam-se depósitos de sulfato de bário. 9.400 X.

**Figura 97** Espermátides, do mutante “olho róseo”, em estágio final de diferenciação. Em algumas espermátides (→) os núcleos (N) encontram-se circundados por extensas áreas de conteúdo citoplasmático. Uma célula espermática (↔) apresenta dois núcleos, ambos com a compactação cromatínica anormal. Os pontos de adesão (►) entre as células espermáticas aparecem mais eletrondensos. 31.000 X.

**Figura 98** Cisto organizado, de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem, com espermatozóides maduros. O produto da reação enzimática está ausente do núcleo (N) com cromatina bem compactada, do acrossoma (A) e do axonema (AX). As vesículas lisossômicas (L) das células císticas apresentam precipitados resultantes da atividade arilsulfatase. 13.500 X.

**Figura 99** Massa residual de cisto de *Ceratitis capitata*, tipo selvagem. A figura mostra: células pigmentadas (CP) e fibras musculares (FM) na parede do testículo; grandes vesículas lisossômicas (L) com depósitos de sulfato de bário. Sem evidências de reação encontram-se flagelos (F) de espermatozóides e porção de um núcleo (NC) de célula cística. 9.800 X.

