

do exemplar correspondente à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)

*Rejane Maira Góes*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

*2 + unilubi*

*Holder*

**Rejane Maira Góes**

**Espermatogênese em  
Passer domesticus (Aves, Passeriformes):  
Estudo estrutural e  
ultra-estrutural**

**CAMPINAS**

**1992**

**G553e  
v.1  
17187/BC**

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL



Rejane Maira Góes

**Espermatogênese em**  
**Passer domesticus (Aves, Passeriformes):**  
**Estudo estrutural e**  
**ultra-estrutural**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para a  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Biológicas na Área de  
Biologia Celular.

**Orientadora: Profª Dra. Mary Anne Heide Dolder**

**CAMPINAS**

**1992**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Considerações gerais sobre Espermatogênese .....	1
1.2. Notas sobre a classificação da Classe Aves .....	3
1.3. Espermatogênese em Aves .....	4
1.4. Notas sobre <u>Passer domesticus</u> .....	7
1.5. Objetivos .....	8
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
2.1. Material Biológico .....	10
2.2. Métodos .....	10
2.2.1. Preparo do material para observação ao microscópio de contraste de fase .....	10
2.2.2. Preparo dos decalques para observação ao Microscópio de luz comum .....	11
2.2.3. Preparo dos cortes em parafina para obser observação ao microscópio de luz comum .....	11
2.2.4. Análise do material e obtenção de foto micrografias .....	13
2.2.5. Preparo do material para microscopia eletrônica de transmissão .....	13
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Organização celular do testículo em período reprodutivo .....	15
3.2. Célula de Sertoli .....	17
3.3. Espermatogônias .....	18
3.4. Espermatócitos .....	18
3.5. Espermátides .....	19
3.6. Espermatozóides testiculares .....	24
3.7. Aspectos de basofilia nuclear resultantes ao tratamento pelo Azul de Toluidina a pH 4.0 .....	24
3.8. Formação do acrossomo .....	25
3.9. Formação do feixe de microtúbulos .....	26
3.10. Desenvolvimento do flagelo .....	27
3.11. Eliminação citoplasmática .....	29
3.12. Espermição .....	30

<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
4.1. Organização testicular em <u>Passer domesticus</u> .....	33
4.2. Epitélio germinativo .....	34
4.3. Feixe de espermátides .....	35
4.4. Célula de Sertoli .....	36
4.5. Espermatogônias .....	39
4.6. Espermatócitos .....	40
4.7. O corpo redondo .....	41
4.8. Massas citoplasmáticas densas .....	42
4.9. Estádios de diferenciação espermática .....	43
4.10. Compactação cromatínica .....	43
4.11. Substituição das histonas por protaminas .....	44
4.12. Formação do acrossomo .....	45
4.13. Desenvolvimento e organização da cauda .....	47
4.14. O feixe de microtúbulos .....	49
4.15. Obtenção da forma dos espermatozóides .....	51
4.16. Eliminação citoplasmática .....	52
4.17. Espermatozóides testiculares .....	54
4.18. Espermição .....	54
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
<b>6. RESUMO</b> .....	<b>59</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>

Aos meus pais  
Rubens e Rosely,  
pelo exemplo de amor e doação,  
que representam suas vidas.

## Agradecimentos

À Profa. Mary Anne Heide Dolder; pela orientação e participação durante todas as fases do trabalho, e pela amizade.

À Profa. Maria Luiza Silveira Mello, à Profa. Marina Silveira e à Profa. Shirley Recco Pimentel; pela contribuição no aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Sebastião Roberto Taboga e à Profa. Adelina Buzini Costa e Silva, da UNESP de São José do Rio Preto, pela oportunidade no uso de equipamentos, pelo auxílio durante a confecção do trabalho e sobretudo pela amizade.

Aos Professores, Funcionários, e Colegas do Departamento de Biologia Celular; que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

À coordenação e aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica; pela cooperação indispensável.

Ao CNPq; pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, aos meus irmãos Rubens, Renise e Ricardo, e à toda minha família; que mesmo não compreendendo o sentido do meu trabalho, souberam sempre incentivar e respeitar minha escolha.

Por fim, mas não com menor importância, ao Gerson, pela participação, compreensão e carinho.

# **VOLUME I**

# **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ESPERMATOGÊNESE

Os espermatozoides estão entre as células mais especializadas, apresentando grande especificidade de forma que reflete sua função bastante característica (FAWCETT *et al.*, 1971). Eles contêm a informação genética requerida para a transmissão hereditária das características da espécie e a maquinaria molecular necessária para a preservação, transporte e introdução desta informação no óvulo (PLA, 1981). Sendo assim, muitas são as modificações que uma determinada célula indiferenciada sofrerá até tornar-se um espermatozoide. Todas estas modificações fazem parte do processo designado espermatogênese (FAWCETT *et al.*, 1971). Este processo é um dos mais fundamentais e ao mesmo tempo um dos mais complexos que ocorrem nos eucariotos mais evoluídos (HENNIG, 1987).

Em vertebrados, o epitélio germinativo dos testículos é constituído basicamente pelas células da linhagem seminal ou espermatogênica e pelas células de Sertoli.

As células de Sertoli fornecem às células germinativas um microambiente ótimo, estando envolvidas na sua nutrição (UENO *et al.*, 1991), alongação (RASTOGI *et al.*, 1988 e TABOGA, 1990), e na fagocitose de resíduos citoplasmáticos (RUSSEL, 1970a, 1970b e RUSSEL & CLERMONT, 1976).

Verificou-se que, em certos organismos estas células também estão envolvidas na secreção de proteína ligada a andrógeno, um ativador de plasminogênio e de uma substância indutora da meiose (PARVINEN, 1982).

Entre as células de Sertoli e entre estas e as células germinativas, são encontradas extensas regiões de zônula de oclusão, que constituem a barreira hemato-testicular (DYM & FAWCETT, 1970). A barreira hemato-testicular tem sido estudada em uma variedade de espécies, dos invertebrados (SZOLLOSI & MARCAILLOU, 1977; MIRANDA & CAVICCHIA, 1986 e 1988) e roedores (GILULA *et al.*, 1976; NAGANO & SUZUKI, 1976 e PELLETIER & FRIEND, 1983) ao homem (CAMATINI *et al.*, 1979). Esta barreira protege as células germinativas da ação de agentes nocivos e anticorpos e é de grande importância biológica, pois provavelmente foi desenvolvida tendo em vista os mecanismos de preservação da espécie (HENNIG, 1987). As células de Sertoli são responsáveis também pelo processo de liberação dos espermatozoides em direção à luz do túbulo, designado espermição (FAWCETT & PHILLIPS, 1969 e RUSSEL & CLERMONT, 1976).

As células da linhagem seminal dividem-se e diferenciam-se em espermatozoides. As espermatogônias, ou células germinativas primárias, sofrem muitas divisões celulares originando outras espermatogônias. Algumas espermatogônias crescem e se modificam em espermatócitos primários (BLOOM & FAWCETT, 1986).

Além da produção de espermátocitos, o processo de espermatogênese é constituído de duas outras etapas fundamentais. A primeira etapa é caracterizada pela redução do número cromossômico e formação de células haplóides, através da meiose. Na primeira divisão meiótica ocorre segregação dos homólogos e os espermátocitos primários ( $2n$ ) originam espermátocitos secundários ( $n$ ). Na segunda divisão meiótica, com a separação das cromátides, os espermátocitos secundários originam espermátides (BLOOM & FAWCETT, 1986). A meiose é de suma importância, pois assegura a constância do número cromossômico característico da espécie.

Na segunda etapa, as espermátides sofrem várias modificações bioquímicas e estruturais, num processo designado espermiogênese, que culminará com a produção de espermatozóides.

Muitas mudanças citoplasmáticas e nucleares são comuns à espermiogênese de vários organismos. A partir do complexo de Golgi desenvolve-se o acrossomo, uma vesícula rica em enzimas que atuarão na fecundação. O flagelo se origina do centríolo, o núcleo sofre um alongamento, ao mesmo tempo em que ocorre compactação cromatínica e um fluxo antero-posterior de citoplasma. Durante este fluxo, as mitocôndrias dirigem-se para a região do flagelo e partes do citoplasma são eliminadas (FAWCETT *et al.*, 1971).

Os processos envolvidos na formação do acrossomo, bem como seu tamanho, forma e morfologia interna são muito variados, apresentando uma ampla diversidade filogenética. São encontrados desde acrossomos pequenos e simples, como os de alguns peixes e insetos, até acrossomos grandes e complexos, como em muitos mamíferos (FAWCETT & PHILLIPS, 1970).

Alguns dos eventos da espermiogênese parecem estar relacionados com o surgimento de uma organela citoplasmática composta de microtúbulos associados lateralmente, a "manchette" (FAWCETT *et al.*, 1971).

Muitas são as funções postuladas para a "manchette", sendo ela associada com a geração de forças extranucleares que guiam a morfogênese nuclear (KESSEL, 1966, 1967; McINTOSH & PORTER, 1967; TOKUYASU, 1974 e MYLES & HEPLER, 1977); com a indução da condensação cromatínica através da membrana nuclear (STANLEY *et al.*, 1972 e BERGSTROM & ARNOLD, 1974); e com a translocação do citoplasma ou o rearranjo de organelas citoplasmáticas, tais como mitocôndrias (FAWCETT *et al.*, 1971; TOKUYASU, 1974; MYLES & HEPLER, 1977 e ANDERSON *et al.*, 1986).

É bastante importante durante a espermiogênese a reorganização molecular e compactação da cromatina, já que este processo facilita o transporte do espermatozóide e protege o seu DNA contra danos físicos e químicos (FAWCETT *et al.*, 1971). Um núcleo de espermatozóide de rato, por exemplo, é cerca de 40 vezes menor do que o núcleo de hepatócito de rato (WYROBEK *et al.*, 1976), e o DNA dos espermatozóides é cerca de seis vezes mais condensado do que num cromossomo mitótico (WYROBEK *et al.*, 1976; POGANY *et al.*, 1981; e BALHORN, 1982). Este alto grau de condensação é responsável por um estado inativo da cromatina dos espermatozóides (DU PRAW, 1970).

Em algumas espécies de insetos, peixes, anfíbios, répteis e aves a reorganização molecular da cromatina é caracterizada, pela substituição das proteínas histônicas por proteínas ricas em aminoácidos básicos, designadas

protaminas (DU PRAW, 1970; MELLO e VIDAL, 1977; PLA, 1981 e TABOGA & DOLDER, 1990). O complexo DNA-protaminas possui um grau de compactação muito maior que o complexo DNA-histonas (PLA, 1981). Isto se deve ao elevado número de aminoácidos básicos das protaminas que se complexam com os grupamentos fosfato do DNA, de modo que o DNA é empacotado linearmente, devido ao arranjo lado a lado dos complexos DNA-protaminas (BALHORN, 1982 e RISLEY *et al.*, 1986).

Segundo FAWCETT e colaboradores (1971), a agregação do DNA com estas proteínas durante a compactação cromatínica é o principal fator responsável pela forma final do núcleo, enquanto as forças exercidas pelos microtúbulos da "manchette" não são relevantes neste processo.

## 1.2. NOTAS SOBRE A CLASSIFICAÇÃO DA CLASSE AVES

Com a finalidade de facilitar a compreensão das informações descritas no ítem 1.3. sobre a espermatogênese em aves, serão tecidos aqui alguns comentários sobre a classificação deste grupo.

As aves são freqüentemente divididas em dois grandes grupos: os passeriformes e os não passeriformes (SICK, 1988a). Existem, contudo, muitas divergências com relação ao número de ordens que compõem esta classe (WETMORE, 1960; CRACFT, 1981; e SICK, 1988a), sendo que a maioria das classificações vigentes não expressam adequadamente as inter-relações entre essas ordens (CRACFT, 1981).

Uma das primeiras tentativas em direção a uma classificação filogenética das aves recentes foi realizada por CRACFT (1981), que reconheceu 20 ordens agrupadas em 9 divisões. De acordo com ORR (1987) as aves recentes englobam 27 ordens, 26 das quais correspondentes aos não passeriformes.

A estrutura do pálato tem sido uma das características usadas para a diagnose das principais categorias taxonômicas. Com base nesta característica distingue-se, entre os não passeriformes, o grupo dos paleognatos, composto de espécies com um tipo primitivo de palato (CRACFT, 1981).

A filogenia dos paleognatos é motivo de muita controversa, existindo diferentes opiniões sobre a monofilia do grupo (CRACFT, 1981). Dentro deste grupo, além dos indivíduos da ordem Tinamiformes (tinamous), encontram-se as ratitas, representadas pelas ordens Apterygiformes (quivis), Casuariformes (casuares e emus), Rheiformes (emas) e Struthioniformes (avestruz) (ORR, 1987).

Os outros não passeriformes estão distribuídos pelas ordens Anseriformes, Galliformes, Gruiformes, Charadriiformes, Columbiformes, Psittaciformes, entre outras (ORR, 1987). O grupo dos passeriformes compreende a ordem passeriformes, que inclui cerca de 57% do total das aves vivas (SICK, 1988b). Segundo a estrutura da faringe os passeriformes podem ser divididos em dois grupos de origem filogenética diferentes: os Sub Oscines (Subordem Eurylaimi, Subordem Tyranni, Subordem Menurae) e os Oscines (Subordem Passeres) (ORR, 1987 e SICK, 1988b).

### 1.3. ESPERMATOGÊNESE EM AVES

Embora a morfologia dos espermatozóides de aves tenha recebido atenção desde os tempos de BALLOWITZ (1886, 1888) e RETZIUS (1909, 1911), a espermatogênese em aves tem sido muito pouco estudada quando comparada com a de outros vertebrados. No entanto, muitos autores (McFARLANE, 1963; ASA *et al.*, 1986; ASA & PHILLIPS, 1988 e ASA, 1989) têm ressaltado que as diferenças morfológicas em espermatozóides de aves possuem importância filogenética podendo ser usadas como características taxonômicas.

Dentro desta Classe, os espermatozóides dos Oscines são bastante específicos, enquanto os dos grupos restantes são muito similares (RETZIUS, 1909). Por isto, os espermatozóides das aves são classificados em dois grupos: os de passeriformes Oscines e os restantes, que incluem os passeriformes Suboscines e os não passeriformes (HENLEY *et al.*, 1978). Estes dois tipos básicos de espermatozóides estão representados no Esquema 1.

Os espermatozóides de não passeriformes e passeriformes subóscinos (Esquema 1), além de morfologicamente muito semelhantes entre si, são também semelhantes aos espermatozóides de anfíbios e répteis (HESS *et al.*, 1991). Devido a isto são considerados primitivos e conhecidos como "sauropsídeos" (BALLOWITZ, 1888; RETZIUS, 1909; McFARLANE, 1963 e HUMPHREYS, 1972).

Entre os não passeriformes, os estudos sobre a ultra-estrutura dos espermatozóides em paleognatos (ASA *et al.*, 1986; PHILLIPS & ASA, 1989 e BACCETTI *et al.*, 1991) têm sido muito úteis na compreensão da filogenia deste grupo.

BACCETTI e colaboradores (1991) reunindo informações obtidas sobre a morfologia dos espermatozóides em duas espécies de ratitas, o avestruz e o emu, com estudos prévios em outras espécies, o tinamou (ASA *et al.*, 1986) e a ema (PHILLIPS & ASA, 1989), puderam sugerir que os paleognatos formam um grupo peculiar e monofilético, um grupo irmão de todos os outros grupos de aves. Isto por que os espermatozóides deste grupo são caracterizados por possuírem: (1) um acrossomo cônico truncado envolvendo a porção anterior do núcleo; (2) uma bainha fibrosa rodeando a maior parte do axonema e (3) um centríolo distal extremamente longo ocupando todo comprimento da peça intermediária. Segundo estes autores as duas primeiras características são do tipo reptilianas, isto é, preferivelmente primitivas, enquanto a última é uma característica autopomórfica dos paleognatos.

Outra característica morfológica muito discutível do ponto de vista filogenético é a evolução do "perforatorium" entre os paleognatos. Os espermatozóides do tinamou possuem um "perforatorium" na forma de bastão que atravessa todo o núcleo, enquanto em outras espécies do grupo, como a ema e o avestruz, o "perforatorium" é reduzido (PHILLIPS & ASA, 1989 e BACCETTI *et al.*, 1991) ou ausente, como no emu (BACCETTI *et al.*, 1991).

Com relação à organização da cauda, todos os paleognatos estudados até o presente apresentam bainha fibrosa. As fibras densas estão ausentes nos espermatozóides do tinamou, presentes em tamanho reduzido apenas na parte anterior da cauda dos espermatozóides da ema e do avestruz, sendo ainda mais

curtas e menores que no do emu (ASA et al., 1986; PHILLIPS & ASA, 1989 e BACCETTI et al., 1991).

Com base nas características acima citadas, BACCETTI e colaboradores (1991) sugeriram que os tinamous possuem uma posição primitiva entre os paleognatos, enquanto o grupo ema-avestruz é homogêneo e provavelmente mais primitivo que o emu.

A maioria das aves domésticas, como o galo, o ganso, o peru, o pato, o galo da Angola, e o periquito, dentre outras, estão entre os não passeriformes, sendo estes, os mais estudados. Seus espermatozóides (Ordens Anseriformes, Galliformes e Psittacciformes) possuem cabeça cilíndrica e levemente curvada. Apesar de muito parecidos com os espermatozóides dos paleognatos, apresentam "perforatorium" pequeno, cônico, que se aprofunda no núcleo e no acrossomo. A peça intermediária possui centríolo distal longo, sem ocupar todo seu comprimento (LAKE et al., 1968; HUMPHREYS, 1972; THURSTON & BELLIER 1972; TINGARI 1973; BAKST & HOWARTH, 1975; HUMPHREYS, 1975; MARQUEZ & OGASAWARA 1975; THURSTON et al., 1982 e SAMOUR et al., 1986).

Entre as aves domésticas (não passeriformes), o galo doméstico tem sido a mais estudada, provavelmente devido à sua importância econômica. GRIGG & HODGE (1949) iniciaram os estudos ultra-estruturais dos espermatozóides desta ave, após o que vários outros trabalhos se seguiram (LAKE 1954, 1966; LAKE & SMILES, 1952; LAKE et al., 1968; NAGANO, 1962; TINGARI, 1973 e BAKST & HOWARTH, 1975). GUNAWARDANA (1977) classificou dez estádios de diferenciação espermática nesta ave ao nível de microscopia óptica e, ao nível ultra-estrutural (GUNAWARDANA & SCOTT, 1977), agrupou estes estádios em quatro fases, baseando-se em características nucleares. MCINTOSH & PORTER (1967), estudando a espermiogênese no galo doméstico verificaram que os microtúbulos inicialmente se arranjavam ao redor do núcleo numa disposição helicoidal, formando a "manchette" circular, e de pois se dispunham paralelamente ao núcleo, formando a "manchette" longitudinal. Estas "manchettes" aparecem em fases distintas da espermiogênese e provavelmente desempenham funções diferentes, a primeira estando envolvida na alongação e a segunda na na obtenção da curvatura nuclear (MCINTOSH & PORTER, 1967).

Ainda entre os não passeriformes, outras espécies de aves têm sido estudadas, como o grou, Grus vipio ( PHILLIPS et al., 1987). Os espermatozóides do grou apresentam grande variabilidade na morfologia da cabeça, o que parece estar relacionado com a pouca compactação que sua cromatina sofre. Essa reduzida compactação forneceria menor integridade estrutural, possibilitando assim uma maior variação da forma da cabeça (PHILLIPS et al., 1987). Os espermatozóides desta ave parecem ser relativamente simples estando entre os de maior simplicidade entre aqueles até agora estudados. A posição da Ordem Gruiformes entre os grupos de Aves é também duvidosa, mas as características dos seus espermatozóides, tais como a ausência de fibras densas na peça intermediária, sugerem que seus representantes não são tão primitivos quanto os paleognatos ou os representantes das Ordens Galliformes e Anseriformes.

Estudos da espermiogênese em um representante dos Columbiformes (MATTEI et al., 1972) e um dos Caradriformes (SAITA et al., 1983) revelaram que

a formação do flagelo, alongação do núcleo e a ocorrência de duas "manchetes" são muito semelhantes àqueles dos não passeriformes, principalmente ao galo doméstico. Embora os espermatozoides destes animais possuam acrossomo cônico não foram observados "perforatoria" (MATTEI *et al.*, 1972 e SAITA *et al.*, 1983).

Dependendo da forma, o "perforatorium" pode receber designações diferentes. Quando presente em paleognatos (ASA *et al.*, 1986; PHILLIPS & ASA, 1989 e BACCETTI *et al.*, 1991), o "perforatorium" apresenta a forma de bastão ou cilindro, semelhante ao "perforatorium" de anfíbios (BURGOS & FAWCETT, 1956), répteis (FURIERI, 1970; HESS *et al.*, 1991) e mamíferos (CLERMONT, 1955 e BEDFORD, 1967), sendo algumas vezes designado bastão acrossomal. Nos representantes das Ordens Galliformes, Anseriformes, Psitaciformes e Gruiformes, o "perforatorium", por possuir as extremidades afiladas é, muitas vezes, designado espinho acrossomal (NAGANO, 1962; LAKE *et al.*, 1968; TINGARI, 1973; BAKST & HOWARTH, 1975; HUMPHREYS, 1975; THURSTON *et al.*, 1982 e SAMOUR *et al.*, 1986). Não são do nosso conhecimento estudos que enfoquem a composição química do "perforatorium" e seu papel durante a reação acrossomal entre os não passeriformes. Em algumas aves, a peça intermediária desenvolve-se de modo diferente do que em mamíferos. Em mamíferos, as espermátides têm um centríolo distal curto e, à medida em que o flagelo cresce, a membrana plasmática, que está presa a um anel de material denso, o "annulus", é involuída. No final da espermiogênese, o "annulus" e a membrana movem-se distalmente até alcançar toda a peça intermediária (PHILLIPS, 1974). Nas aves que possuem centríolo distal longo, como a maioria dos não passeriformes, o "annulus" é formado na extremidade distal do centríolo, como ocorre em mamíferos, mas nunca se move. O comprimento do centríolo distal torna-se então o comprimento da peça intermediária (PHILLIPS & ASA, 1989).

Os estudos de espermatogênese em passeriformes são muito escassos. Sabe-se, destes estudos, que os espermatozoides dos indivíduos da Subordem Tyranni são basicamente similares àqueles dos não passeriformes, mas quanto à forma, são levemente helicoidais (McFARLANE, 1963).

RETZIUS (1909) foi, provavelmente, um dos primeiros autores a evidenciar a estrutura única e bizarra dos espermatozoides dos Oscines (Esquema 1) e o arranjo característico dos seus testículos.

HUMPHREYS (1972) comparou o sêmem de vários passeriformes e não passeriformes e verificou que os espermatozoides de passeriformes são cerca de três vezes mais longos que os de não passeriformes, alcançando aproximadamente 300µm de comprimento.

Além do tamanho, os espermatozoides dos Oscines possuem uma morfologia verdadeiramente diferente, ainda não relatada para os animais de sangue quente (McFARLANE, 1971). Eles apresentam conformação helicoidal com um acrossomo cônico e espiral, muito grande em relação ao núcleo (Esquema 1), e peça intermediária muito longa (FURIERI, 1963; HUMPHREYS, 1972). A peça intermediária é constituída de axonema com padrão usual 9 + 2, nove fibras densas associadas ao axonema, mitocôndria única e alongada e membrana ondulante (SOTELLO & TRUJILLO-CENOZ, 1958; HUMPHREYS, 1972 e HENLEY *et al.*, 1978).

Membrana ondulante é a designação atribuída primeiramente por SOTELLO & TRUJILLO-CENÓZ (1958) ao sistema fino de túbulos que se dispunham por toda a extensão da cauda dos espermatozóides do pardal, num trajeto helicoidal.

Dentro dos Oscines, os espermatozóides dos corvídeos parecem perder a membrana ondulante e o flagelo não persiste até o final da espermiogênese. A forma destas células, porém, é também helicoidal (RETZIUS, 1909; HENLEY *et al.*, 1978).

Segundo McFARLANE (1971) existe uma progressão evolucionária em direção à espiralização nos espermatozóides de aves. Ao nosso ver, os estudos a cerca da morfologia dos espermatozóides das aves são um exemplo típico da contribuição destas características para uma melhor compreensão da filogenia do grupo.

#### 1.4. NOTAS SOBRE Passer domesticus

O pardal, Passer domesticus é um passeriforme pertencente à Família Ploceidae e à Subfamília Passerinae (SICK, 1988).

Originário do Velho Mundo, o pardal foi introduzido em muitas partes da América, como Canadá, Alaska, USA, México, Cuba, Jamaica e países da América do Sul. No Brasil, foi introduzido há a cerca de 80 anos, no Rio de Janeiro e São Paulo. Desde então, tem se disseminado rapidamente por todo o País (RUSCHI, 1981). Esta rápida propagação está relacionada com o fato de não existirem aqui congêneres de exigências bióticas semelhantes às suas e ao grande potencial biótico deste animal. Em 100 anos, o pardal foi capaz de duplicar a sua área de distribuição e, atualmente, é a segunda ou terceira ave mais numerosa do mundo (SICK, 1988a).

Estudos sobre a evolução nesta espécie mostram que mudanças adaptativas, tais como coloração da plumagem e tamanho do animal, causadas por mudanças genéticas, podem ocorrer muito mais rapidamente do que se acreditava possível (JOHNSTON & SELANDER, 1964 e 1971).

A maioria dos estudos sobre o aparelho reprodutor no pardal referem-se à ação da fotoestimulação no desenvolvimento testicular (BARTHOLOMEW, 1949; TRHEADGOLD, 1960b; MIDDLETON, 1965; MURTON *et al.*, 1970; e DANG & GURAYA, 1987) ou ao efeito de drogas sobre o órgão (KIRSCHBAUM, 1939; LOFTS *et al.*, 1973 e SING *et al.*, 1984). Alguns trabalhos retratam o ciclo reprodutivo anual do animal em diversas localidades (THREADGOLD, 1960a e KADHIM *et al.*, 1987). Estudos que enfoquem a organização testicular e descrevam a espermatogênese, principalmente ao nível ultra-estrutural, são escassos (SOTELLO & TRUJILLO-CENÓZ, 1958).

## 1.5. OBJETIVOS

Tendo em vista a carência de informações a respeito da maturação espermiática em Passer domesticus e entre os passeriformes em geral, o objetivo do presente trabalho é a análise da estrutura, da ultra-estrutura e de algumas características citoquímicas dos processos que envolvem a diferenciação das células germinativas masculinas nesta espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 2. MATERIAL & MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Os pardais (*Passer domesticus*) foram coletados no município de São José do Rio Preto-SP, entre agosto de 1990 a novembro de 1991, com o uso de armadilhas do tipo arapuca. Oito animais foram utilizados neste estudo.

Os machos adultos foram distinguidos pela placa negra na garganta e a coloração negra do bico confirmou que eles se encontravam em período reprodutivo.

No dia seguinte ao da captura, os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados para a retirada dos testículos.

### 2.2. MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas técnicas de Microscopia de Contraste de Fase, Microscopia de luz comum e Microscopia Eletrônica de Transmissão, descritas separadamente a seguir.

#### 2.2.1. Preparo do material para observação ao microscópio de Contraste de Fase

Após a retirada dos testículos, rompeu-se a cápsula testicular e efetuou-se o espalhamento de parte do seu conteúdo sobre lâminas de vidro contendo gotas de solução fisiológica. Colocaram-se, então, as lamínulas sobre o material, efetuando-se em seguida a observação.

## 2.2.2. Preparo de decalques para observação ao microscópio de luz comum

Assim que retirados do animal, os testículos foram seccionados em duas ou três partes, as quais foram utilizadas para confecção dos decalques. Com o auxílio de uma pinça, os fragmentos foram pressionados levemente sobre a lâmina seca e rapidamente suspensos.

Após secagem ao ar, os decalques foram submetidos ao corante de Leishmann (HAYOE & FLEMANS, 1989). Primeiramente gotejaram-se cerca de dez gotas do corante não diluído por toda a superfície da lâmina, aguardando-se 3 minutos. Nesta etapa ocorre a fixação dos decalques pelo álcool metílico da solução corante. A seguir, gotejaram-se vinte gotas de tampão fosfato pH 6,8, para diluição 1:2 do corante, esperando-se por 10 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e secas ao ar.

## 2.2.3. Preparo de cortes em parafina para observação ao microscópio óptico comum

### Fixação

Após dissecação os testículos foram imersos em solução de paraformaldeído 4%: glutaraldeído 5% em tampão fosfato pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965) e seccionados ao meio, seja no sentido longitudinal ou no sentido transversal. Os fragmentos permaneceram nesta solução fixadora por 24 horas a 4°C, sendo então, lavados em água corrente durante 12 horas.

Parte do material a ser submetido ao teste do PAS, foi fixada em solução de etanol PA: ácido acético 3:1 (v/v), por 30 minutos a 4° C, estando, assim, prontos para serem desidratados.

### Desidratação

A desidratação foi feita através da imersão dos espécimes por 1 hora em soluções alcólicas de concentrações crescentes, começando pelo álcool etílico 70%, álcool etílico 80%, álcool etílico 90% e terminando com dois banhos de 1 hora em álcool etílico absoluto. Com exceção dos banhos em álcool etílico absoluto, que foram realizados à temperatura ambiente, os demais banhos foram feitos a 4° C.

## Clarificação, Infiltração e Inclusão

Os espécimes foram clarificados através de banhos de 1 hora cada, nas seguintes misturas: álcool-xilol 2:1, álcool-xilol 1:1, álcool-xilol 1:2. A clarificação foi completada pela imersão em xilol PA por tempo inferior a 1 hora.

A seguir, o material passou por três banhos de 1 hora cada em parafina fundida (p.f. 57° C), sendo então incluídos neste mesmo material.

## Microtomia, Desparafinização e Hidratação

Cortes de 5 a 7 µm de espessura foram obtidos com micrótomo manual R. JUNG-HEIDELBERG e distendidos, com o auxílio de banho-maria, sobre lâminas de vidro albuminadas.

Para remoção da parafina, os mesmos passaram por dois banhos, de 15 minutos cada, em xilol PA e um banho de 2 horas em uma mistura de metanol: clorofórmio (1:1).

A seguir os cortes foram reidratados pela imersão por 10 minutos em álcool etílico absoluto, por 5 minutos em álcool etílico 50% e, por 5 minutos em água destilada, estando prontos para serem corados.

## Colorações e Técnicas citoquímicas

Coloração pela Hematoxilina- Eosina: após a hidratação, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Lewis durante 6 minutos, lavados em água de torneira por 10 minutos para retirar o excesso do corante e corados com Eosina por 5 minutos.

Técnica do Azul de Toluidina à pH 4,0: os cortes hidratados foram imersos em solução de Azul de Toluidina à 0,025% em tampão McIlvaine à pH 4.0 durante 15 minutos (MELLO & VIDAL, 1980). Os cortes foram, então, lavados rapidamente em água corrente e secos ao ar.

Técnica do PAS: Após a hidratação, os cortes foram oxidados em ácido periódico a 0,5% em água destilada por 10 minutos. Posteriormente efetuou-se a lavagem dos cortes em água destilada durante 5 minutos, com várias trocas; em seguida, os cortes foram submetidos ao reativo de Schiff, segundo LILLIE (1954), durante 9 minutos (MELLO & VIDAL, 1980). A seguir, os cortes passaram por três banhos de 3 minutos cada em água sulfurosa. Alguns cortes foram ainda contracorados com Hematoxilina de Lewis por 6 minutos, e lavados com água de torneira durante 10 minutos.

## **Desidratação e montagem**

As lâminas contendo os cortes corados pela Hematoxilina-Eosina ou submetidos à Técnica do PAS foram mergulhadas por cerca de 2 minutos nas soluções de álcool etílico 95%, álcool etílico absoluto, álcool etílico absoluto: xilol PA (1:1) e xilol PA, sendo em seguida efetuada a montagem em Bálsamo do Canadá.

Os cortes submetidos à Técnica do Azul de Toluidina à pH 4.0, foram secos ao ar e imersos em xilol PA por 10 minutos. As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá.

## **Obtenção dos cortes semifinos**

Para obtenção de cortes semifinos utilizou-se o material fixado para MET (descrito no ítem 2.2.5.) e incluído em Epon 812. Cortes de aproximadamente 1µm de espessura foram feitos no ultramicrotomo LKB, com o uso de navalhas de vidro. Tais cortes foram colocados sobre lâminas de vidro contendo uma gota de água destilada e colocados para secar em estufa a 60° C. A seguir, foram corados com solução de Azul de Toluidina a 1% em carbonato de sódio 0,5% (pH 12), secados ao ar e as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá.

### **2.2.4. Análise do material e obtenção das fotomicrografias**

A análise do material foi feita em microscópio ZEISS JENAVAL. Para observação em contraste de fase, utilizou-se o mesmo microscópio com objetivas de contraste de fase, e as fotomicrografias foram feitas em filme Plus-X-Pan. As fotomicrografias dos cortes corados pela Hematoxilina-Eosina ou submetidos às técnicas do PAS ou Azul de Toluidina à pH 4.0 foram feitas em filme Kodacolor e as referentes aos cortes semifinos foram realizadas em filme Fuji Neopan.

### **2.2.5. Preparação do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

#### **Fixação**

Assim que retirados do animal, os testículos foram colocados imediatamente na solução fixadora e seccionados em pedaços de 1mm de diâmetro.

Como primeiro fixador, utilizou-se a solução de paraformaldeído 4%: glutaraldeído 5% com traços de hidróxido de sódio (KARNOVSKY, 1965) ou

apenas a solução de glutaraldeído a 3% (GLAUERT, 1975). No preparo de todas as soluções fixadoras utilizadas, bem como nas lavagens, foram utilizados o tampão Sørensen 0,1M ou o tampão cacodilato 0,08M, ambos a pH 7.2. Estes tampões continham 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio (GLAUERT, 1975). Os espécimes foram mantidos no 1o. fixador por 3 ou 15 horas.

Após a primeira fixação, os espécimes foram lavados no mesmo tampão utilizado no preparo do fixador, por metade do tempo de fixação, sendo então, mergulhados por 1 hora em solução de tetróxido de Ósmio (2o. fixador) a 2% em tampão.

Antes de serem colocados na solução de ácido tânico a 2% em tampão (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1976), os espécimes foram lavados rapidamente no tampão correspondente. Às vezes, contudo, após a imersão no 2o. fixador e subsequente lavagem em tampão, o material foi submetido à coloração "en bloc" pelo acetato de uranila a 2% em água.

Os espécimes foram, a seguir, lavados por 5 minutos em água destilada. Todas as etapas até aqui descritas foram efetuadas a 4° C.

### Desidratação, Infiltração e Inclusão

Para desidratação, o material foi submetido a banhos de 15 minutos em soluções alcoólicas de concentração crescente, começando com álcool etílico 45%, álcool etílico 75%, álcool etílico 95%, por duas vezes, finalizando com dois banhos de 10 minutos em álcool etílico absoluto. Em seguida, efetuou-se a imersão em álcool etílico absoluto: acetona PA 1:1 (v/v) por 5 minutos e, em acetona PA por mais 10 minutos.

A infiltração foi feita em solução de acetona PA: Epon 812 1:1 (v/v) por um período de 15 horas. Os espécimes foram incluídos em Epon 812 e colocados na estufa a 60° C durante aproximadamente três dias, a fim de acelerar a polimerização.

### Microtomia e coloração

Cortes ultrafinos prata-dourados foram feitos com navalhas de vidro em ultramicrotomo LKB e corados à temperatura ambiente durante 20 minutos em solução aquosa de acetato de uranila a 2% (WATSON, 1958) e durante 5 minutos em solução de citrato de chumbo a 0,2% em hidróxido de sódio 1N (VENABLE & COGGESHALL, 1965).

### Observação do material e obtenção das eletromicrografias

A observação do material foi efetuada em Microscópio Eletrônico ZEISS 9S-2 operado a 60Kv, a aumentos de 800 a 9.200 vezes e as eletromicrografias foram feitas em filme Kodalite 2556 ou filme Fuji (Fuji Electron Microscopic Film-FG).

## **RESULTADOS**

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ORGANIZAÇÃO CELULAR DO TESTÍCULO EM PERÍODO REPRODUTIVO

Os testículos dos animais estudados apresentam forma ovóide, coloração amarelada e tamanho aproximado de 1cm de comprimento por 0,7cm de largura. A organização básica do testículo está representada no Esquema 2. Seu interior é totalmente preenchido pelos túbulos seminíferos, os quais são envolvidos pela cápsula testicular ou túnica albugínea e por uma camada serosa bastante fina, a túnica vaginalis.

A cápsula testicular é rica em vasos sanguíneos (Fig. 24) os quais podem ser vistos até a olho nu, no órgão recentemente dissecado, devido à transparência da túnica vaginalis.

O interior do órgão não é dividido em compartimentos, sendo freqüente a observação de comunicações entre os túbulos seminíferos (Fig. 5).

Os túbulos seminíferos apresentam paredes de tecido peritubular muito finas (Figs 5-7, 15, 25-27) onde são encontradas células muito semelhantes a fibroblastos, com núcleo fusiforme (Figs. 25, 27 e 39) e citoplasma com prolongamentos (Fig. 38). Entre estas células é comum a ocorrência de fibras colagênicas (Fig. 38), sem um padrão particular de orientação, e regiões de citoplasma rico em filamentos, que acreditamos corresponder às células mioepiteliais (Fig. 41). A ocorrência de capilares nesta região também é freqüente (Fig. 25). Nos cortes submetidos ao teste do PAS a parede do túbulo apresenta-se corada em rosa (Figs. 15 e 16) e ao MET encontra-se a lâmina basal delimitando o tecido peritubular (Figs. 36 e 39).

A identificação das células de Sertoli só foi possível a partir da análise dos cortes semifinos (Figs. 28 e 29) e ultrafinos. Nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina, a caracterização destas células foi muito dificultada, sendo observadas regiões de seu citoplasma entre as células do epitélio germinativo, alcançando os feixes de espermátides (Fig. 8). Nos cortes ultrafinos, as células de Sertoli aparecem em contato direto com a lâmina basal (Fig. 39), ou logo acima das espermatogônias (Figs. 33 e 36), de modo que a maior parte do epitélio germinativo situa-se acima dela e não mantém contato direto com a parede do túbulo.

O epitélio germinativo dos animais estudados apresentou espessura de várias camadas de células, estando estas em diversas fases de diferenciação (Figs. 7, 8, 25 e 26).

As espermatogônias geralmente formam uma camada contínua (Figs. 25-27), podendo ocorrer em contato direto com o tecido conjuntivo (Fig. 39) ou não (Fig. 36), embora a sua localização seja sempre basal.

Os espermatócitos primários ocupam posição intermediária entre as espermatogônias e as espermátides (Figs. 7, 8, 26, 33 e 34), sendo observados em

grupos na mesma fase de divisão celular (Figs. 34 e 37).

As espermatídes são encontradas na porção mais luminal do epitélio germinativo, adjacentes à luz dos túbulos, onde ocorre a espermiogênese, como pode ser notado nos corte sem parafina corados com Hematoxilina-Eosina (Figs. 6-8) e confirmado nos cortes submetidos à técnica do PAS (Figs. 15 e 16).

Com base em várias características estruturais e ultra-estruturais, as espermatídes foram classificadas em seis fases de diferenciação, designadas E1, E2, E3, E4, E5 e E6. Estas fases estão descritas em detalhe no ítem 3.5.

As espermatídes iniciais (E1 e E2) formam grupos mais centrípetos no túbulo em relação aos espermatócitos primários (Figs. 7, 9 e 34). Com a associação com as células de Sertoli e o decorrer da diferenciação, as espermatídes (E3) assumem uma orientação polarizada, pois a região acrossomal direciona-se para a parede do túbulo, enquanto a caudal fica voltada para a luz (Figs. 8, 16 e 18). À medida que se alongam (E4, E5 e E6), começam a se organizar em feixes (Figs. 1-4, 7-10, 13, 25 e 34). Nos feixes, as E3 são encontradas no nível da cauda das E4, E5 e E6 (Figs. 7-9, 16-18 e 26). Em cortes transversais, verificamos que quanto mais avançado o estágio de diferenciação, as espermatídes (E6, E5 e E4) ocupam posições mais internas no feixe (Figs 34, 55, 61, 86 e 90), por sua vez as espermatídes iniciais, localizam-se mais externamente no feixe (E3) (Figs. 55, 56, 86 e 90), ou na sua periferia (E2 e E1) (Figs. 25, 26, 30, 31, 33, 34, 55, 56 e 68).

Os feixes de espermatídes são muito longos, ocupando grande parte do interior do túbulo (Figs. 6 e 15).

Na luz dos túbulos nota-se abundante quantidade de material que se cora intensamente pela Eosina (Figs. 5 e 6), suavemente pelo PAS (Fig. 15) e pelo tratamento com o Azul de Toluidina a pH 4,0, cora-se metacromaticamente em violeta azulado (Fig. 20). Através da observação dos cortes semifinos (Fig. 25) e ultrafinos (Fig. 93), verificamos que este material é rico em resíduos de eliminação citoplasmática.

O arranjo das espermatídes no feixe ou ao redor dele e o modo de distribuição dos feixes nos túbulos seminíferos originam um padrão radial de disposição muito característico (Figs. 5, 6 e 15).

### 3.2. CÉLULAS DE SERTOLI

São células grandes, alcançando várias dezenas de micrômetros de altura. Seu núcleo varia de ovalado a piramidal (Figs. 33, 36 e 37), com contornos irregulares, onde são frequentes dobras e reentrâncias (Figs. 36 e 39). Os complexos de poros distribuem-se regular e abundantemente ao longo do envólucro nuclear (Fig. 39). A cromatina é pouco condensada (Figs. 33, 36 e 39) e o nucléolo bastante volumoso e vacuolizado (Figs. 35 e 37), sendo visualizado mesmo nos cortes semifinos (Fig. 28). É comum a presença de uma estrutura esférica, com aspecto granular, associada ao nucléolo (Fig. 35) ou livre no núcleo (Fig. 36), sendo que até três destas estruturas foram observadas em associação ao mesmo núcleo (Fig. 36).

As células de Sertoli apresentam o citoplasma geralmente mais corado (Figs. 28 e 29) ou eletrodense (Figs. 33, 34, 36 e 37) que as células germinativas, característica que facilita a sua identificação. Ela apresenta prolongamentos citoplasmáticos muito finos (Figs. 33, 34 e 36), que se irradiam para a luz do túbulo, penetrando entre os diversos tipos celulares e alcançando as espermátides (Fig. 34).

Junções de membrana são freqüentemente visualizadas entre as células de Sertoli e outros tipos celulares, principalmente com as espermátides iniciais (E1 e E2) (Figs. 64 e 68).

No citoplasma, além de perfis de retículo endoplasmático e mitocôndrias, encontram-se esporadicamente vesículas eletrodensas (Fig. 34) e uma grande quantidade de microtúbulos (Figs. 46, 49 e 90). Os microtúbulos, na região dos feixes, se dispõem no sentido da elongação das espermátides (Figs. 68 e 87). As mitocôndrias da célula de Sertoli distinguem-se daquelas das espermátides por apresentarem cristas tubulares sem uma disposição preferencial, enquanto as outras apresentam cristas lamelares dispostas perpendicularmente à sua membrana externa, quando em corte transversal (Fig. 88).

É freqüente a observação de prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli entre as espermátides E1 e E2 (Fig. 68). Nas E3, estes prolongamentos alcançam a região caudal da célula (Figs. 56, 58 e 90) e enquanto cisternas de retículo endoplasmático liso se localizam na altura da vesícula acrossomal (Figs. 58 e 59), na região da cauda o citoplasma da célula de Sertoli apresenta cisternas com forma reticulada (Fig. 84). As espermátides E4, E5 e E6, por sua vez, encontram-se totalmente envolvidas pelas extensões citoplasmáticas da célula de Sertoli, o que pode ser notado tanto nos cortes semifinos (Figs. 26, 30 e 31) e ultrafinos (Figs. 34, 55, 62 e 66), como em microscopia de contraste de fase (Fig. 2).

Próximo à região dos acrossomos das espermátides finais, o citoplasma da célula de Sertoli é rico em diminutas vesículas (Fig. 62), e nas alturas das caudas destas espermátides encontram-se aglomerados de estruturas eletrodensas semelhantes às fibras densas acessórias (Fig. 87).

Algumas vezes, são observados grandes espaços ou vacúolos no citoplasma da célula de Sertoli (Figs. 55, 97 e 100). Dada a presença de espermátides finais no interior destes vacúolos, acreditamos que eles representem

regiões de antigos feixes (Figs. 55, 97 e 100). Ao redor destes espaços, ou mesmo em outras regiões do citoplasma próximas ao feixe, observam-se vesículas envolvidas por membranas duplas, contendo citoplasma da espermátide rico em microtúbulos (Figs. 54 e 55).

### 3.3. ESPERMATOGÔNIAS

Não nos foi possível, ao nível morfológico, estabelecer diferenças entre espermatogônias primárias e secundárias, com as técnicas utilizadas no presente estudo.

As espermatogônias são células com núcleo ovalado ou esférico e cromatina formando grumos (Figs. 7, 8, 26, 27 e 29), grumos estes observados mesmo nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina (Fig. 8) e nos cortes semifinos (Figs. 26-29). O nucléolo é bastante saliente e vacuolizado (Figs. 39 e 41), podendo existir até dois por núcleo (Fig. 40). Próximo ao nucléolo encontra-se uma região constituída de pequenos grânulos (Figs. 40 e 41).

Muitas vezes são visualizados mais de um núcleo numa mesma massa citoplasmática (Fig. 33) ou ligados por uma estreita faixa de citoplasma (Fig. 39).

No citoplasma, geralmente pouco volumoso, destacam-se perfis de retículo endoplasmático, polissomos e diminutas vesículas (Figs. 39, 40 e 41). As mitocôndrias são alongadas, algumas vezes agrupando-se em um lado da célula (Figs. 39 e 41). O complexo de Golgi é pequeno, quando comparado com os das outras células germinativas, e geralmente localiza-se na região do citoplasma que fica voltada para a base do túbulo (Figs. 39 e 41). Muito característica é a presença, na região perinuclear, de aglomerados de um material constituído de estruturas esféricas aproximadamente do mesmo tamanho e com aparência granular. Estes aglomerados foram designados de massas citoplasmáticas densas (Figs. 39, 40 e 42).

### 3.4. ESPERMATÓCITOS

Os órgãos estudados exibiram uma grande quantidade de espermatócitos primários organizados em grupos (Figs. 34 e 37). Nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina (Figs. 7 e 8) e semifinos (Figs. 25 e 26), os espermatócitos apresentam núcleo esférico, bastante volumoso, com cromatina em diversos graus de compactação. Através da análise ultra-estrutural destas células, verifica-se que as mesmas apresentam características morfológicas muito peculiares, principalmente com relação ao grau de compactação cromatínica, o que permite classificá-las em diversos tipos, segundo a fase da prófase em que se encontram.

Certos espermatócitos primários são semelhantes às espermatogônias, porém apresentam núcleo e citoplasma um pouco mais volumosos (Fig. 43). O nucléolo compacto é ovalado, vâcuolizado e apresenta contornos mais regulares do que aqueles das espermatogônias (Fig. 43). Nestas células, os cromossomos aparecem em início de condensação na periferia nuclear (Fig. 43). O citoplasma é rico em cisternas de retículo endoplasmático e grumos das massas citoplasmáticas densas localizam-se nas adjacências do núcleo, em regiões onde são abundantes os complexos de poros (Fig. 43). Parece haver um aumento na quantidade de organelas citoplasmáticas dos espermatócitos, principalmente de mitocôndrias, quando comparado com as espermatogônias (Fig. 43).

Entre os diferentes tipos de espermatócitos encontrados, os mais freqüentes são os que apresentam complexos sinaptonêmicos aderidos ao envólucro nuclear (Figs. 37, 39, 46 e 47). Seus núcleos, além dos cromossomos condensados pareados pelo complexo sinaptonêmico, cujo elemento central é facilmente visualizado (Fig. 47), apresentam também o nucléolo, próximo ao envólucro nuclear, e associado com uma estrutura esférica eletrodensa, o corpo redondo (Fig. 45).

Os poros nucleares são abundantes nestes espermatócitos, e agrupam-se em domínios (Figs. 37, 39, 46-48). Estes conjuntos de poros são vistos algumas vezes destacados do núcleo (Fig. 37). Próximos a eles, ou mesmo em regiões citoplasmáticas mais afastadas, são observados grumos das massas citoplasmáticas densas (Figs. 37, 39, 45-47).

O citoplasma nestas células é mais volumoso que nos outros espermatócitos e rico em organelas (Figs. 37, 39 e 46). As mitocôndrias alongadas são numerosas e agrupam-se, preferencialmente, ao redor do complexo de Golgi (Figs. 37, 39 e 45). Este, por sua vez, apresenta-se bastante desenvolvido com várias pilhas de cisternas posicionadas num arranjo circular, sendo que na região central acumulam-se inúmeras vesículas (Figs. 39 e 47).

Um outro tipo de espermatócito primário encontrado é caracterizado por possuir núcleo aproximadamente ovalado e cromossomos mais descompactados do que nos espermatócitos que apresentam complexos sinaptonêmicos (Figs. 34 e 44). Algumas regiões lineares mais condensadas são observadas aderidas ao envólucro nuclear e embora o nucléolo não seja visualizado, o corpo redondo está presente (Fig. 44).

Certos espermatócitos primários possuem cromossomos mais evidentes, bastante condensados e eletrodensos, e nucleoplasma mais eletrolúcido, o que

sugere uma fase mais adiantada da prófase (Figs. 36 e 49). O núcleo aparece com contornos regulares, quase esférico, e no seu interior destaca-se uma região contendo pequenos grânulos (Fig. 49). Um fato peculiar destas células é que o corpo redondo apresenta uma grande lacuna, o que lhe confere um aspecto anelado (Fig. 49). Nesta fase é comum encontrarem-se mais de um núcleo no mesmo citoplasma (Fig. 49).

Observamos também espermátocitos cujos cromossomos são vistos muito condensados no interior de núcleos com nucleoplasma bastante eletrolúcido (Figs. 50 e 51), contendo o corpo redondo (Fig. 50). No citoplasma próximo ao núcleo destaca-se um complexo de Golgi bastante volumoso (Fig. 51).

Os espermátocitos secundários são provavelmente células de curta duração que logo se dividem para originar as espermátides ou são muito semelhantes às espermátides iniciais, sendo que não foi possível a sua identificação, seja ao microscópio de luz ou eletrônico.

### 3.5. ESPERMÁTIDES

As espermátides foram classificadas em seis tipos (E1- E6), segundo a fase de diferenciação em que se encontram. Estes estágios de diferenciação espermática foram estabelecidos com base em várias características morfológicas, mas tendo utilizado, principalmente, o grau de compactação cromatínica. Tal parâmetro foi utilizado, pois durante a espermiogênese são observados padrões de compactação cromatínica muito característicos. Estas fases serão descritas separadamente a seguir.

#### Espermátides 1 (E1)

São células esféricas ou poligonais com núcleo redondo ou ovalado (Figs. 7-10, 25-27). Entre os diversos tipos celulares do epitélio germinativo, estas células são as que apresentam o núcleo menos corado pela Hematoxilina (Figs. 7-9). Com base no aspecto nuclear, é difícil diferenciar estas espermátides das E2, nos preparados observados ao microscópio de luz comum, de modo que elas foram, algumas vezes, designadas espermátides iniciais. Ao nível ultra-estrutural, a cromatina é finamente granular, mais compactada na periferia e formando alguns grumos densos no interior do núcleo (Figs. 52, 53, 62 e 68). A região mais compactada na periferia nuclear e os grumos densos são visualizados mesmo nos cortes semifinos (Figs. 26 e 27). Além destas características, no núcleo destas células, também é encontrada uma área contendo grânulos muito pequenos (Figs. 52 e 53).

O citoplasma contém polissomos, longos perfis de retículo

endoplasmático, mitocôndrias alongadas e complexo de Golgi, bem proeminente (Figs. 52, 53 e 68).

Observações dos decalques corados com Leishmann (Fig. 10), do material a fresco sob microscopia de contraste de fase (Fig. 2) e dos cortes semifinos (Fig. 26), sugerem a presença de mais de um núcleo numa mesma massa citoplasmática, fato este confirmado nos cortes ultrafinos (Fig. 62). Os cortes ultrafinos também revelam que é muito comum a presença de pontes citoplasmáticas entre estas espermátides (Fig. 53).

### Espermátides 2 (E2)

Estas células também apresentam núcleo aproximadamente esférico e corado levemente pela Hematoxilina (Figs. 7-9), dificultando sua diferenciação das E1. Ao MET, no entanto, sua cromatina parece estar mais descompactada, pois os grumos condensados que eram observados nas E1, bem como a faixa de cromatina mais compactada adjacente ao envólucro nuclear são geralmente bem menores (Figs. 33, 34, 55, 56, 82 e 90). No núcleo destaca-se uma região mais eletrodensa e finamente granular, que acreditamos ser um nucléolo (Figs. 55, 82 e 90) sendo que alguns grânulos pequenos também são visualizados (Fig. 82), o que indica um início da compactação cromatínica.

Mitocôndrias esparsas e longas cisternas de retículo endoplasmático são encontradas no citoplasma (Figs. 55, 56, 68, 83 e 90) e as pontes citoplasmáticas são facilmente visualizadas entre as células nesta fase (Fig. 56, 67 e 82).

Este estágio de diferenciação é caracterizado pelo início da formação do acrossomo (Figs. 55, 56, 68, 70, 71 e 90), e o desenvolvimento do flagelo (Figs. 79-83) também torna-se nítido. Estes fenômenos ocorrem simultaneamente, em regiões adjacentes e em associação com um complexo de Golgi bem desenvolvido (Figs. 79 e 82).

Embora estas espermátides apresentem grau de compactação cromatínica muito semelhante, o grau de desenvolvimento do acrossomo pode variar, sendo encontradas vesículas acrossomais muito pequenas (Figs. 70 e 79) ou mais proeminentes (Figs. 67, 83 e 90).

### Espermátides 3 (E3)

São espermátides em início de alongação nuclear que ao microscópio óptico apresentam núcleo em forma de taça, mais fortemente corado pela Hematoxilina (Figs. 7-9) e pelo Azul de Toluidina nos cortes semifinos (Figs. 26 e 27) que as E1 e E2. São também mais eletrodensas e com volume reduzido devido à compactação cromatínica (Figs. 55, 56 e 90). A cromatina assume aparência de grânulos pequenos (Figs. 55-59, 86 e 90). Os grumos de cromatina condensada e o nucléolo, visualizados nas fases anteriores, desaparecem, de forma que o conteúdo nuclear mostra-se homogêneo (Figs. 55-59, 86 e 90). Este padrão granular uniforme persiste por toda esta fase de diferenciação, porém os grânulos tornam-se progressivamente maiores (Figs. 99) e mais eletrodensos, parecendo

agregar-se em cordões.

A célula torna-se polarizada, pois o flagelo e a vesícula acrossomal que antes localizavam-se próximos, agora ocupam pólos opostos (Figs. 56 e 58).

Mudanças citoplasmáticas marcantes ocorrem. Um fluxo antero-posterior de citoplasma é estabelecido, de modo a restar apenas uma estreita faixa na região acrossomal e nuclear, e as mitocôndrias e demais organelas vão para a região posterior da célula (Figs. 56, 58, 59 e 90). Microtúbulos surgem no citoplasma e perfazem um trajeto helicoidal, desde a extremidade anterior do núcleo (Figs. 57-59) até o início da cauda (Figs. 56-58, 84 e 90). Os complexos de poros são vistos acumulados na região distal do núcleo (Figs. 57 e 86) e conjuntos deles parecem estar sendo destacados do envólucro nuclear (Fig. 86). A vesícula acrossomal chega a alcançar cerca de dois terços do volume nuclear (Figs. 56, 58 e 73). O flagelo prossegue seu crescimento (Figs. 56 e 58), ao mesmo tempo que surgem as fibras densas ao redor do axonema (Fig. 84).

#### Espermátide 4 (E4)

O núcleo destas espermátides mostra-se ainda mais corado nos cortes submetidos à Hematoxilina (Figs. 8 e 9) ou semifinos corados pelo Azul de Toluidina (Fig. 32), do que aqueles das fases anteriores, refletindo uma maior compactação cromatínica. Ao nível ultra-estrutural, verifica-se que a cromatina organiza-se formando cordões espessos arranjados paralelamente ao maior eixo do núcleo. Assim, em cortes longitudinais do núcleo observam-se estruturas cilíndricas (Figs. 60 e 76) e em cortes transversais estruturas aproximadamente redondas (fig. 61). Estes cordões são delimitados por regiões eletrólúcidas (Figs. 61 e 76). À medida que prossegue a diferenciação, os cordões tornam-se mais eletrodensos e o espaço entre eles mais estreito (Fig. 61).

Nesta fase, o núcleo e acrossomo sofrem alongação e leve torção em hélice, fato notado nos cortes em parafina (Figs. 8 e 9), decalques (Figs. 11-14), cortes semifinos (Fig. 32) e nos cortes ultrafinos (Figs. 60, 67 e 76). Neste período de diferenciação já se nota a associação de um feixe de microtúbulos que se estende desde o início do acrossomo por quase toda a extensão da célula (Figs. 56 e 61).

A cauda, agora bastante longa, assume conformação helicoidal, e tanto em corte transversal (Figs. 86, 87 e 90), como longitudinal (Figs. 56 e 76), revela uma estrutura tripartida constituída pelo axonema, pela mitocôndria e pelo feixe de microtúbulos. O axonema com padrão 9 + 2, apresenta-se associado à nove fibras densas. As mitocôndrias em fusão, bem como o feixe de microtúbulos, fazem um trajeto helicoidal ao redor do axonema por toda a sua extensão (Fig.76).

#### Espermátides 5 (E5)

Ao microscópio de luz, seja nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina (Figs. 7-9), nos decalques corados com Leishmann (Figs. 10, 11, 13 e 14) ou nos cortes semifinos (Figs. 25, 26, 31 e 32), as espermátides finais apresentam núcleo

com forma helicoidal, mais estreito e corado que as E4, sendo bastante difícil sua distinção das E6. Ao nível ultra-estrutural, porém, eles podem ser separadas em tipos celulares distintos, aqui designados E5 e E6.

No núcleo das E5 não são mais observados os cordões eletrodensos de cromatina, os quais aparentemente estão em processo de fusão. Deste modo, o núcleo aparece eletrodenso, com pequenas áreas eletrólúcidas na forma de vírgulas (Figs. 55, 60, 62-64, 68). O tamanho e a quantidade destas áreas diminuem com o decorrer da diferenciação (Figs. 65 e 68).

O acrossomo continua a alongar e espiralar e, na sua periferia, surge uma protuberância que se diferencia na crista espiral (Figs. 62, 68 e 77).

Na cauda, as mitocôndrias fundiram-se totalmente formando a bainha mitocondrial. Esta se dispõe em hélice ao redor do axonema e é envolta pelo feixe de microtúbulos (Figs. 63, 85 e 90). Embora a organização geral da cauda seja muito semelhante àquela observada na fase anterior, verifica-se uma redução de volume, de modo que o feixe de microtúbulos e a mitocôndria tornam-se mais compactos e a quantidade de citoplasma nesta região é reduzida (Figs. 86, 87 e 90).

### Espermátides 6 (E6)

São espermátides finais com núcleo helicoidal e cromatina bastante condensada, intensamente corada (Figs. 8, 9, 11, 14, 25, 26, 30, 31 e 32) e homogeneamente eletrodensa (Figs. 62, 63, 65-68). O núcleo sofreu ainda uma leve redução do volume quando comparado com aqueles das E5 (Figs. 62 e 68).

O acrossomo apresenta conteúdo homogêneo e de eletrodensidade um pouco inferior que a do núcleo (Figs. 76 e 78) e a crista espiral, bem saliente (Figs. 62, 67, 76 e 78), é observada como projeções na forma de espinhos (Figs. 68 e 77).

Estas espermátides podem ser encontradas ainda envoltas pela célula de Sertoli (Figs. 2, 34, 62, 63, 68, 76, 78 e 90), ou soltas em vacúolos no interior desta célula (Figs. 55, 97 e 100). Nas que se encontram em contato com o citoplasma da célula de Sertoli, o feixe de microtúbulos ainda está presente (Figs. 65, 66, 68, 85-90), enquanto nas espermátides encontradas no interior de vacúolos, o feixe de microtúbulos pode estar presente (Figs. 55 e 100) ou não (Fig. 100). Com relação ao axonema, às fibras densas e à mitocôndria, a organização da cauda é a mesma encontrada na fase anterior, embora o citoplasma nesta região esteja ainda mais reduzido (Figs. 86-90).

### 3.6. ESPERMATOZÓIDES TESTICULARES

Os espermatozóides são células muito alongadas e helicoidais, praticamente idênticas às E6, sendo no entanto, reconhecidas como espermatozóides pelo fato de se encontrarem livres na luz do túbulo.

A região da cabeça destes espermatozóides é constituída pelo acrossomo cônico, espiral, e pelo núcleo. O acrossomo é bastante longo, medindo cerca de 9  $\mu$ m, ultrapassando o comprimento do núcleo que mede cerca de 5  $\mu$ m, e é caracterizado pela presença de uma crista espiral, que acompanha sua forma.

A cauda ocupa cerca de 90% do comprimento da célula, sendo constituída pelo axonema com padrão usual 9 +2 e pelas nove fibras densas acessórias. Cada fibra densa mantém contato com a dupla de microtúbulos, é contínua por toda a extensão da cauda e reniforme em secção transversal. Além do axonema e das fibras densas acessórias, por todo o comprimento da cauda é encontrada uma mitocôndria longa, que transcreve um trajeto helicoidal ao redor do axonema. Nestas células o feixe de microtúbulos geralmente não está presente.

### 3.7. ASPECTOS DA BASOFILIA NUCLEAR RESULTANTES AO TRATAMENTO PELO AZUL DE TOLUIDINA A pH 4,0

Como é sabido o Azul de Toluidina, nas condições des critas, é um corante que se liga a grupamentos aniônicos, no caso do DNA, os grupamentos fosfatos (LISON, 1960). Dependendo da quantidade e proximidade de moléculas de Azul de Toluidina que se ligam ao substrato, diferentes respostas serão encontra das podendo mesmo caracterizar fenômenos de metacromasia (LISON, 1960; MELLO & VIDAL, 1977; VIDAL & MELLO, 1987).

No presente estudo, observamos respostas de basofilia variadas de acordo com a fase de diferenciação espermática. Os núcleos das espermátides E1 e E2 apresentam metacromasia corando-se em violeta azulado (Figs. 20, 21 e 23). O núcleo das espermátides E3 também se cora em violeta azulado, no entanto, com intensidade muito maior (Figs. 20-23). As espermátides em alongação nuclear e processo de torção em hélice (E4) exibem núcleos corados fracamente em violeta azulado (Figs. 20-22). As espermátides finais (E5 e E6) apresentam núcleos corados em verde (ortocromasia) (Figs. 20-23), embora seja difícil individualizar os núcleos destas espermátides dada a proximidade em que se encontram dentro dos feixes.

### 3.8. FORMAÇÃO DO ACROSSOMO

As espermatídes iniciais (E1) apresentam complexo de Golgi bem proeminente com sua face cis, rica em vesículas, voltada para o núcleo (Fig. 52).

No segundo período da diferenciação espermática, vesículas provenientes do Golgi aproximam-se do envólucro nuclear e coalescem para formar a vesícula acrossomal (Figs. 68 e 70). Esta fase é caracterizada pelo surgimento e crescimento da vesícula acrossomal, facilmente visualizada nos cortes semifinos (Figs. 26 e 30). Após tratamento pelo PAS as vesículas acrossomais aparecem como regiões suavemente coradas em rosa, nas adjacências do núcleo (Figs. 18 e 19). Nos cortes ultrafi nos elas apresentam forma triangular ou semi-esférica e conteúdo finamente granular, onde se distinguem regiões de eletrodensidades diferentes (Figs. 34, 55, 56, 68 e 71). A área de maior eletrodensidade localiza-se internamente e mais próxima do núcleo, sendo designada grânulo acrossomal (Figs. 34, 56, 71 e 90). Na região de contato entre a vesícula acrossomal e o núcleo, as membranas tornam-se mais espessas e eletrodensas, parecendo ocorrer deposição de material eletrodense junto às suas faces internas (Figs. 56 e 71).

Nas E3, o citoplasma é direcionado para regiões caudais e a célula torna-se polarizada, não sendo mais observado o complexo de Golgi na região acrossomal (Figs. 56, 58 e 59). A vesícula acrossomal, agora aproximadamente esférica, localiza-se em uma ampla concavidade nuclear e alcança cerca de dois terços do volume do núcleo (Figs. 55, 56, 58, 59 e 72). Este aumento em volume é facilmente observado no material submetido ao PAS, pois nestes cortes a vesícula acrossomal apresenta-se fortemente corada em rosa (Figs. 17-19). O grânulo acrossomal ocupa aproximadamente 70% do interior da vesícula (Figs. 56, 72, 73 e 86) e, no seu interior destacam-se uma ou mais regiões esféricas de maior eletrodensidade, que correspondem ao grânulo acrossomal interno (Figs. 72 e 86). O grânulo acrossomal interno não aparece nos cortes semifinos como um ponto escuro muito peculiar destas espermatídes (Figs. 26, 27 e 32).

Nas fases posteriores da diferenciação (E4-E6) ocorrem modificações morfológicas como alongamento e espiralização também condensação do conteúdo acrossomal. Primeiramente (E4), o acrossomo sofre um grande alongamento, chegando a alcançar comprimento semelhante ao do núcleo (Fig. 76). Ele apresenta-se cilíndrico e levemente curvado, o que sugere um início de espiralização (Fig. 76). Quando comparado com a fase anterior de diferenciação, o acrossomo mostra-se corado mais intenso e uniformemente pelo PAS (Fig. 19). O grânulo acrossomal, agora mais eletrodense, acompanha a forma do acrossomo, mas não ocupa todo seu interior, sendo observada ainda a região mais eletrolúcida. Esta região pode ser observada tanto nos cortes ultra-finos (Figs. 61 e 76) como nos cortes semifinos (Fig. 32).

Ao MET verifica-se que as E5 são caracterizadas pelo início da formação de uma protuberância na região eletrolúcida do acrossomo (Figs. 66, 75 e 77) que paulatinamente se diferencia na crista espiral (Figs. 68, 75 e 77).

As E6 apresentam acrossomo mais longo que o núcleo, cônico, espiral, com conteúdo homogêneo e pouco menos eletrodense que o núcleo. Na sua

superfície salienta-se a crista espiral (Figs. 62, 67, 68, 76 e 78).

A técnica do PAS também evidencia a forma espiral dos acrossomos das espermátides finais que nesta fase coram-se intensamente em rosa (Figs. 16-19). Não foi possível discernir entre E5 e E6, nestes preparados. No entanto, quando acompanha da coloração pela Hematoxilina, a técnica do PAS é muito útil por fornecer uma idéia do tamanho do acrossomo em relação ao núcleo (Figs. 17 e 19). A forma do acrossomo nas espermátides finais também é realçada pelo corante de Leishmann, que os cora suavemente em azul acinzentado (Figs. 10 e 11).

As espermátides finais (E5 e E6), nos decalques corados por Leishmann, apresentam duas projeções na região nuclear adjacente ao acrossomo (Figs. 13 e 14). Ao MET nota-se que o acrossomo apóia-se em uma profunda concavidade nuclear (Figs. 63 e 76). Em cortes transversais da região entre núcleo e acrossomo, as projeções nucleares são vistas em regiões opostas, nas laterais do acrossomo, verificando-se que o acrossomo localiza-se um pouco deslocado para um dos lados do núcleo (Fig. 74).

### 3.9. FORMAÇÃO DO FEIXE DE MICROTÚBULOS

As espermátides iniciais, E1 e E2, não possuem microtúbulos orientados no citoplasma. Estes surgem nas E3 (Figs. 56-59 e 90), justamente na fase em que muitas mudanças citoplasmáticas e nucleares ocorrem.

Nas E3, os microtúbulos são encontrados desde a base do acrossomo (Figs. 58 e 59) até o início da cauda (Figs. 56-58 e 84), fazendo um trajeto helicoidal (Figs. 57 e 58). Eles formam, inicialmente, uma fileira única logo abaixo da membrana plasmática (Figs. 56 e 58), mas aumentam em número no decorrer desta fase (Fig. 57) e começam a se organizar na forma de feixe. Em espermátides com grau de compactação cromatínica intermediário entre E3 e E4, algumas vezes são visualizados, entre o feixe de microtúbulos e o núcleo, o citoplasma da célula de Sertoli (Fig. 99).

No período seguinte (E4), em que a espermátide alonga, os microtúbulos distribuem-se por quase toda a extensão da célula, com exceção da parte anterior do acrossomo (Fig. 61) e formam um feixe bem organizado (Figs. 76, 87 e 90). Este feixe, tanto na região nuclear, como na caudal, posiciona-se nas convexidades da espermátide (Figs. 67 e 76). Nesta fase as mitocôndrias estão assumindo sua conformação helicoidal ao redor do axonema (Figs. 67 e 76) e o feixe de microtúbulos encontra-se externamente a elas, executando o mesmo trajeto e envolvendo-as (Figs. 87 e 90).

Nas espermátides E5 e E6, o feixe de microtúbulos é visualizado por toda a extensão da célula (Figs. 65, 66, 68, 87-90), inclusive no início do acrossomo (Figs. 69, 74 e 75). Também é freqüente a ocorrência de um processo da célula de Sertoli penetrando entre o feixe de microtúbulos e a espermátide (Figs. 69 e 75),

nesta região. À medida que as células progridem na sua diferenciação o feixe de microtúbulos aparece mais compacto e o citoplasma que ocupa é menos volumoso (Figs. 87 e 90).

Devido ao fato do feixe de microtúbulos executar um trajeto helicoidal ao redor do axonema, os microtúbulos do feixe encontram-se inclinados com relação aos microtúbulos do axonema. Sendo assim, quando o axonema é cortado transversalmente e os microtúbulos que os constituem são observados nitidamente, os microtúbulos do feixe aparecem em cortes aproximadamente longitudinais (Figs. 87 e 88). Por sua vez, quando o feixe de microtúbulos é cortado transversalmente e seus microtúbulos aparecem nítidos, os do axonema estão seccionados tangencialmente (Fig. 89). Quando o feixe de microtúbulos é seccionado transversalmente, entre as fileiras de microtúbulos são observadas cisternas de retículo endoplasmático liso (Fig. 89).

O feixe de microtúbulos, nas espermatídes finais (E5 e E6), parece ser mais longo que a mitocôndria, pois em cortes transversais da região caudal destas espermatídes (Figs. 85 e 98), apenas ele é observado rodeando o axonema, mas separado deste por um espaço, o canal flagelar. Deste modo, de um lado do axonema resta apenas uma estreita faixa de citoplasma (Figs. 85 e 98).

As espermatídes finais (E6) que se encontram imersas no citoplasma da célula de Sertoli, geralmente ainda apresentam o feixe de microtúbulos (Figs. 85-90, 98 e 100). Entretanto, algumas vezes, o citoplasma contendo o feixe de microtúbulos está protraído (Fig. 100) ou ausente (Figs. 85 e 98). Enquanto as espermatídes encontradas no interior de vacúolos do citoplasma da célula de Sertoli podem ou não apresentar o feixe (Figs. 55, 97 e 100), nos espermatozóides livres na luz do túbulo o feixe geralmente está ausente (Fig. 97).

### 3.10. DESENVOLVIMENTO DO FLAGELO

Embora não tenham sido observados sinais evidentes do início do desenvolvimento do flagelo nas E1, é neste período que tal processo parece ocorrer, pois é muito freqüente nas proximidades destas células, a presença de um flagelo com axonema simples em corte transversal (Fig. 52).

As E2 apresentam os centríolos próximos do envólucro nuclear, um dos quais em contato direto com o núcleo, em uma região próxima de onde está ocorrendo a formação da vesícula acrossomal (Fig. 79). Estes se posicionam, perpendicularmente, um em relação ao outro (Fig. 79). Na região de contato dos centríolos com o núcleo, o envólucro nuclear torna-se espessado e eletrodense, apresentando, a princípio, uma pequena invaginação (Figs. 79 e 80) que, posteriormente, transforma-se em uma concavidade mais ampla (Fig. 83). Um proeminente complexo de Golgi estende-se desde a vesícula acrossomal até a

proximidade dos centríolos, sendo observadas na periferia destes últimos inúmeras vesículas (Fig. 79).

Nesta fase os microtúbulos do axonema começam a crescer a partir dos microtúbulos do centríolo e, logo é formado o "annulus" (Figs. 80 e 81). Este apresenta um espessamento da membrana plasmática que circunda a base do axonema. O flagelo é constituído apenas pelo axonema com padrão 9 + 2, que se projeta juntamente com a membrana plasmática, de modo que, é freqüentemente observado em corte transversal próximo das E2 (Figs. 71, 83 e 90).

Adjacente ao núcleo e próximo aos centríolos, nota-se um material finamente granular e de moderada eletrodensidade, o qual designamos "material adjunto do centríolo" (Figs. 33 e 55). Nas proximidades do axonema em desenvolvimento são encontrados grupos de vesículas de pronunciada eletrodensidade (Figs. 80 e 81).

Em espermátides E3, o flagelo em formação apóia-se em uma concavidade nuclear (Figs. 56-58). Esta concavidade também é preenchida pelo material adjunto do centríolo que ocorre também como uma estrutura esférica de constituição finamente granular, localizada na região posterior do núcleo (Figs. 56 e 57). Não foi possível observar mais de um centríolo neste estágio.

Com o deslocamento do citoplasma para região caudal, o "annulus" migra para regiões mais posteriores da célula sendo observado na extremidade do citoplasma caudal das E3 (Fig. 58).

As mitocôndrias começam a se fundir, agrupando-se ao redor da parte proximal do axonema (Figs. 56 e 58). Nesta fase, surgem as fibras densas, associadas às duplas de microtúbulos do flagelo (Figs. 84).

Nas E4 o flagelo apóia-se numa dupla fossa nuclear (Fig. 67). Não se pode distinguir o centríolo, uma vez que a dupla de microtúbulos centrais do axonema é visualizada mesmo nas porções mais anteriores do flagelo (Fig. 60), e não foram obtidos cortes transversais desta região.

Rodeando helicoidalmente a parte inicial do axonema encontra-se o material adjunto do centríolo, que se apresenta bastante alongado, com conteúdo finamente granular e eletrodense, onde se destacam algumas regiões mais eletrolúcidas (Figs. 60 e 90).

O flagelo, neste período de desenvolvimento, mostra-se bastante comprido. O axonema é rodeado por nove fibras densas contínuas associadas a cada uma das duplas de microtúbulos do axonema, que percorrem quase toda sua extensão (Figs. 70 e 76).

Durante esta fase de diferenciação espermática, o padrão básico de organização da cauda começa a ser estabelecido. As mitocôndrias, muito alongadas e ainda em processo de fusão, envolvem o axonema, de modo que em cortes transversais apresentam forma de "C" (Figs. 67, 76, 87 e 90). Apesar de alongadas seu contorno é irregular e elas começam a assumir um trajeto helicoidal ao redor do axonema (Figs. 56, 67 e 76). Os microtúbulos estão organizados em feixes que são encontrados desde a região nuclear até o final da cauda. Na cauda eles se posicionam externamente às mitocôndrias (Figs. 86, 87 e 90). Na fase posterior da diferenciação do flagelo (E5), mitocôndria bastante longa e única devido à fusão, sofre uma condensação, tornando-se mais estreita, com matriz eletrodensa e, cristas que se dispõem perpendicularmente ao maior eixo da célula (Figs. 87 e 88). Ela

faz um trajeto helicoidal ao redor do axonema e, em corte transversal da cauda, é vista lateralmente a ele (Figs. 87-88).

A organização da cauda das espermátides E6 é muito semelhante àquela das E5, o que dificulta a distinção destas em cortes transversais do feixe (Figs. 86-90). Notam-se porém, que as E6 apresentam o citoplasma contendo o feixe de microtúbulos mais compactado e fibras acessórias um pouco mais volumosas e eletrodensas (Figs. 86 e 90) do que as E5. A cauda destas espermátides possui cisternas de retículo endoplasmático liso entre as fileiras de microtúbulos (Fig. 89), e o feixe de microtúbulos parece ser mais longo que a mitocôndria, pois, em regiões terminais apenas ele é visto rodeando o axonema (Figs. 85 e 98).

As E6 perdem o feixe de microtúbulos no final de sua maturação (Figs. 97, 98 e 100). O flagelo dos espermatozóides é, pois, constituído do axonema com seu padrão usual 9 + 2, das fibras densas acessórias e da mitocôndria bastante compactada e eletrodensa, executando um trajeto helicoidal ao redor do axonema (Fig. 97). A mitocôndria apresenta forma ovalada, em corte transversal, e seu tamanho diminui nas regiões mais distais da cauda (Fig. 97). Na parte inicial da cauda, encontra-se o material adjunto do centríolo, com forma reniforme, em corte transversal, e bastante eletrodense (Fig. 97).

### 3.11. ELIMINAÇÃO CITOPLASMÁTICA

No início da diferenciação espermática (E1), o núcleo ocupa posição central (Figs. 52 e 53), porém com o surgimento da vesícula acrossomal e início da formação do flagelo (E2), o mesmo torna-se excêntrico, havendo um acúmulo de material citoplasmático em um dos pólos da célula (Figs. 82, 83 e 90). O complexo de Golgi nas espermátides E2, situa-se nas adjacências deste acúmulo citoplasmático (Fig. 82).

A terceira fase de diferenciação espermática (E3) é a mais marcante com relação aos eventos de eliminação citoplasmática. Neste período, ocorre um acentuado fluxo citoplasmático em direção à cauda, onde passa a se localizar a maior parte das organelas. Nas regiões acrossomal e nuclear resta apenas uma estreita faixa de citoplasma (Figs. 56, 58, 59 e 90). No citoplasma caudal, além do complexo de Golgi com muitas cisternas e vesículas, são encontrados polissomos, longos perfis de retículo endoplasmático liso e grânulos densos (Figs. 56, 58 e 90). Os poros nucleares, que em fases anteriores (E1 e E2) estavam espalhados regularmente por todo o envólucro nuclear, migram para a região distal do núcleo (Fig. 57, 57 e 86), sendo posteriormente destacados em conjunto com parte do envólucro nuclear, formando lamelas anuladas (Figs. 94 e 95).

No decorrer deste estágio de diferenciação, o citoplasma caudal é gradativamente deslocado para regiões posteriores da célula. A princípio, ele rodeia amplamente o axonema (Figs. 84, 86 e 90) mas logo tende a formar um lobo citoplasmático (Figs. 84). Posteriormente, situa-se deslocado para um lado do

axonema, de modo que, no outro lado, resta apenas uma estreita faixa de citoplasma rodeando o axonema (Figs. 92 e 95).

Concomitantemente a este deslocamento, surgem no lobo citoplasmático, outras organelas tais como o corpo multivesicular, o corpo reticulado e lisossomos (Figs. 92, 94 e 96). O corpo multivesicular aparece nas proximidades do complexo de Golgi, na forma de uma vesícula rica em vesículas menores (Figs. 95).

Alguns grânulos densos são observados na periferia e, posteriormente, no interior de grandes corpos esféricos eletrodensos. Estes grânulos provavelmente são compostos de material a ser digerido que é internalizado em lisossomos (Figs. 92, 94 e 96). Os lisossomos apresentam-se pouco menos eletrodensos que os grânulos densos, podendo haver vários grânulos no mesmo lisossomo e mais de um lisossomo por resíduo de citoplasma a ser eliminado (Figs. 92, 94 e 96). Filamentos intermediários são também encontrados no interior destes resíduos (Figs. 92).

Por fim, os resíduos citoplasmáticos são eliminados nas regiões terminais da cauda, possivelmente nas fases E5 e E6, para a luz do túbulo (Figs. 3, 91 e 92). Juntamente com estes resíduos, são eliminadas as pontes citoplasmáticas, visualizadas entre eles (Figs. 91).

A luz dos túbulos é quase totalmente preenchida por resíduos citoplasmáticos (Figs. 93), o que pode ser observado nos cortes em parafina (Figs. 5, 6, 15) e nos cortes semifinos (Figs. 25). Alguns destes resíduos apresentam citoplasma mais eletrodense do que outros, o que deve refletir uma maior condensação (Figs. 91). No interior dos resíduos citoplasmáticos são encontradas mitocôndrias alongadas, grânulos densos, lisossomos, lamelas anuladas e elementos de retículo endoplasmático liso em arranjos circulares ou empilhados na periferia (Figs. 91-96).

### 3.12. ESPERMIAÇÃO

Assim que a célula de Sertoli começa a se associar com as espermátides, cisternas de retículo endoplasmático do seu citoplasma são observadas rodeando as espermátides. Deste modo, as E4, E5 e E6 encontram-se totalmente rodeadas por estas cisternas (Figs. 54, 59, 61, 65, 66, 68, 74, 75, 87-89). A membrana da célula de Sertoli, que se encontra em contato com a região acrossomal das espermátides finais apresenta um material eletrodense depositado na sua face citoplasmática, sendo muitas vezes observada uma faixa mais eletrodensa no citoplasma da célula de Sertoli rodeando na altura da região acrossomal das E4, E5 e E6 (Figs. 61, 75, 77 e 78). Acreditamos que esta região do citoplasma seja rica em filamentos, daí sua maior eletrodensidade. Estes filamentos juntamente com as cisternas de retículo endoplasmático liso fazem parte das especializações citoplasmáticas, descritas para células de Sertoli de uma va-

riedade de animais (SPRANDO & RUSSEL, 1987, 1988). No pardal, as cisternas de retículo endoplasmático rodeiam as espermatídes ao longo de toda a sua extensão, porém os filamentos são abundantes apenas na região acrossomal.

Entre as espermatídes finais (E4, E5 e E6) e a célula de Sertoli existe um pequeno espaço (Figs. 74, 75, 87-89). O início da espermição é marcado por um aumento na largura deste espaço (Figs. 85, 89, 98). Este aumento prossegue até que espaços de espermatídes vizinhas se fundam. Isso acarreta a formação de vacúolos no citoplasma da célula de Sertoli que, a princípio, contém apenas duas ou três espermatídes. Com o decorrer da espermição e a fusão de vacúolos estes passam a conter várias espermatídes (Figs. 100). A ruptura de vacúolos localizados na periferia do citoplasma libera as espermatídes para a luz do túbulo (Fig. 97).

O citoplasma da célula de Sertoli contendo espermatídes finais próximas da espermição apresenta-se bastante eletrodense na região basal da célula enquanto a região apical apresenta citoplasma bem mais eletrolúcido (Figs. 34). Neste citoplasma são encontrados lisossomos e muitas vesículas que se concentram principalmente na região acrossomal.

**DISCUSSÃO**

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. ORGANIZAÇÃO TESTICULAR EM Passer domesticus

Através de observações de cortes em parafina e cortes semifinos, verificamos que o testículo de Passer domesticus é envolto por uma cápsula testicular e que seu interior é constituído por uma profusão de túbulos seminíferos. Estas observações concordam com o padrão de organização testicular estabelecido para aves e descrito por vários autores (BAILEY, 1953; LOFTS & MURTON, 1973 e PEREZ & PEREZ, 1972).

Os túbulos seminíferos dos órgãos estudados apresenta ram epitélio germinativo com altura de várias células. Tal fato vem sendo designado por vários autores (BAILEY, 1953; LOFTS & MURTON, 1973 e PEREZ & PEREZ, 1972) como sendo único de testículos de aves que se encontram em período reprodutivo.

A presença de comunicação entre os túbulos seminíferos é muito comum, o que nos leva a supor que eles sejam anastomosados. BAILEY (1953) através da observação de cortes seriados e de testículos macerados de várias espécies de passeriformes concluiu que, provavelmente, todos os túbulos seminíferos são interconectados e extremidades de fundo cego não existem, ou seja, os túbulos seminíferos nestes pássaros formam uma trama única e contínua.

Também pudemos verificar que o interior do órgão é totalmente preenchido pelos túbulos seminíferos, não sendo encontrados septos dividindo o testículo em lóbulos. O fato dos túbulos seminíferos serem todos anastomosados e não existirem septos testiculares é característica peculiar dos testículos de aves, e os diferencia dos testículos de mamíferos (LOFTS & MURTON, 1973).

Os métodos utilizados no presente estudo não possibilitaram a identificação da rede testis e vasos deferentes, sendo necessária a confecção de cortes seriados do órgão para a localização destes túbulos.

Do mesmo modo, não foi possível identificar o tecido intersticial, apesar de ser do nosso conhecimento que, no período reprodutivo, este tecido encontra-se mais desenvolvido. Segundo LOFTS & MURTON (1973) esse fato é comum, pois com a proliferação do epitélio germinativo e conseqüente expansão dos túbulos seminíferos, fenômenos peculiares do período reprodutivo, o tecido intersticial torna-se disperso, comprimido e de difícil localização.

Apesar da importância do tecido peritubular ter sido há muito reconhecida (CLERMONT, 1958; DYM & FAWCETT, 1970), sua ultra-estrutura tem recebido pouca atenção entre os pesquisadores, principalmente nas aves. No pardal, o tecido peritubular apresenta organização semelhante àquela descrita por ROTHWHEEL & TINGARI (1973) para o galo doméstico. Seu interior é constituído de células com características fibroblásticas, entre as quais encontram-se fibras colagênicas. Também são evidenciadas nesta região células com citoplasma rico em filamentos, que consideramos células mioepiteliais, já descritas para o tecido

peritubular de uma ave não passeriforme (ROTHWEEL & TINGARI, 1973).

Muito peculiar no testículo do pardal é a organização das espermátides em feixes à medida que maturam. A localização das espermátides em diferentes fases de diferenciação dentro do feixe e a distribuição dos feixes no epitélio germinativo, aproximadamente perpendicular à parede do túbulo, acarretam um padrão radial de organização, muito regular. Este padrão de organização, ao que se sabe, não foi descrito para nenhum outro grupo a não ser para os passeriformes (RETZIUS, 1909).

#### 4.2. EPITÉLIO GERMINATIVO

No epitélio germinativo do pardal, à semelhança do que ocorre em epitélios germinativos de mamíferos (PHILLIPS, 1974), ou em qualquer epitélio estratificado, as células tornam-se progressivamente mais diferenciadas à medida em que se afastam da lâmina basal, sendo assim, adjacentes à lâmina basal são encontradas as espermatogônias e próximo à luz as espermátides. Verifica-se contudo, que espermátides em estádios mais adianta dos de maturação (E4, E5 e E6), localizam-se mais próximas à parede do túbulo do que as espermátides iniciais (E1 e E2), e as espermátides em fases intermediárias de desenvolvimento (E3), por sua vez, são as que se posicionam mais próximas à luz do túbulo. Pudemos observar que o posicionamento das espermátides está diretamente relacionado com o grau de interação destas células com a célula de Sertoli, que aumenta à medida que prossegue a diferenciação (Esquema 4). Quanto mais diferenciadas, mais mergulhadas no citoplasma da célula de Sertoli encontram-se as espermátides, de forma a estarem mais próximas da parede do túbulo. Este movimento das espermátides em direção à parede do túbulo seminífero, devido a um aprofundamento no citoplasma da célula de Sertoli, já foi descrito para outros grupos de animais. HENLEY e colaboradores (1978) também encontraram espermátides em diversas alturas dentro do feixe, nos testículos dos Oscines por eles estudados. Para tais autores as espermátides menos maduras ocorrem em níveis mais luminais no epitélio por serem mais curtas, o que não parece ser o fator limitante na sua localização no caso do pardal.

No epitélio seminal dos órgãos estudados, além da camada basal de espermatogônias, células de Sertoli, e abundantes espermátides, encontramos uma grande quantidade de espermatócitos primários, o que é uma indicação de que os espermatozoides são formados em ondas, como ocorre em mamíferos (PEREY *et al.*, 1961). A formação dos espermatozoides em ondas no interior do epitélio seminífero é característica de aves com períodos de reprodução mais longos, ou aves que se reproduzem durante quase todo o ano, como é o caso do pardal em regiões temperadas (LOFTS & MURTON 1974).

CLERMONT (1958) postulou que para uma condição plena de reprodução existem três fases claramente definidas de reabilitação do epitélio germinativo: (1)

o período de multiplicação espermatogonial, durante o qual novas espermatogônias são formadas continuamente e algumas começam a se diferenciar em espermatócitos primários; (2) o período de divisão dos espermatócitos, quando as células entram em meiose produzindo espermatócitos secundários, que maturam formando espermátides e (3) o período durante o qual as espermátides se diferenciam em espermatozóides maduros.

Através da análise dos cortes em parafina corados pela Hematoxilina-Eosina ou submetidos à técnica do PAS, verificamos que parece existir uma delimitação espacial muito nítida destas três fases no interior do epitélio, principalmente com relação ao período três, ou espermiogênese. Esta fase ocorre exclusivamente na região do epitélio próxima à luz, sendo observado pela técnica do PAS, um limite acima do qual não são encontradas espermátides.

Devido ao tempo de duração de cada estágio de diferenciação durante a espermatogênese, as células germinativas se agrupam, formando associações características, nas quais os tipos celulares encontrados são constantes (CLERMONT, 1958). O presente trabalho não teve como objetivo principal estudar detalhadamente os tipos de associações celulares encontradas no epitélio germinativo do pardal. Verificamos, porém, que em corte transversal de um túbulo seminífero, muitos tipos diferentes de associações estão presentes (ver figura 8). Essa observação permite concordar com CLERMONT (1958) que, estudando o ciclo do epitélio germinativo no canário, notou que, estas associações ocupam pequenos segmentos da parede tubular, ao contrário do que ocorre em mamíferos, onde um único tipo de associação celular geralmente se estende por longos segmentos do túbulo.

#### 4.3. FEIXES DE ESPERMÁTIDES

Como citado anteriormente, um fato muito característico com relação à distribuição das células germinativas no testículo do pardal é a organização das espermátides finais em feixes, fato este comum à espermatogênese de todos os Oscines estudados até o presente (HENLEY *et al.*, 1978; HUMPHREYS, 1972). Apesar da organização das espermátides na forma de feixes ser característica dos Oscines, não é somente neste grupo que tal fato ocorre, sendo que a formação de feixes já foi descrita para outros grupos animais. Em anfíbios (TABOGA, 1990), peixes condreíctes (STANLEY & LAMBERT, 1985), peixes teleósteos (SILVEIRA *et al.*, 1990) e insetos (PHILLIPS, 1970 e MESSIAS, 1990) o desenvolvimento espermático ocorre sincronicamente no interior de cistos e as espermátides finais, muitas vezes, organizam-se em feixes. De acordo com muitos autores, a formação de feixes ocorre devido à sincronia existente durante o desenvolvimento espermático, a qual estaria relacionada com ou seria garantida pela presença de pontes citoplasmáticas

(HENLEY et al., 1978; PHILLIPS, 1974 e SILVEIRA et al., 1990).

No pardal, em cada feixe são encontradas espermatídes em fases diferentes de maturação. Espermatídes menos diferenciadas localizam-se na periferia do feixe e à medida que maturam ocupam posições mais centrais, ou seja, dentro de um feixe existem grupos de espermatídes provenientes, provavelmente, da mesma divisão, cujo desenvolvimento é sincrônico, mas não existe uma sincronia entre todas as espermatídes do feixe.

Pontes citoplasmáticas são observadas entre espermatídes E1 e E2. Nos estágios posteriores de diferenciação (E3, E4) estas pontes são encontradas ligando resíduos de eliminação citoplasmática e eliminadas juntamente com eles, nas fases finais da espermiogênese (E5 e E6).

HENLEY e colaboradores (1978) observaram nos Oscines por eles estudados que as espermatídes finais apresentam arranjo preciso, no interior do feixe. Em Passer domesticus este arranjo não parece ser tão preciso, pois em cortes transversais do feixe são encontradas espermatídes em diferentes regiões, desde o acrossomo até o início da cauda.

O movimento das espermatídes no epitélio e a organização destas em feixes têm sido relacionados com a presença e concentração crescente de filamentos de actina na célula de Sertoli, principalmente na região das especializações citoplasmáticas (STANLEY & LAMBERT, 1985), mencionadas em maior detalhe no item 4.17.

#### 4.4. CÉLULA DE SERTOLI

Nos cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina apenas é possível observar regiões do citoplasma da célula de Sertoli entre os espermatócitos primários, nas adjacências do feixe. Isto dificulta sua caracterização nestes preparados. Os cortes semifinos e ultrafinos, ao contrário, são muito úteis na localização e caracterização destas, uma vez que, neste cortes, o seu citoplasma apresenta-se bem mais corado ou eletrodense do que o das demais células do epitélio. Ao MET estas células se diferenciam das demais células germinativas por seu tamanho maior e pela forma irregular do seu núcleo.

O núcleo das células de Sertoli, geralmente, localiza-se em posição acima das espermatogônias e abaixo das demais células germinativas. O seu citoplasma, da mesma forma que ocorre nos mamíferos (DYM & FAWCETT, 1970), divide o epitélio em duas regiões: o compartimento basal e o compartimento apical.

Ao nível ultra-estrutural, as células de Sertoli do pardal são muito semelhantes às de não passeriformes, como o galo doméstico (COOKSEY & ROTHWHEEL, 1973), e de outros vertebrados (DYM & FAWCETT, 1970),

principalmente com relação à forma nuclear, tipo de nucléolo, abundância de microtúbulos e grande quantidade de prolongamentos citoplasmáticos. Com base nestas características morfológicas, acreditamos que estas células desempenham funções semelhantes às descritas para as células de Sertoli de outros vertebrados.

As células de Sertoli do pardal apresentam núcleo com grande quantidade de complexos de poros, cromatina pouco compactada, nucléolo proeminente, retículo endoplasmático e mitocôndrias abundantes, o que lhes sugerem uma alta atividade metabólica.

O nucléolo bem desenvolvido é característica marcante das células de Sertoli, como tem sido evidenciado a partir de estudos ao microscópio eletrônico nas mais variadas espécies (BUSTOS-OBREGON & ESPONDA, 1974; SINHA HIKIM *et al.*, 1988; MIRRE & KNIBIEHLER, 1962). Em *Passer domesticus*, as células de Sertoli possuem nucléolo compacto e esférico, associado a uma estrutura esférica eletrodensa homogênea com aspecto granular.

A presença de corpos nucleares associados a nucléolos é comum em diversos tipos celulares. SCHULTZ (1989) descreveu a existência de um corpo enovelado ("coiled body") associado ao nucléolo das células de Sertoli de rato, além de massas de heterocromatina. O corpo enovelado recebe esta denominação pois é constituído de filamentos separados por canais eletrolúcidos, muito semelhantes à região fibrilar do nucléolo (MONNERON & BERNHARD, 1969 e SCHULTZ, 1989). As estruturas esféricas encontradas em células de Sertoli do pardal, associadas ao nucléolo ou livres no núcleo, são muito semelhantes ao corpo enovelado descrito para células de Sertoli do rato (SCHULTZ, 1989), para neurônios (RASKA *et al.*, 1990a) e células cíclicas em cultura (RASKA *et al.*, 1990a e RASKA *et al.*, 1990b), embora os filamentos não tenham sido bem individualizados.

RASKA e colaboradores (1990a), com o uso de técnicas imunocitoquímicas, localizaram em linhagens celulares de mamíferos e culturas primárias de neurônios de rato uma proteína marcadora específica do corpo enovelado, a p80-coilina. Segundo estes autores, em células cíclicas, os corpos helicoidais geralmente não se encontram associados ao nucléolo, mas em neurônios de rato a associação é freqüente. Estudos imunocitoquímicos realizados com anticorpos anti p80-coilina (RASKA *et al.*, 1990b) mostram que o tratamento de células cíclicas com drogas que inibem a síntese ou interferem no processamento do RNAr levam a associação dos corpos enovelados com o núcleo, e revelam que além de macromoléculas nucleolares, como a fibrilarina, esta estrutura contém um grande número de moléculas típicas do espaço intercromatínico envolvidas no processamento do RNAm. Embora as funções dos corpos enovelados nos diferentes tipos celulares não sejam conhecidas, estas descobertas sugerem seu envolvimento no processamento, transporte e armazenamento de metabólitos nucleolares, sendo estes considerados organelas multifuncionais que servem tanto ao núcleo como ao nucleoplasma (RASKA *et al.*, 1990a).

A grande quantidade de microtúbulos encontrada no citoplasma das células de Sertoli possivelmente contribui na função de suporte mecânico que estas células fornecem para as espermátides em desenvolvimento. Estes microtúbulos se dispõem no sentido da elongação das espermátides, o que nos fez supor, a princípio, um envolvimento da célula de Sertoli no processo de elongação das mesmas, como tem sido postulado por muitos autores para outros animais

(COOKSEY & ROTHWEEL, 1973; TABOGA, 1990). Em *Passer domesticus*, estes microtúbulos não são encontrados imediatamente adjacentes às espermatídes, pois não são observados no citoplasma da célula de Sertoli entre as cisternas de retículo endoplasmático liso e a espermatíde. Tal fato suscita dúvidas de como os microtúbulos poderiam estar engajados em movimentos transcelulares efetivos na morfogênese das espermatídes. Outra hipótese para a função dos microtúbulos é a de transporte interno de substâncias e organelas, nesta célula de grandes prolongamentos citoplasmáticos e metabolismo muito ativo.

As vesículas eletrodensas muito osmiofílicas, encontradas no citoplasma próximas às espermatídes finais, provavelmente são gotas lipídicas. Vesículas semelhantes foram observadas no galo doméstico (COOKSEY & ROTHWEEL, 1973), parecendo aumentar em número e tamanho com o surgimento das espermatídes tardias.

A fagocitose é uma propriedade bem estabelecida das células de Sertoli que, em muitas espécies, está envolvida com a assimilação do citoplasma residual das espermatídes (RUSSEL 1979a, 1979b e RUSSEL & CLERMONT, 1976). A presença de vesículas contendo porções citoplasmáticas das espermatídes ricas em microtúbulos e estruturas semelhantes a lisossomos, no citoplasma da célula de Sertoli, é indicativa desta função. Não encontramos, contudo, evidências da ação fagocítica destas células em relação aos resíduos de eliminação citoplasmática eliminados na forma de corpúsculos residuais.

Outra função importante da célula de Sertoli é a compartimentalização fisiológica do epitélio seminal, dada a presença de extensas regiões de junção de membrana, que constituem o elemento fundamental da barreira hemato-testicular (DYM & FAWCETT, 1970). COOKSEY e ROTHWEEL (1973) foram os primeiros autores a estudar as junções de membrana da célula de Sertoli de aves, utilizando o galo doméstico. Recentemente, PELLETIER (1990), em um estudo detalhado sobre as junções da célula de Sertoli em aves, verificou que a membrana plasmática desta célula pode ser dividida em três domínios, um dos quais especializado em contatos laterais entre as células. Como não realizamos um estudo minucioso sobre os tipos de junção existentes nas células de Sertoli deste passeriforme, apenas observamos regiões de junções de membrana entre células de Sertoli e espermatídes.

#### 4.5. ESPERMATOGÔNIAS

A caracterização das células germinativas, ao nível estrutural e ultra-estrutural foi muito dificultada devido à escassez de trabalhos que enfoquem os estádios iniciais da espermatogênese, uma vez que a maioria dos estudos neste campo referem-se aos aspectos ultra-estruturais da espermiogênese (HUMPRHEYS, 1972; MATTEI *et al.*, 1972; OKAMURA & NISHIAMA, 1976 e SAITA *et al.*, 1983) ou à morfologia dos espermatozóides maduros (TINGARI, 1973; BAKST & HOWARTH, 1975; HENLEY *et al.*, 1978; THURSTON *et al.*, 1982; ASA *et al.*, 1986; SAMOUR *et al.*, 1986 e PHILLIPS *et al.*, 1987).

Seja ao nível estrutural ou ultra-estrutural, não encontramos características morfológicas que possibilitassem a diferenciação das espermatogônias primárias e secundárias com relação ao tamanho, à organização nuclear ou à presença de organelas citoplasmáticas.

Na maioria dos vertebrados são descritos dois tipos de espermatogônias, designadas espermatogônias primárias ou "A" e espermatogônias secundárias ou "B" (DYM & FAWCETT, 1970). Estudos mais detalhados sobre estas células em anfíbios (RASTOGI *et al.*, 1988), mostraram que existem dois tipos de espermatogônias primárias, designadas "pálidas" e "escuras", com base no aspecto nuclear. As espermatogônias primárias são células pouco freqüentes (RASTOGI *et al.*, 1988) e talvez por isso não foram encontradas no presente estudo. Isto nos faz supor que as espermatogônias encontradas no epitélio germinativo do pardal provavelmente sejam espermatogônias secundárias. Além do mais, de acordo com RASTOGI e colaboradores (1988), as espermatogônias secundárias apresentam citoplasma pouco volumoso e eletrodense e núcleo com cromatina condensada, características estas compatíveis com as das espermatogônias aqui descritas.

Algumas vezes, nos cortes ultra-finos, são observadas diferenças de eletrodensidade entre espermatogônias adjacentes, não pudemos, no entanto, concluir se a diferença realmente existe ou se trata-se de um artefato de fixação.

Próximo ao nucléolo das espermatogônias, é freqüente a presença de uma área constituída de grânulos muito pequenos. Devido à sua aparência e proximidade com o nucléolo, supomos que estes grânulos podem representar ribonucleoproteínas em trânsito.

A posição do complexo de Golgi no citoplasma das espermatogônias, sempre basal e nas proximidades da parede, faz acreditar que ele deve estar envolvido na secreção das glicoproteínas da lâmina basal, uma vez que seu papel na síntese destas moléculas é bem estabelecido.

#### 4.6. ESPERMATÓCITOS

A classificação dos espermátocitos ao nível ultra-estrutural foi feita com base principalmente nos estádios estipulados para o rato por SOLARI (1969), uma vez que não encontramos trabalhos que se referissem à meiose em aves. Devido à escassez de trabalhos que definam os estágios da meiose em aves ao microscópio óptico, e relacionando-os ao nível ultra-estrutural, a caracterização dos espermátocitos foi muito dificultada, sendo necessários estudos posteriores mais detalhados a fim de esclarecer muitos aspectos ainda desconhecidos ou duvidosos.

No presente estudo, encontramos apenas os espermátocitos em prófase I, o que era de se esperar, uma vez que esta fase é muito longa quando comparada com as demais fases da meiose.

Os espermátocitos que apresentaram cromossomos em início de condensação foram classificados como estando em leptóteno, já que este fenômeno é característico desta fase inicial da prófase (SOLARI, 1969).

No rato (SOLARI, 1969), os complexos sinaptonêmicos são encontrados do zigóteno até o médio paquíteno. A condensação dos autossomos associados aos complexos sinaptonêmicos é maior no paquíteno inicial, decresce no médio paquíteno e é mínima no paquíteno tardio, quando os complexos sinaptonêmicos não são mais observados (SOLARI, 1969). Em analogia com esta descrição formulada para espermátocitos de rato, achamos que, no pardal, os espermátocitos contendo complexos sinaptonêmicos encontram-se em zigóteno ou em paquíteno inicial ou médio e, os espermátocitos com cromossomos mais descondensados, contendo algumas regiões lineares mais eletrodensas, encontram-se em paquíteno tardio. As regiões lineares eletrodensas são provavelmente remanescentes dos complexos sinaptonêmicos.

Ainda em analogia à prófase meiótica no rato, as células contendo cromossomos bastante condensados associados ao envólucro nuclear foram designadas como estando em diacinese.

É muito comum, no epitélio germinativo do pardal, a presença de um tipo muito peculiar de espermátocito contendo cromossomos mais condensados do que os espermátocitos em zigóteno ou paquíteno e menos condensados do que os cromossomos de espermátocitos em diacinese. Acreditamos que estas células encontrem-se em diplóteno, e sua abundância entre os espermátocitos sugere que esta fase apresente uma duração mais longa, entre as fases da prófase I.

Os espermátocitos secundários não foram identificados, possivelmente apresentarem um tempo de duração muito curto, logo completando a segunda divisão meiótica e originando as espermátides (PEREY *et al.*, 1961).

#### 4.7. O CORPO REDONDO

Um fato muito característico da espermatogênese de Passer domesticus é a presença de uma estrutura esférica muito eletrodensa no interior do núcleo dos espermátocitos primários em prófase. Esta estrutura é observada em todos os estádios da prófase, com exceção do leptóteno e designada de corpo redondo. Embora o corpo redondo não tenha sido visualizado no leptóteno, não podemos afirmar se ele está ou não presente nesta fase, sendo necessário para isso a confecção de cortes seriados.

A presença de uma estrutura esférica associada ao nucléolo tem sido descrita em células germinativas masculinas de uma série de espécies sob designações diferentes (DRESSER & MOSES, 1980; SOLARI, 1970; KNIBIEHLER et al., 1981; MIRRE & KNIBIEHLER, 1985; SCHULTZ et al., 1984). O termo corpo redondo ("round body") é uma das terminologias utilizadas para descrever esta conspícua estrutura esférica (SCHULTZ et al., 1984).

No presente estudo encontramos muitas similaridades morfológicas entre a estrutura esférica dos espermátocitos de pardal com o corpo redondo descrito para espermátocitos e espermátides de rato (SCHULTZ et al., 1984). Entretanto, comparações detalhadas entre estas estruturas requerem um nível superior de informações do que as obtidas aqui. O corpo redondo dos espermátocitos de rato ocorrem em fases semelhantes às do pardal, sendo visualizado também em espermátocitos secundários e espermátides iniciais (SCHULTZ et al., 1984), o que não parece ser o caso do pardal. Outra semelhança entre esta estrutura esférica dos espermátocitos do Passer domesticus e o corpo redondo descrito na espermatogênese do rato é o aspecto anelado que ela assume no diplóteno, quando encontra-se bem saliente.

SCHULTZ e colaboradores (1984) verificaram que o corpo redondo apresenta-se associado com a região granular do nucléolo e com grânulos de ribonucleoproteína. Estudos citoquímicos (SOLARI, 1969 e SCHULTZ et al., 1984) revelam que o corpo redondo contém pouco ou nenhum DNA e RNA, no entanto, através do uso da técnica do PTA, verificou-se que ele é rico em proteínas básicas não histônicas. Para estes autores a presença do corpo redondo está relacionada com a alta atividade nucleolar, sugerindo que esta organela pode estar envolvida com a produção de RNAr.

#### 4.8. MASSAS CITOPLASMÁTICAS DENSAS

Massas citoplasmáticas densas são encontradas em espermatogônias e espermatócitos em prófase I, localizando-se geralmente nas proximidades do núcleo. Nas espermatogônias, as massas citoplasmáticas densas são menos volumosas que nos espermatócitos, alcançando seu volume máximo durante o zigóteno ou paquíteno. Estas massas são formadas por estruturas aproximadamente esféricas que apresentam aspecto granular, muito semelhante aos dos polissomos encontrados na sua periferia. A localização perinuclear e a íntima associação com os poros nucleares indicam que as massas citoplasmáticas sejam constituídas de material nuclear ou nucleolar sendo eliminado para o citoplasma.

A designação "massas citoplasmáticas densas" foi utilizada por KESSEL (1981) para descrever os aglomerados eletrodensos, de constituição ribonucleoprotéica encontrados em espermatócitos de Drosophila melanogaster. Este autor demonstrou uma origem nucleolar para estas massas, origem esta, que coincide com o período de síntese de RNAr durante a espermatogênese. Devido a correlação das massas citoplasmáticas densas com a formação das lamelas anuladas, KESSEL (1981) sugeriu que estas últimas poderiam estar envolvidas na união e ativação do material ribonucleoprotéico em polissomos funcionais.

Diversos estudos mostram que a síntese de RNA, em vários animais, aumenta intensamente no início da prófase até o paquíteno, quando praticamente cessa, não ocorrendo síntese de RNAr em espermátides iniciais, onde por sua vez, a síntese protéica ainda ocorre (KESSEL, 1981; TAKEUCHI & TAKEUCHI, 1990). Com base nestes estudos, parece que a maioria ou todo RNA necessário durante a espermiogênese é sintetizado nos espermatócitos primários.

Apesar de não existirem dados sobre a síntese de RNAr durante a espermatogênese do pardal, e não dispormos de informações sobre natureza química das massas citoplasmáticas aqui descritas, com base nas informações acima citadas, somos levados a supor que as massas citoplasmáticas densas provavelmente são constituídas de ribonucleoproteínas produzidas em grande quantidade pelas espermatogônias e espermatócitos primários, e transportadas para o citoplasma através dos complexos de poros arranjados em domínios pelo envólucro nuclear. As áreas ricas em pequenos grânulos encontradas no núcleo destas células podem representar reservatórios deste material. Sabemos contudo, que a constituição química das massas citoplasmáticas densas e sua relação com as lamelas anuladas precisam ser melhor evidenciadas nesta espécie.

#### 4.9. ESTÁDIOS DE DIFERENCIAÇÃO ESPERMÁTICA

No presente estudo, foram estabelecidos seis estádios de diferenciação espermática: E1, E2, E3, E4, E5 e E6, representados no esquema 3. Estes estádios de diferenciação foram estabelecidos para fins didáticos com o objetivo de facilitar a compreensão dos processos envolvidos na espermiogênese e facilitar estudos futuros. É preciso ter em mente, no entanto, que os eventos básicos da espermiogênese são fenômenos contínuos e sua organização em períodos estanques pode ser enganosa.

A classificação da espermiogênese em estádios tem sido feita por muitos autores nos mais diversos grupos animais. Ao nível de microscopia de luz, uma das características mais evidenciadas nestas classificações é o grau de desenvolvimento do acrossomo, utilizando-se para isto a técnica do PAS. Além de muito utilizada em mamíferos (LEBLOND & CLERMONT, 1952a), tal técnica também foi empregada em algumas espécies de aves, como o canário (CLERMONT, 1958) e o galo doméstico (CAVAZOS & MELLAMPY, 1954; GUNAWARDANA, 1977).

O grau de compactação cromatínica observado ao microscópio eletrônico foi a principal característica utilizada na classificação das espermátides do pardal em seis estádios, sendo posteriormente correlacionado com os preparados ao microscópio óptico. Durante a espermiogênese, verificamos que, com o decorrer da condensação, a cromatina se organiza formando padrões típicos muito regulares. Devido a isto acreditamos que este seria um bom parâmetro para a classificação das espermátides, sendo muito útil na determinação da idade relativa das células.

#### 4.10. COMPACTAÇÃO CROMATÍNICA

A compactação cromatínica é imprescindível para os espermatozóides, pois possibilita que seu DNA seja empacotado de forma segura e econômica, facilitando o seu transporte e contribuindo na eficácia dos gametas masculinos (AFZELIUS, 1970).

Não existe um padrão de condensação cromatínica geral a todas as espécies, sendo este evento específico de cada grupo de organismos (PHILLIPS 1974).

No pardal, a condensação cromatínica parece iniciar na fase 2 de diferenciação espermática, quando começam a ser observados no núcleo alguns grânulos esparsos de pequeno diâmetro. A região esférica encontrada no núcleo destas espermátides é semelhante à região encontrada em espermátides de coelho (PHILLIPS, 1974) e rato (SPRANDO & RUSSEL, 1987) e designada como nucléolo. Nas E3, a compactação cromatínica é mais facilmente observada pois o núcleo apresenta-se totalmente preenchido por grânulos, dispostos num arranjo muito

uniforme. Com o decorrer da compactação, estes grânulos se fundem, formando cordões espessos (E4), os quais, por sua vez se agregam, restando no núcleo apenas pequenas regiões eletrolúcidas (E5), que com o término da compactação desaparecem (E6).

Os grânulos ou cordões cromatínicos se distribuem homogêneamente por todo o núcleo, não existindo áreas preferenciais onde a condensação é mais acentuada como ocorre na espermiogênese de de alguns peixes (SPRANDO & RUSSEL, 1987; LOU & TAKAHASHI, 1989) e insetos (FOLLIOT & MAILLET, 1970).

A presença de cordões cromatínicos espessos bastante eletrodensos, arranjados regularmente, confere ao núcleo das E4 uma aparência geométrica muito peculiar. A formação de padrões geométricos devido ao modo de organização cromatínica, durante a compactação, é muito comum, sendo descrita em espermátides de muitos organismos, principalmente entre os insetos (CHEVALLIER, 1970; DALLAI, 1970; FOLLIOT & MAILLET, 1970 e KESSEL, 1970).

Outros passeriformes estudados (FAWCETT *et al.*, 1971; KONDO, 1989) apresentam arranjos cromatínicos muito semelhantes aos descritos para o pardal, sendo provável que a compactação cromatínica seja um evento muito uniforme dentro da espermiogênese do grupo.

#### 4.11. SUBSTITUIÇÃO DAS PROTEÍNAS HISTÔNICAS POR PROTAMINAS

A compactação que a cromatina sofre durante a espermiogênese geralmente está associada com alterações químicas, sendo freqüente durante este processo a substituição das proteínas histônicas por proteínas ricas em aminoácidos básicos, as protaminas (ALFERT, 1956; BLOCH & BRACK, 1964; MELLO & VIDAL, 1977 e TABOGA & DOLDER, 1990).

Em aves a substituição por protaminas foi detectada no galo (PLA, 1981) e protaminas de 4 espécies de não passerifor mes foram caracterizadas por CHIVA e colaboradores (1987). Não existem, contudo, dados sobre a substituição das proteínas histônicas por protaminas em passeriformes.

No presente estudo, empregamos a técnica do Azul de Toluidina à pH 4.0 para verificar se tal fato ocorre. Os diferentes padrões de basofilia, resultantes ao tratamento deste corante, têm sido usados para indicar a disponibilidade de grupamentos fosfatos do DNA (MELLO & VIDAL, 1974; MELLO & VIDAL, 1977 e TABOGA, 1990).

A utilização desta técnica se baseia no fato de que o Azul de Toluidina é um corante catiônico que tem a propriedade de corar certos elementos celulares ou histológicos com nuances diferentes da solução corante (LISON, 1960). Em outras palavras o substrato corado poderá apresentar pico de absorção espectral deslocado para comprimentos de onda mais curtos (LISON, 1960 e VIDAL, 1987).

Esta alteração do pico de absorção está relacionada com a quantidade de moléculas do corante que se ligam ao substrato, acarretando, provavelmente, formação de dímeros, trímeros ou tetrâmeros (LISON, 1960; MELLO, 1976; VIDAL, 1987). No DNA praticamente puro, devido à grande quantidade de grupamentos fosfatos disponíveis, uma quantidade proporcional de moléculas de azul de toluidina a ele se ligam acarretando a formação de polímeros do corante, o que é responsável por uma coloração violeta (metacromasia  $\lambda = 550$ ) (MELLO, 1976; VIDAL, 1987). Quando o DNA apresenta-se totalmente associado com protaminas, poucos grupamentos fosfatos encontram-se disponíveis, e conseqüentemente poucas moléculas de Azul de Toluidina a ele se ligam, não havendo um empilhamento destas moléculas. Isso resulta uma coloração esverdeada (ortocromasia,  $\lambda = 620$ ) (MELLO, 1976 e VIDAL, 1987).

Através do tratamento pelo Azul de Toluidina à pH 4.0 verificamos que os núcleos das espermátides finais (E5 e E6) coram-se em verde, apresentando-se ortocromáticos, o que indica a presença de protaminas complexadas ao DNA.

O núcleo das espermátides iniciais (E1 e E2) apresentam metacromasia intermediária pois seus núcleos coram-se em violeta azulado. Este padrão de basofilia reflete a presença de quantidades de proteínas associadas ao DNA num modo de complexação que possibilita a ligação de moléculas do corante próximas, acarretando certo empilhamento. Os núcleos das espermátides E3 demonstram a mesma coloração apresentada pelas espermátides iniciais, embora mais intensa. Este aumento na intensidade da coloração é devido, provavelmente, ao maior grau de compactação cromatínica encontrado nesta fase, quando comparado com as fases anteriores de diferenciação.

Na fase 4 de maturação, os núcleos voltam a apresentar uma coloração violeta azulada menos intensa. Uma vez que, nesta fase o grau de compactação, é maior, acreditamos ser este padrão de basofilia resultante da transição da cromatina, a qual talvez se apresenta parcialmente associada com proteínas histônicas e parcialmente associada com protaminas. Com bases nestas informações, somos levados a pensar que as E4 representam um período de transição da composição cromatínica.

#### 4.12. FORMAÇÃO DO ACROSSOMO

Como citado anteriormente, o desenvolvimento do acrossomo tem sido muito usado para estabelecer os estádios de diferenciação espermática em diversos animais. CLERMONT e LEBLOND (1958), por exemplo, utilizando a técnica do PAS no estudo da espermiogênese em vários mamíferos, dividiram este processo em quatro fases, de acordo, principalmente, com o desenvolvimento acrossomal. A primeira fase, é a fase Golgiana, que recebe este nome devido ao papel primordial que o complexo de Golgi nela desempenha; a segunda é designada fase do capuz, pois neste período o acrossomo envolve o núcleo formando uma estrutura convexa

semelhante a um capuz; o início da terceira fase, a fase acrossomal, é determinado pela orientação do acrossomo em direção à membrana basal; na última fase, dita fase de maturação, o acrossomo completa seu desenvolvimento (CLERMONT & LEBLOND, 1958).

Ao analisarmos a formação do acrossomo no pardal estabelecemos uma correlação dos eventos envolvidos neste processo com as fases previamente estabelecidas por CLERMONT e LEBLOND (1958). Verificamos que as espermátides E1 correspondem à fase golgiana do desenvolvimento, uma vez que, nelas o complexo de Golgi perinuclear apresenta-se bem saliente, embora a vesícula acrossomal ainda não seja observada. Na segunda fase de diferenciação acrossomal (E2), surge a vesícula acrossomal, que aumenta progressivamente de tamanho. Esta organela pré-acrossomal situa-se em uma concavidade nuclear, e não em uma convexidade, e mesmo com o decorrer do seu desenvolvimento ela não envolve o núcleo formando um capuz. Semelhante ao que ocorre em mamíferos, na fase acrossomal (E3), a espermátide se direciona com a vesícula acrossomal voltada para a lâmina basal. Este evento é concomitante com o deslocamento do citoplasma para regiões caudais e uma maior interação com a célula de Sertoli. Na última fase do desenvolvimento (E4, E5 e E6), ocorrem processos de maturação, incluindo o grande alongamento e alterações na forma acrossomal, como o surgimento da crista espiral, resultando por fim num acrossomo maduro.

Em mamíferos (PHILLIPS, 1974) e mesmo em algumas aves, como o periquito *Melopsitacus undulatus* (HUMPHREYS, 1975) e o galo doméstico (GUNAWARDANA & SCOTT, 1977), uma das primeiras indicações da formação do acrossomo é o surgimento de uma estrutura aproximadamente esférica, o grânulo acrossomal, que a princípio não estabelece contato direto com o núcleo. No pardal, ao contrário, o início da formação do acrossomo é caracterizado pelo surgimento de uma estrutura semi-esférica em contato direto com o núcleo, a vesícula acrossomal.

Um complexo de Golgi bem desenvolvido, com inúmeras vesículas, encontra-se associado à vesícula acrossomal desde o seu surgimento até a fase acrossomal, quando o citoplasma é direcionado para regiões caudais. Sabe-se da espermiogênese em diversas espécies, principalmente no rato (CLERMONT *et al.*, 1981), que o complexo de Golgi é de vital importância na formação do acrossomo, estando envolvido no processamento da maioria, senão todas, as enzimas acrossomais. Como a partir da fase 3 da espermiogênese o complexo de Golgi não é mais observado na periferia da vesícula acrossomal, acreditamos que neste período o conteúdo acrossomal já esteja formado.

Logo no início do surgimento da vesícula acrossomal (E2), verifica-se que seu conteúdo apresenta áreas de eletrodensidades distintas. A área de maior eletrodensidade localiza-se mais internamente e próxima ao núcleo, sendo observada em todas as fases de diferenciação, com exceção das E6, e aumenta progressivamente de volume, acompanhando a forma da vesícula acrossomal. Áreas de eletrodensidade diferentes foram evidenciadas por FAWCETT e colaboradores (1971), em espermátides de um passeriforme, e KONDO e colaboradores (1988) usaram o termo grânulo acrossomal para designar a área mais eletrodensa.

Nas espermátides E3, nota-se no interior do grânulo acrossomal uma região esférica ainda mais eletrodensa. Essa região é observada mesmo nos cortes

semifinos, onde aparece como um ponto escuro. Não encontramos referências a esta região, na literatura consultada, e a designamos de grânulo acrossomal interno. Acreditamos que estas áreas de eletrodensidades diferentes correspondam a níveis progressivos de condensação do material acrossomal durante a sua maturação.

Para FAWCETT e colaboradores (1971) o fato da eletrodensidade da área menos eletrodensa diminuir à medida que seu volume aumenta, sugere que durante a maturação acrossomal este já ocorrendo uma perda de água e a formação de áreas com eletrodensidades diferentes, possivelmente reflete diferenças na hidratação.

As espermátides finais E6 ou espermatozóides possuem um acrossomo bastante longo, com comprimento maior que o do núcleo, cônico, espiral contendo a crista espiral. Esta morfologia acrossomal, descrita inicialmente por FURIERI (1963), é peculiar dos passeriformes.

#### 4.13. DESENVOLVIMENTO E ORGANIZAÇÃO DA CAUDA

Apesar de não terem sido obtidos cortes que indicassem claramente o início do desenvolvimento do flagelo nas E1, é freqüente nas proximidades destas células a presença de um axonema flagelar, em corte transversal. Isso é um indício de que nesta fase o flagelo já esteja sendo formado, além do mais, outros estudos revelam que o flagelo começa a ser formado muito cedo na espermiogênese (PHILLIPS, 1974 e SOTELLO & TRUJILLO-CENÓZ, 1958).

O desenvolvimento da cauda nos espermatozóides do pardal é muito semelhante ao que ocorre em mamíferos (PHILLIPS, 1974). Nas espermátides iniciais (E2) o "annulus" é encontrado próximo do centríolo, mas com o decorrer da diferenciação, ele migra para regiões distais da célula. O deslocamento do "annulus" para regiões terminais é acompanhado da organização das mitocôndrias e do feixe de microtúbulos ao redor do axonema, formando a peça intermediária. Como a peça intermediária nestes espermatozóides é extremamente longa, o "annulus" sofre um deslocamento muito maior do que o observado em espermátides de mamíferos (PHILLIPS, 1974). Este deslocamento é, aparentemente, um processo muito rápido, uma vez que inicia nas E3 e as E4 já apresentam a peça intermediária formada.

Como evidenciado por SOTELLO & TRUJILLO-CENÓZ (1958), o desenvolvimento da cauda dos espermatozóides de Passer domesticus é marcado pelo desaparecimento do centríolo proximal.

A proximidade do complexo de Golgi do flagelo em desenvolvimento é evidente principalmente nas espermátides iniciais, e esta organela possivelmente contribui com membranas necessárias para o crescimento flagelar.

A cauda das espermátides finais ou espermatozóides é muito longa e helicoidal, como pode ser observado em microscopia de contraste de fase, nos cortes corados com Hematoxilina-Eosina e cortes semifinos. Ao MET, verifica-se que

ela é constituída pelo axonema com padrão usual 9 + 2, pelas 9 fibras densas reniformes, associadas à cada dupla de microtúbulos, e pela mitocôndria única, bastante longa, fazendo um trajeto helicoidal ao redor do axonema. Este padrão de organização é encontrado por todo o comprimento da cauda e já foi descrito para outros passeriformes (FAWCETT *et al.*, 1971; FURIERI, 1963 e KONDO *et al.*, 1988).

Em mamíferos, a porção do espermatozóide imediatamente posterior ao núcleo é designada de colo (FAWCETT, 1965 e PHILLIPS, 1974). No pardal, esta região inicia em uma dupla concavidade nuclear, na qual situa-se o centríolo único, imerso em um material eletrodense, por nós designado material pericentriolar. O material pericentriolar começa a ser formado nas E2, e devido à sua semelhança e continuidade com as fibras densas, acreditamos que ele apresente constituição química semelhante à delas.

Logo abaixo da concavidade nuclear, nas adjacências do centríolo, e ocupando a primeira volta da cauda, encontra-se o material adjunto do centríolo. Este material também surge nas E2 e aumenta progressivamente de tamanho com o decorrer da diferenciação da cauda. SOTELLO e TRUJILLO-CENÓZ (1958) denominaram tal estrutura de anel distal, apesar da diferença de posição com relação à outros componentes homólogos de outros espermatozóides, e NICANDER (1970) o designou de material pericentriolar segmentado. Para HUMPHREYS (1972) esta estrutura é análoga a herança citoplasmática de algumas espécies de mamíferos. Nós atribuímos a esse material a designação de material adjunto do centríolo, dadas as diversas semelhanças encontradas entre ele e o adjunto do centríolo de espermatozóides de insetos (CANTACUZÉNE, 1970).

Em alguns insetos o adjunto do centríolo apresenta natureza granular (CANTACUZÉNE, 1970). Durante seu desenvolvimento são formadas zonas claras, de função desconhecida, ocorrendo, posteriormente, a fusão dos grânulos que o constituem de maneira irregular, de modo que, em determinado período da sua diferenciação, ele aparece como uma massa densa contendo algumas áreas claras (CANTACUZÉNE, 1970). Todas estas características são também comuns ao material adjunto do centríolo dos espermatozóides do pardal.

Em insetos, a abundância de complexos de poros na região nuclear adjacente ao material adjunto do centríolo e sua aparência granular sugerem que este seja constituído de material de origem nuclear (CANTACUZÉNE, 1970). No pardal, o material adjunto do centríolo sofre um grande aumento de volume na fase 3 da diferenciação espermática, quando a quantidade de complexos de poros na região posterior do núcleo, próximo a ele, é abundante. Isso nos chama a atenção para a sua possível origem nuclear. Estudos citoquímicos e enzimáticos que evidenciassem a composição química deste material, em passeriformes, contribuiriam na elucidação da sua função e talvez uma nomenclatura mais adequada pudesse então ser proposta.

Peça intermediária é a região dos espermatozóides localizada entre o colo e o "annulus", e que, na maioria dos mamíferos e de outros vertebrados, é constituída de axonema, fibras densas e mitocôndrias (FAWCETT, 1965; PHILLIPS, 1974). Se utilizadas as características comumente empregadas para definir a organização da cauda do pardal, podemos afirmar que ela é constituída unicamente pela peça intermediária muito longa, não existindo uma região correspondente à peça principal. Ao que sabemos este tipo de organização não foi descrito para

outros espermatozoides, que não os de passeriformes (FAWCETT *et al.*, 1971; FURIERI, 1963 e KONDO *et al.*, 1988).

As fibras densas surgem ao redor do axonema na fase acrossomal e aumentam progressivamente em diâmetro e eletrondesidade à medida que decorre a espermiogênese. Estas estruturas acessórias tem sido descritas para espermatozoides de répteis (FURIERI, 1970), pássaros (FURIERI, 1963 e FAWCETT *et al.*, 1971) e mamíferos (FAWCETT & PHILLIPS, 1970). Estudos bioquímicos revelam que, em mamíferos, elas são compostas de numerosos polipeptídeos (OLSON & SAMMONS, 1980; OKO, 1988) armazenados temporariamente durante o seu desenvolvimento em corpos granulados (CLERMONT *et al.*, 1990).

Em passeriformes, as fibras densas são formadas a partir de uma protuberância do microtúbulo A de cada dupla e parece ocorrer ao mesmo tempo ao longo de toda a extensão da cauda (FAWCETT & PHILLIPS, 1970). As fibras densas encontradas em espermatozoides de passeriformes diferem daquelas dos de mamíferos pois são todas uniformes em seção transversal, e permanecem em contato com as duplas do axonema (FAWCETT & PHILLIPS, 1970). Além destas diferenças, elas apresentam conteúdo aparentemente homogêneo, sem uma distinção entre a região medular e cortical.

#### 4.14. O FEIXE DE MICROTÚBULOS

Os microtúbulos surgem no citoplasma das espermátides no período intermediário de diferenciação (E3), e logo se organizam formando um feixe que descreve um trajeto helicoidal, desde o início da vesícula acrossomal até a cauda. À medida que o citoplasma é direcionado para regiões caudais e a célula alonga (E4 e E5) resta nas espermátides apenas uma pequena área de citoplasma contendo o feixe de microtúbulos. Este feixe se posiciona nas convexidades da célula, acompanhando-lhe a forma helicoidal por quase toda sua extensão, não sendo observado apenas na região proximal do acrossomo.

As espermátides finais (E6) tendem a perder o feixe de microtúbulos que é a princípio protraído, sendo finalmente desligado da espermátide.

Algumas vezes é observado um processo da célula de Sertoli penetrando entre o feixe de microtúbulos e o núcleo da espermátide, tanto em fases mais adiantadas da espermiogênese (E6), como em espermátides ainda em processo de diferenciação (E4). Vesículas contendo citoplasma das espermátides rico em microtúbulos são encontradas no citoplasma da célula de Sertoli, bem como estruturas esféricas eletrodensas muito semelhantes a lisossomos. Estas observações indicam um possível papel desta célula na remoção e fagocitose dos microtúbulos.

Embora a remoção do feixe de microtúbulos ocorra mais freqüentemente quando a espermátide ainda se encontra mergulhada no citoplasma da célula de Sertoli, alguns espermatozoides testiculares contendo microtúbulos são observadas livres na luz do túbulo, onde também são encontradas porções de citoplasma rico

em microtúbulos. Estes fatores sugerem que, no pardal, a eliminação do feixe de microtúbulos acontece preferencialmente no testículo, ao contrário do que ocorre em outros passeriformes, nos quais esta organela é perdida nos ductos deferentes (NICANDER, 1970).

A presença de cisternas de retículo endoplasmático liso entre as fileiras de microtúbulos já foi previamente descrita por FAWCETT e colaboradores (1971) para o tentilhão. Em *Passer domesticus* estas cisternas ocorrem apenas na região caudal das espermátides E6. O papel destas cisternas necessita ser melhor elucidado, mas seu aparecimento no final da maturação indica um possível envolvimento na liberação do feixe.

SOTELLO e TRUJILLO-CENÓZ (1958), estudando o desenvolvimento do flagelo em diversos animais, encontraram nas espermátides do pardal um "sistema fino de túbulos", formando um feixe helicoidal que se estendia da região terminal do núcleo, por quase toda a extensão da cauda, e designaram esta estrutura de membrana ondulante. Desde então, o termo membrana ondulante vem sendo empregado por diferentes autores para designar estruturas diferentes. HUMPHREYS (1972) usou essa terminologia para se referir à mitocôndria dos espermatozóides de aves maduros, HENLEY e colaboradores (1978) caracterizaram a membrana ondulante como sendo uma estrutura tripartida constituída pelo axonema com fibras densas acessórias, pela mitocôndria e pelo feixe de microtúbulos. Membrana ondulante é o termo utilizado para designar a membrana de flagelos de espermatozóides de urodelos (BARKER & BARKER, 1970) e anuros (CAVICHIA & MOVIGLIA, 1986; RASTOGI *et al.*, 1988 e TABOGA, 1990) que liga o axonema a uma estrutura protéica, o bastão axial.

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que não existem semelhanças entre as estruturas dos espermatozóides de pardal designadas como membrana ondulante e a membrana ondulante de espermatozóides de anfíbios, seja com relação à origem, composição, organização ou função. Por isso concordamos com HUMPHREYS (1972) ao afirmar que este termo não é aplicável para descrever qualquer estrutura dos espermatozóides de Oscines.

O feixe de microtúbulos não faz parte dos espermatozóides maduros, mas ao contrário é uma organela passageira que surge durante a diferenciação e provavelmente está envolvida na obtenção da forma destas espermátides. Esta organela é homóloga às "manchettes" encontradas durante a diferenciação espermiática de diversos organismos (MCINTOSH & PORTER, 1967; PHILLIPS, 1974). Acreditamos que o nome mais adequado para descrever esta organela é "manchette" helicoidal, ou simplesmente feixe de microtúbulos.

#### 4.15. OBTENÇÃO DA FORMA DOS ESPERMÁTOZÓIDES

Uma das características mais marcantes dos espermatozóides é sua forma notável e precisa e seu alto grau de organização interna, forma esta particular aos diferentes grupos animais (AFZELIUS, 1970). A forma altamente modificada destas células tem chamado a atenção de muitos pesquisadores e a espermiogênese em diferentes espécies tem sido estudada com o objetivo de investigar os fatores e mecanismos envolvidos na sua morfogênese (FAWCETT *et al.*, 1971; KESSEL, 1967, 1970; MCINTOSH & PORTER, 1967 e MYLES & HEPLER, 1977).

Para algumas espécies foi atribuída à "manchette" um papel preponderante na alongação e forma nuclear (KESSEL, 1967,1970; MCINTOSH & PORTER, 1967; MYLES & HEPLER, 1977; TOKUYASU, 1974), enquanto para outras a obtenção da forma nuclear estaria envolvida principalmente com a compactação cromatínica (FAWCETT *et al.*, 1971; RATNTER, 1972; WEBSTER & RICHARDS, 1977; WEST, 1978). STANLEY e colaboradores (1972), estudando a diferenciação espermática em *Drosophila melanogaster*, relataram a associação de microtúbulos com o envólucro nuclear e postularam que estes microtúbulos poderiam exercer uma função na periferização e condensação da cromatina, e assim influenciar a alongação nuclear.

Dada a forma helicoidal complexa dos espermatozóides de passeriformes, alguns pesquisadores supuseram que investigações do papel dos microtúbulos na morfogênese destas células poderiam ser informativas. FAWCETT e colaboradores (1971) concluíram que no tentilhão *Poephila guttata* os microtúbulos provavelmente não desempenham um papel crucial na obtenção da forma helicoidal, principalmente por dois motivos: primeiro, porque os microtúbulos ainda não são observados na região nuclear quando esta região já começa a sofrer uma suave torção em hélice; segundo porque se o feixe de microtúbulos é responsável pela conversão de um núcleo cilíndrico a uma forma helicoidal devido à constrição, é de se esperar que este feixe ocupe as concavidades da hélice e não as convexidades.

O feixe de microtúbulos surge no citoplasma das espermátides antes do início da alongação e torção em hélice, e logo são observados fazendo um trajeto helicoidal pela célula (E3), que pouco a pouco assume conformação helicoidal, encaixada no feixe de microtúbulos. Os microtúbulos apresentam-se mais organizados nas fases em que a alongação e a forma helicoidal da espermátide tornam-se mais evidentes, sendo eliminados quando a forma final do espermatozóide já foi estabelecida. Esses achados, são aspectos a favor do papel dos microtúbulos na aquisição final da forma.

Observações semelhantes às nossas foram efetuadas por KONDO e colaboradores (1988), que acompanharam detalhadamente o desenvolvimento do feixe de microtúbulos durante a espermiogênese do passeriforme *Lonchura striata* e sua relação com a morfogênese celular. Tais autores verificaram que o feixe de microtúbulos se organiza de tal modo durante o desenvolvimento espermático, que impõem à célula a mesma inclinação que ele apresenta.

O fato do feixe de microtúbulos se localizar nas convexidades da hélice, excluiria a contribuição desta organela na obtenção da forma helicoidal, caso o papel por ela desempenhado fosse gerar forças de contração, mas provavelmente não é esse o mecanismo de ação dos microtúbulos. Estudos recentes tem trazido novas informações sobre o papel dos microtúbulos na movimentação de organelas citoplasmáticas, devido ao descobrimento de proteínas que se ligam aos microtúbulos e a outros componentes celulares, ou se ligam entre microtúbulos adjacentes, promovendo deslizamento, designadas cinesinas (BRADY & PFISTER, 1991; KUO *et al.*, 1991 e WEISS *et al.*, 1991).

A compactação cromatínica durante a espermiogênese do pardal, bem como de outras espécies (PHILLIPS, 1974), apresenta uma íntima associação com o surgimento dos microtúbulos. Nas espermátides do pardal a organização da cromatina em cordões dispostos no sentido da alongação nuclear coincide com o início da alongação, o que nos suscita dúvidas sobre seu envolvimento neste processo.

Os fatores envolvidos na morfogênese acrossomal também em sendo muito discutidos. FAWCETT e PHILLIPS (1971) acreditam que a forma acrossomal é influenciada principalmente por fatores intrínsecos. Isso porque experimentos realizados por estes autores mostram que mudanças na forma acrossomal continuam a ocorrer quando o espermatozóide não se encontra mais associado à célula de Sertoli. Para estes pesquisadores o principal fator envolvido na obtenção da forma helicoidal dos espermatozoides de passeriformes é a mudança na disposição da matriz clara e escura, uma vez que o feixe de microtúbulos não é observado por toda a extensão da região acrossomal.

#### 4.16. ELIMINAÇÃO CITOPLASMÁTICA

Em mamíferos, três métodos tem sido propostos, através dos quais as espermátides reduzem seu citoplasma. Estes métodos incluem: (1) a formação de um corpo residual e sua subsequente degradação e reabsorção pela célula de Sertoli (LEBLOND & CLERMONT, 1952); (2) a formação e degradação de estruturas especializadas conhecidas como complexos tubulobulares (RUSSEL & CLERMONT, 1976; RUSSEL, 1979a, b); e (3) a redução do volume citoplasmático durante as fases de alongação, provavelmente como resultado da perda de água (SPRANDO & RUSSEL, 1987).

Nas espermátides de *Passer domesticus*, o processo de eliminação citoplasmática torna-se nítido na fase 3 da diferenciação, quando ocorre um fluxo antero-posterior de citoplasma e a massa citoplasmática que será eliminada se posiciona ao longo do núcleo e da cauda destas espermátides. No final deste período de diferenciação e dos períodos subsequentes, o resíduo de eliminação citoplasmática permanece associado com a espermátide na porção terminal da cauda, sendo destacado, provavelmente no final da espermiogênese.

O único trabalho que enfoca os processos envolvidos na eliminação do citoplasma em aves, foi realizado por SPRANDO & RUSSEL (1988a), no galo doméstico. Nesta ave e na tartaruga Pseudemys scripta (SPRANDO & RUSSEL, 1988a) o citoplasma é eliminado na região da cabeça, e não na região de junção entre a cabeça e o pescoço como ocorre em mamíferos. No pardal, o citoplasma é eliminado em regiões distais da espermatíde, um modo particular de eliminação citoplasmática ainda não descrito para outros vertebrados.

Grande parte do citoplasma das espermatídes é perdido na forma de resíduo citoplasmático, o citoplasma contendo o feixe de microtúbulos, contudo, é perdido separadamente. Existem então, dois fenômenos diferentes envolvidos da eliminação citoplasmática nesta espécie.

Outra característica muito marcante da eliminação citoplasmática neste animal é que a maior parte dos resíduos citoplasmáticos, e parte do citoplasma contendo microtúbulos são eliminados na luz do túbulo não sendo fagocitados pela célula de Sertoli. Tal fato acarreta um acúmulo de resíduos de eliminação citoplasmática no lúmen do túbulo.

No interior dos resíduos de eliminação citoplasmática observam-se mitocôndrias, complexos de Golgi, lisossomos, além de outras estruturas cuja composição e origem precisa é desconhecida, tais como o material finamente granular.

As lamelas anuladas, originadas nas espermatídes E3 também, são encontradas no interior dos resíduos de eliminação citoplasmática. Estas organelas têm sido descritas durante a maturação de células germinativas masculinas e femininas, em células transformadas e tecidos embrionários (KESSEL, 1981), e possuem três características distintas: (1) são constituídas por pilhas paralelas de cisternas; (2) contendo complexos de poros arranjados periodicamente; e (3) são formadas em associação com componentes fibrilares densos (MERISKO, 1989).

Uma grande diversidade de métodos envolvidos na morfogênese das lamelas anuladas têm sido propostos na literatura para diferentes tipos celulares, tais como a origem a partir da delaminação do envólucro nuclear, a partir do retículo endoplasmático rugoso ou até mesmo a partir do complexo de Golgi (KESSEL, 1990).

Apesar de não termos observado em detalhes a formação desta organela durante a espermatogênese do pardal, verificamos que seu surgimento é precedido por um acúmulo de complexos de poros na região posterior do núcleo, próximo de onde elas serão formadas. O aparecimento das lamelas anuladas é concomitante com um grande aumento do material adjunto do centríolo, que ocorre nas suas adjacências. Além disso estas lamelas são formadas numa fase da espermiogênese em que provavelmente a síntese protéica já foi interrompida.

Embora a função das lamelas anuladas permaneça desconhecida, uma variedade de proposições tem sido feitas, o que pode significar que elas desempenham mais de um papel nas células (KESSEL, 1990).

KESSEL (1981), estudando a formação das lamelas anuladas em espermatócitos de Drosophila melanogaster, propôs a esta organela um papel no processamento e a ativação do RNAr. Outra função proposta é que elas representam um reservatório de complexos de poros para o envólucro nuclear (SPINER & HEMLEBEN, 1982 e STAFSTROM & STAEHELIN, 1984). Uma vez que

é de conhecimento geral que durante a diferenciação espermiática geralmente ocorre uma diminuição dos complexos de poros, os quais estão ausentes na maioria dos espermatozoides, e dado o surgimento das lamelas anuladas num período da espermiogênese no qual a síntese de RNA provavelmente já foi interrompida, as duas funções citadas acima parecem pouco prováveis no caso das espermátides do pardal. Ao nosso ver, uma das hipóteses mais plausíveis para a função destas organelas durante a espermiogênese de Passer domesticus é a que elas representam conjuntos de domínios de poros eliminados durante a maturação espermiática.

#### 4.17. ESPERMATOZÓIDES TESTICULARES

Os espermatozoides de Passer domesticus apresentam forma helicoidal conforme descrito na literatura para os passeriformes oscines. Porém, não encontramos nestas células uma estrutura que possa ser designada membrana ondulante, termo empregado até o momento na descrição dos espermatozoides dos oscines.

#### 4.18. ESPERMIAÇÃO

Como citado anteriormente, espermição é a designação dada ao processo de liberação dos espermatozoides do epitélio seminífero, e consiste de uma série complexa de eventos, na qual a célula de Sertoli desempenha um papel ativo (RUSSEL & CLERMONT, 1976).

Os mecanismos envolvidos neste processo têm sido estudados em mamíferos, principalmente no rato (RUSSEL & CLERMONT, 1976; FLICKNGER & FAWCETT, 1967; ROSS & DOBLER, 1975). Não existem, contudo, estudos que enfoquem os mecanismos envolvidos na espermição em aves.

Em mamíferos as espermátides finais, enquanto terminam sua diferenciação, se soltam da célula de Sertoli, e um processo apical desta última célula, rodeia o resíduo citoplasmático da espermátide, segurando-a (RUSSEL & CLERMONT, 1976). À medida que a espermátide se direciona para o lúmen do túbulo, o resíduo citoplasmático, associado à célula de Sertoli permanece conectado à peça intermediária por um fino processo. O rompimento do resíduo de eliminação

citoplasmática libera a espermátide (RUSSEL & CLERMONT, 1976). Nestes animais, a separação do citoplasma residual é uma parte importante do processo de espermição (RUSSEL & CLERMONT, 1976).

No pardal, as espermátides são liberadas da célula de Sertoli por causa da formação de vacúolos ou invaginações no citoplasma destas células e seu subsequente rompimento. Aparentemente não existe liberação de partes do citoplasma da célula de Sertoli durante este processo, como é observado em Hydrolagus collei, um peixe cartilaginoso (STANLEY, 1990).

Diferente do que ocorre em mamíferos (RUSSEL & CLERMONT, 1976), no pardal, o destacamento dos resíduos citoplasmáticos não é um fator limitante na espermição, pois estes resíduos são eliminados na região caudal das espermátides para a luz do túbulo, não permanecendo associados com a célula de Sertoli.

Não observamos, durante a espermiogênese do pardal, a formação de estruturas semelhantes aos complexos tubulobulbares descritos para os espermatozoides de ratos (RUSSEL & CLERMONT, 1976), estruturas estas cuja dissolução se relaciona com o processo de espermição.

Atualmente, vários autores concordam que especializações da célula de Sertoli são importantes na espermição (STANLEY, 1990; SPRANDO & RUSSEL, 1987, 1988b). Em vertebrados, são encontrados filamentos de actina interpostos entre a membrana da célula de Sertoli e as cisternas de retículo endoplasmático liso que ficam paralelas a esta membrana. Estas estruturas compõem as especializações citoplasmáticas (SPRANDO & RUSSEL, 1987) encontradas em células de Sertoli de peixes condreíctes (STANLEY & LAMBERT, 1985), anfíbios (SPRANDO & RUSSEL, 1987), répteis e não passeriformes (SPRANDO & RUSSEL, 1987, 1988b), e descritas no presente trabalho para o pardal.

As especializações citoplasmáticas apresentam características peculiares entre os diversos grupos de animais e as funções propostas para esta organela são numerosas. Acredita-se que estas estejam envolvidas na orientação, movimentação, adesão das espermátides na célula de Sertoli e, conseqüentemente, desempenham funções na espermição (SPRANDO & RUSSEL, 1987). Estudos futuros são necessários para esclarecer melhor a organização ultra-estrutural das especializações citoplasmáticas neste animal e seu envolvimento com espermição.

O aumento de eletrodensidade no citoplasma basal da célula de Sertoli, enquanto o citoplasma na periferia das espermátides apresenta-se pouco eletrodense, sugere um acúmulo de fluido no citoplasma apical. O aumento de fluidez do citoplasma apical da célula de Sertoli, tem sido observado durante a espermição de mamíferos (VITALE-CALPE & BURGOS, 1970) e peixes condreíctes (STANLEY, 1990), embora as implicações deste fenômeno permaneçam obscuras.

A função dos elementos do citoesqueleto no processo de espermição tem sido estudada em ratos, através do uso de agentes que afetam a ação dos microtúbulos (RUSSEL et al., 1989). Tais estudos evidenciam um papel ativo para os microtúbulos da célula de Sertoli na movimentação das espermátides para posições mais próximas ao lúmen.

**CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

1. O testículo de Passer domesticus é constituído basicamente por uma massa anastomosada de túbulos seminíferos, envolta pela cápsula testicular.
2. Nos animais estudados os tubúlos seminíferos apresentaram epitélio germinativo com várias células de altura, e diversas fases de maturação.
3. As espermatogônias são células abundantes, que apresentam citoplasma pouco volumoso, núcleo com cromatina pouco compactada e nucléolo saliente.
4. Os espermátocitos primários em prófase são encontrados em grupos no mesmo período de diferenciação, sendo classificados com base no grau de condensação cromossômica, nas subfases da prófase.
5. Um fato particular da espermiogênese do pardal é a presença de uma estrutura esférica no nucleoplasma dos espermátocitos, o corpo redondo, cuja função e composição permanece desconhecida.
6. Aglomerados de pequenas estruturas esféricas granulares, designados massas citoplasmáticas densas, são encontrados nas espermatogônias e espermátocitos primários. Estas massas provavelmente representam material nuclear sendo eliminado para o citoplasma.
7. O desenvolvimento espermático é marcado pelo arranjo das espermátides em feixes, que se distribuem regularmente no interior do túbulo.
8. A disposição dos feixes de espermátides no epitélio germinativo confere, aos túbulos seminíferos um padrão radial de organização.
9. Dentro do feixe são encontradas espermátides em diferentes fases de maturação, com as mais maduras localizadas mais profunda e internamente.
10. A alteração no grau de compactação cromatínica, bem como a análise de outras características morfológicas, resultou na classificação das espermátides em seis fases de diferenciação: E1, E2, E3, E4, E5 e E6.
11. O processo de compactação cromatínica é responsável pelo surgimento de padrões regulares de organização, seja na forma de grânulos ou cordões.
12. Concomitantemente com a compactação cromatínica e o alongamento nuclear ocorre a substituição das proteínas histônicas por protaminas, sendo este evento caracterizado por uma fase de transição do conteúdo cromatínico, representada pelo estágio 4 de diferenciação.
13. O acrossomo desenvolve-se a partir da vesícula acrossomal, que paulatinamente alonga e espiraliza, resultando em uma estrutura cônica na qual se destaca a crista espiral. Durante a maturação o conteúdo acrossomal apresenta níveis diferentes de condensação.
14. O desenvolvimento flagelar inicia muito cedo na diferenciação espermática e é marcado pelo deslocamento distal do "annulus", pelo desaparecimento de um dos centríolos, e surgimento de um material finamente granular, aqui designado material adjunto do centríolo.
15. Importância fundamental no desenvolvimento espermático é atribuída ao feixe de microtúbulos, que parece atuar na obtenção da forma helicoidal dos espermátóides, sendo homólogo à "manchette" descrita para outras espécies.

16. Dois mecanismos principais estão envolvidos na redução do citoplasma das espermatídes: (1) perda de um resíduo de eliminação citoplasmática na região terminal da cauda das espermatídes finais e (2) perda de pequenos restos de citoplasma contendo o partes do feixe de microtúbulos.
17. Os espermatozóides testiculares são células muito alongadas, helicoidais compostas de: acrossomo cônico espiral, núcleo compacto e cauda constituída pelo axonema com padrão 9 + 2, nove fibras densas acessórias contínuas e uma mitocôndria perfazendo um trajeto helicoidal ao redor do axonema.
18. A morfologia dos espermatozóides de Passer domesticus é típica dos passeriformes oscines, grupo ao qual ele pertence.
19. Os espermatozóides testiculares não apresentam nenhuma estrutura que possa ser denominada de membrana ondulante, termo empregado até o momento na descrição dos espermatozóides de oscines.
20. As células de Sertoli estão relacionadas com processos metabólicos, como reabsorção. Fornecem ainda um suporte mecânico para as espermatídes em desenvolvimento, estando relacionadas com a movimentação destas no interior do epitélio germinativo e respectiva liberação no momento adequado.
21. A espermição neste animal é marcada pela formação de vacúolos no interior da célula de Sertoli e o subseqüente rompimento destes.

**RESUMO**

## 6. RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal analisar os processos envolvidos na espermatogênese de um passeriforme, Passer domesticus. Para isso foram empregadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, técnicas de microscopia de luz, bem como dois testes citoquímicos.

A análise dos cortes em parafina revelam que o testículo deste animal é constituído de uma massa de túbulos seminíferos anastomosados contendo epitélio germinativo com células em diversos graus de maturação. As espermatogônias formam uma camada basal neste epitélio e acima delas são encontrados grupos de espermátocitos primários. Ao nível ultra-estrutural podemos verificar que os espermátocitos primários apresentam aspectos nucleares muito peculiares, permitindo sua classificação nas subfases da prófase I. Os estágios da prófase I, neste animal, são marcados pela presença de uma estrutura intra-nuclear esférica, o corpo redondo, e massas citoplasmáticas densas.

O posicionamento das espermátides no interior do túbulo seminífero, e seu modo de interação com a célula de Sertoli, são responsáveis pela formação de feixes, organizados radialmente no interior do túbulo.

Com bases em diversas características morfológicas, principalmente o grau de compactação cromatínica, as espermátides foram classificadas em 6 estádios de diferenciação: E1, E2, E3, E4, E5 e E6.

Em cortes ultrafinos verifica-se que o grau de compactação cromatínica resulta no surgimento de padrões nucleares regulares e o tratamento pelo Azul de Toluidina á pH 4.0 indica a substituição das proteínas histônicas por protaminas.

O desenvolvimento do flagelo e acrossomo iniciam-se muito cedo durante a espermiogênese, em regiões adjacentes e em associação com um complexo de Golgi bem desenvolvido, e o feixe de microtúbulos se relaciona a diversas mudanças celulares, contribuindo para obtenção da forma final dos espermatozóides.

Os espermátocitos testiculares são células helicoidais, com acrossomo cônico bastante alongado, onde se destaca a crista espiral. Eles apresentam núcleo compacto e cauda extremamente longa. Na cauda, além do axonema com fibras densas acessórias, destaca-se a mitocôndria muito longa, fazendo um trajeto helicoidal ao redor do axonema.

As células de Sertoli desempenham um papel fundamental na espermatogênese do pardal, fornecendo um suporte mecânico e estando envolvidas no processo de espermição.

## **SUMMARY**

## 7. SUMMARY

This study was undertaken to analyse the process of spermatogenesis of a passerine bird, Passer domesticus. Preparation were made for cytochemical analysis and morphological studies with light and electron microscopes.

Sections of paraffin embedded testes revealed its organization in the form of branching seminiferous tubules, with cells of the germinative epithelium in various maturation stages. Spermatogoniae form a basal layer, overlaid by primary spermatocytes. Typical nuclei permitted the classification of these cells into sub-stages of prophase I, in which the intra nuclear round body and dense cytoplasmic masses were also observed.

The positioning of the spermatids in the seminiferous tubules and their envelopment by the Sertoli cell, lead to their organization into bundles.

Spermatids were grouped into six stages (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) according their morphological characteristics, especially the degree of chromatin condensation.

Ultrathin sections revealed that nuclear compactation occur in regular, well established patterns, while the Toluidine Blue staining at pH 4.0 indicated the substitution of histones by protamines.

Early development of the acrosome and the flagellum occur adjacent to a well developed Golgi complex. The microtubular sheath is related to various cellular events, probably contributing to the final shape of the spermatozoa.

Spermatozoa are helically coiled cells with a long conical acrosome, marked by a spiral keel, a compact nucleus and a very long tail. In the tail, the axoneme is surrounded by dense accessory fibers, and a long helically arranged mitochondrion.

Sertoli cells are of fundamental importance in spermiogenesis. They contribute with the mechanical support, metabolic processes such as reabsorption and partipate in spermiation.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZELIUS, B.A. Thoughts on comparative spermatology. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. N. York, Academic Press, 565-576. 1970
- ALFERT, M. Cytochemical differentiation of the nuclear proteins during spermatogenesis in salmon. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 109-113. 1956.
- ANDERSON, W.A.; WEISSMAN, A. & ELLIS, R.A. Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. *J. Cell Biol.*, 32: 11-26, 1986.
- ASA, C.; PHILLIPS, D.M. & STOVER, J. Ultrastructure of spermatozoa of Crested Tinamou. *J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res.*, 94: 170-175, 1986.
- ASA, C.S. & PHILLIPS, D.M. Nuclear shaping in the spermatids of Thai Leaf Frog *Megophrys montana*. *Anat. Rec.*, 220: 287-290, 1988.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G. & FALCHETTI, E. Spermatozoa and relationships in Paleognath birds. *Biol. Cell*, 71: 209-216. 1991.
- BAILEY, R.E. Accessory reproductive organs of the male fringillid birds: seasonal variations and response to various sex hormones. *Anat. Rec.*, 115: 1-19. 1953.
- BAKST, M.R. & HOWARTH Jr, B. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa examined with transmission electron microscope. *Biol. Reprod.*, 12: 632-640, 1975.
- BALHORN, R. A model for the structure of the chromatinin mammalian sperm. *J. Cell Biol*, 93: 298-305. 1982.
- BALLOWITZ, E. Zur Lehre von der Struktur der Spermatozoen. *Anat. Anz.*, 1: 363-376, 1886. Cit. em HENLEY *et al.* 1978, Op. Cit.
- BALLOWITZ, E. Untersuchungen über die Struktur der Spermatozoen, zugleich ein Beitrag zur Lehre von feineren Bau der Conotroktilen Elemente, Theil 1. Die Spermatozoen der Vögel. *Arch. Mikrosk. Anat. EntwMech.*, 32: 401, 1888. Cit. em HENLEY *et al.* (1978) Op. cit.
- BARKER, K.R. & BAKER, C.L. Urodele Spermateleosis: a comparative electron microscopy study. In: B. Baccetti. *Comparative spermatology- Proceedings of the International Symposium*. New York. Academic Press, 93-119. 1970.

- BARTHOLOMEW, G. A. The effect of light intensity and day length on the reproduction in English sparrow. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, 101: 433-476. 1949
- BEDFORD, J. M. Changes in fine structure of the rabbit sperm head during their passage through the epididymis. *J. Anat.*, 99: 891-899. 1965
- BERGSTROM, B. H. & ARNOLD, J.M. Nonkinetochore association of chromatin and microtubules. *J. Cell. Biol.*, 62: 917-920, 1974.
- BLOCH, D.P. & BRACK, S.D. Evidence for cytoplasmic synthesis of nuclear histone during spermiogenesis in Chortophaga viridi-fasciata (de Geer). *J. Cell Biol.*, 22: 327-342. 1964.
- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. *A textbook of Histology*, 11a. ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1017pp, 1986.
- BRADY, S.T. & PFISTER, K.K. Kinesin interactions with membrane bounded organelles in vivo and in vitro. *J. Cell Sci. (Supl.)*, 14: 103-108. 1991.
- BURGOS, M.H. & FAWCETT, D.W. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad Bufo arenarum Hensel. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2: 223-235, 1956.
- BUSTOS-OBREGON, E. & ESPONDA, P. Ultrastructure of the nucleus of human Sertoli cells in normal and pathological tissue. *Cell Tissue Res.*, 152: 467-475. 1974.
- CANTACUZENE, A. L. Annexe centriolaire du spermatozoïde des insectes. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Sumposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press, 553-563. 1970.
- CAMATINI, P.; FRANCHI, M.E. & CURTIS, I. I. Sertoli cell junctions in human testis: a freeze-fracture and lanthanum tracer study. *J. Submicrosc. Cytol.*, 11: 511-516. 1979.
- CAVICCIA, J.C. & MOVIGLIA, G.A. Fine structure of the testis in the toad (Bufo arenarum Hensel): a Freeze fracture study. *Anat. Rec.*, 203: 463-474, 1982.
- CHEVALIER, P. Le noyau du spermatozoïde et son évolution au cours de la spermiogénèse. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*, B. Baccetti. New York, Academic Press, 499-514. 1970.
- CHIVA, M.; KASINSKY, H. F. & SUBRANA, A. J. Characterization of protamines from four avian species. *FEBS*, 215 (2): 237-240. 1987.

- CLERMONT, Y. Structure de l'épithélium seminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le canard. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 47: 47-66, 1958.
- CLERMONT, Y; LALLI, M. & RAMBOURG, A. Ultrastructural localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase (NAD-Pase), thiamine pyrophosphatase (TPPase), and cytidine monophosphatase (CMPase) in the Golgi apparatus of early spermatids of the rat. *Anat. Rec.*, 201: 613-622. 1981.
- CLERMONT, Y. & LEBLOND, C.P. Spermiogenesis of man, monkey, ram, and others mammals as shown by the "Periodic Acid-Schiff" technique. *Am. J. Anat.*, 96: 229-253. 1955.
- CLERMONT, Y. & LEBLOND, C. P. Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp. Cell Res.*, 15: 438-440.
- CLERMONT, Y.; OKO, R. & HERMO, L. Immunocytochemical localization of the proteins utilized in formation outer dense fibres and fibrous sheath in the rat spermatids: an electron microscope study. *Anat. Rec.*, 227: 447-457. 1990.
- CLERMONT, Y. & TANG, X. M. Glicoprotein syntesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis in the rat. *Anat. Rec.*, 213: 33-43. 1985.
- COOKSEY, E.J. & ROTHWEEL, B. The structure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl (Gallus domesticus). *J. Anat.*, 114 (3): 329-345. 1973.
- CRACRAFT, J. Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *The Auk.*, 98: 681-714, 1981.
- DALLAI, R. The spermatozoon of the arthropoda. XI. Further observations on Collembola. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press. 275-279. 1970.
- DANG, H.R. & GURAYA, S. S. Comparative effects of light and temperature on regressed testis of house sparrow Passer domesticus Linnaeus under laboratory and field conditions. *Proc. Indian Natl. Sci. B. Biol. Sci.*, 52 (2): 153-148. 1987.
- DRESSER, M.E. & MOSES, M.J. Synaptonemical complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (Cricetulus griseus). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining. *Chromosoma*, 76: 1- 22. 1980.
- DUPRAW, L. *Cell and molecular Biology*. Acad. Press. Inc., New York. 1970.

- DYM, M. & FAWCETT, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentalization of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.*, **3**: 308-326. 1970.
- FAWCETT, D.W.; ANDERSON, W.A. & PHILLIPS, D.M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Develop. Biol.*, **26**: 220-251, 1971.
- FAWCETT, D.W. & PHILLIPS, D.M. Observations on the release of spermatozoa and on changes in the head during passage through the epididymis. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **6**: 405, 1969.
- FAWCETT, D.W. & PHILLIPS, D. M. Recent observations on the ultrastructure and development of the mammalian spermatozoon. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press. 13-28. 1970.
- FLICKINGER, C. & FAWCETT, D. W. The junctional specializations of the Sertoli Cells in the seminiferous epithelium. *Anat. Rec.*, **158**: 207-222. 1967.
- FOLLIOT, R. & MAILLET, P. Ultrastructure de la spermiogènese et du spermatozoïde de divers insectes Homoptères. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press. 290-300. 1970.
- FURIERI, P. La morfologia degli spermidi di Fringilla coelebs L. e de Tarentola mauritanica L. Studiata al microscopio elettronico. *Mon. Zool. Ital.*: 159-174. 1963.
- FURIERI, P. Sperm morphology in some reptiles: Squamata and Chelonia. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press. 116-131. 1970.
- GLAUERT, A. M. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. Vol.3. *Practical Methods in electron microscopy*. Glauert. North Holland Publishing Company. 1-207. 1975
- GIGULA, N. B.; FAWCETT, D.W. & AOKI, A. The Sertoli Cell occluding junctions and gap junctions in mature developing mammalian testis. *Dev. Biol.*, **59**: 142-168. 1976.
- GRIGG, G.W. & HODGE, A.J. Electron microscopic studies of spermatozoa. I. The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (Gallus domesticus). *Australian J. Sc. Research (B)*, **2**: 271, 1949.
- GUNAWARDANA, V.K. Stages of the spermatids in the domestic fowl: a light microscope study using araldite sections. *J. Anat.*, **123** (2): 351-360. 1977.

- GUNAWARDANA, V.K. & SCOTT, M. G. A. D. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. *J. Anat.*, 124 (3): 741-755. 1977.
- HAYHOE, F.G. J. & FLEMANS, R.J. Um atlas colorido de citologia hematológica. 2a. ed. Royal Smeets Offset b.v., Weert-Holland, 1989.
- HENLEY, C. FEDUCCIA, A. & COSTELLO, D.P. Oscine spermatozoa: a light and electron-microscopy study. *Condor*, 80: 41-48, 1978.
- HENNIG, W. Preface. In: *Spermatogenesis: genetic aspects*. Hennig.W. Berlin, Springer-Verlag, 1987. p. v-vi (Results and Problems in Cell Differentiation, v.15).
- HESS, R.A.; THURSTON, R.J. & GIST, D.H. Structure of the turtle spermatozoon. *Anat. Rec.*, 229: 473-481. 1991.
- HUMPHREYS, P.N. Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *J. Reprod. Fert.*, 29: 327-336, 1972.
- HUMPHREYS, P.N. The differentiation of the acrosome in the spermatids of the budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Cell Tiss. Res.*, 156: 444-446, 1975.
- JOHNSTON, R. F. & SELANDER, R. K. House sparrow: rapid evolution in races of North America. *Science*, 144: 548-550. 1964
- JOHNSTON, R. F. & SELANDER, R.K. Evolution in the house sparrow. II. Adaptive differentiation in North American populations. *Evolution*, 25: 1-28. 1971.
- KADHIM, A. H.; AL-DABBAGH, K.Y.; AL NAKASH, M.M. & WA WEED, I.N. The annual cycle of male house sparrow *Passer domesticus* in the Central Iraq. *J. Biol. Sci. Res.*, 18 (1): 1-10. 1987
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137A, 1965.
- KESSEL, R.G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *J. Ultrastruct. Res.*, 16: 293-304, 1966.
- KESSEL, R.G. An electron Microscope study of spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of microtubular systems during Differentiation. *J. Ultrastruct. Res.*, 18: 677-694, 1967.
- KESSEL, R.G. Origin, differentiation, distribution and possible functional role of annulate lamellae during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruc. Res.*, 75: 72-96. 1981.

- KESSEL, R.G. A novel and transient structure associated with annulate lamellae morphogenesis: the *Necturus* oocyte revisited. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **22** (4): 551-564. 1990.
- KNIBIEHLER, B.; MIRRE, C. HARTUNG, M. JEAN, P. & STAHL, A. Sex vesicle associated with nucleolar organizers in mouse spermatocytes: localization, structure and function. *Citog. Cell Genet.*, **31**: 47-57. 1981.
- KONDO, T.; HASEGAWA, K. & UCHIDA, T.A. Formation of microtubule bundle and helical shape of the spermatid in the common finch, *Lonchura striata* var. *domestica*. *J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.*, **98**: 158-68, 1988.
- KUO, S.C.; GELLES, J.; STEUER, E. & SHEETZ, M. P. A model for kinesin and cytoplasmic dynein and force measurements. *J. Cell Sci. (Supl.)*, **14**: 135-138. 1991.
- LAKE, P.E. The relationship between morphology and function in fowl spermatozoa. *Proc. Xth. Wld. Poult. Congr. Edinburgh.*, p.79, 1954.
- LAKE, P.E.; SMITH, W. & YOUNG, D. The ultrastructure of the ejaculated fowl spermatozoon. *Q. Jl. Exp. Physiol.*, **53**: 356-366, 1968.
- LAKE, P.E. & SMILES, J. Some observations on the morphology of fowl spermatozoa. *Proc. Soc. Study Fertil.*, **4**:18-20, 1952.
- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.*, **55**: 548-573. 1952
- LILLIE, R.P. *Histopathologie Technic and Pratical Histochemistry*. New York. Blakiston. 1954.
- LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales - Principes et methodes*. Vol. I. Gauthier Villar, Paris. 397p. 1960.
- LOFTS, B. & MURTON, R.K. Reproduction in Birds. In: *Avian Biology*. Vol. III. Eds. FARNER, D.S.; KING, J. R. & PARKERS, K.C.. Academic Press, New York, 1-107p, 1973.
- LOFTS, B.; MURTON, R. K. & THEARLE, R. J. P. The effects of testosterone propionate and gonadotropins on the bill pigmentation and the testis of the house sparrow (*Passer domesticus*). *Gen. Comp. Endoc.*, **21**: 202-209. 1973.
- LOU, Y. & TAKAHASHI, H. Spermiogenesis in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with notes on a unique pattern of nuclear condensation. *J. Morph.*, **200**: 321-330. 1989.

- MARQUEZ, B.J. & OGASAWARA, F.X. Scanning electron microscope studies of Turkey semem. *Poultry Science*, 54(1): 1139-1143, 1975.
- MATTEI, C. MATTEI, X. & MANFREDI, J. Electron microscope study of the spermiogenesis of Streptopelia roseogrisea. *J. Submicrosc. Cytol.*, 4: 57-73, 1972.
- McFARLANE, R. W. The taxonomic significance of avian sperm. *Proc. 13th Int. Ornithol. Congr.*: 91-102, 1963. Cit. em HENLEY *et al.* (1978), *op. cit.*
- McFARLANE, R.W. PhD thesis. University of Florida. 1971. Cit. em HUMPHREYS (1972), *op. cit.*
- McINTOSH, J.R. & PORTER, K.R. Microtubules in the spermatids of domestic fowl. *J. Cell. Biol.*, 14: 193-205, 1967.
- MELLO, M.L. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. *Tese de Livre Docência - UNICAMP*, 205pp. 1976.
- MELLO, M.L. & VIDAL, B.C. Optical properties of plant chromosomes during mitosis. *Cytologia*, 39: 315-320. 1974.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, Staurorhectus longicornis Giglio-Toss. *Adv. Invert. Rep.*, 1: 75-83, 1977.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. *Práticas em Biologia Celular*. Edgard Bucher, São Paulo. 58-69p. 1980.
- MERISKO, E. Annulate lamellae: an organell in search of a function. *Tissue & Cell*, 21 (3): 343-354. 1989.
- MESSIAS, N.S. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de Chrysomia megacephala Fab (Diptera: Calliphoridae). *Tese de mestrado*. UNICAMP. 115pp. 1990.
- MIDDLETON, J. Testicular reponses of the house sparrows and white-crowned sparrows to short daily photoperiods with low intensities of light. *Physiol. Zool.*, 38: 255-266. 1965.
- MIRANDA, J. C. & CAVICHIA, J. C. A permeability barrier in the testis of an insect Triatoma: a freeze-fracture and lanthanum study. *Tissue & Cell*, 18: 461-468. 1986.

- MIRRE, C. & KNIBIHELER, B. A re-evaluation of the relationships between fibrillar centers and nucleolus-organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centers in the nucleolus mouse Sertoli cell. *J. Cell Sci.*, **55**: 247-259. 1982
- MIRRE, C. & KNIBIHELER, B. Ultrastructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermiogenesis in the mouse. *Cell Diff.*, **16**: 51-61. 1985.
- MONNERON, A. & BERNHARD, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **27**: 266-268. 1969.
- MYLES, D.G. & HEPLER, P.K. Spermiogenesis in the fern *Marsilea*: microtubules, nuclear shaping, and cytomorphogenesis. *J. Cell Sci.*, **23**: 57-83, 1977.
- NAGANO, M.D. Observations on the fine structure of developing spermatid in the domestic chicken. *J. Cell. Biol.*, **14**: 193-205, 1962.
- NAGANO, M.D. & SUZUKI, F. Postnatal development of junctional complexes of mouse Sertoli cells as revealed by freeze- fracture. *Anat. Rec.*, **185**: 403-418. 1976.
- NICANDER, L. Comparative studies on the fine structure of the vertebrate spermatozoa. In: *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. B. Baccetti. New York, Academic Press. 47-55. 1970.
- OKAMURA, F. & NISHIYAMA, H. The early development of the tail and transformation of the shape of the nucleus of the spermatid of the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell. Tiss. Res.*, **168**: 345-359, 1976.
- OKO, R. Comparative analysis of proteins from fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **39**: 169-182. 1988
- OLSON, G.E. & SAMMONS, D.W. Structural chemistry of outer dense fibers of the rat sperm. *Biol. Reprod.*, **22**: 319-322. 1980.
- ORR, R. T. *Biologia dos vertebrados*. Rocca, São Paulo, 5ed. Cap.4, 131-182. 1986.
- PARVINEN, M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr. Rev.*, **3**: 404-417. 1982.
- PELLETIER, R. M. A novel perspective: the occluding zonule encircles the apex of the Sertoli cell as observed in birds. *Am. J. Anat.*, **188** (1): 87-108. 1990.
- PELLETIER, R.M. & FRIEND, D. S. The Sertoli cell junctional complex: structure and permeability to fillipin in the neonatal and adult guinea pig. *Am. J. Anat.*, **168**: 213-228, 1983.

- PEREY, B.; CLERMONT, Y. & LEBLOND, C.P. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.*, **108**: 47-77. 1961.
- PEREZ, F. P. Anatomia funtional y fisiologia del aparato genital masculino. In: *Bases biológicas y de aplicacion práctica de la canaricultura*. Ed. Reus. 183-196. 1972.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell. Biol.*, **44**: 243. 1970.
- PHILLIPS, D.M. *Spermiogenesis*. Academic Press. New York. 68p. 1974.
- PHILLIPS, D.M. ASA, C.S. & STOVER, J. Ultrastructure of spermatozoa of the white-naped crane. *J. Submicrosc. Citol.*,: 489-94, 1987.
- PHILLIPS, D.M. & ASA, C.S. Development of spermatozoa in the Rhea. *Anat. Rec.*, **223**: 276-282. 1989.
- PLA, C.M. Spermatogenesis. *Scientific American*, **52**, 1981. POGANY, G.C.; CORZET, M.; WESTON, S. & BALHORN, R. DNA and protein content of mouse sperm: implication regarding sperm chromatin structure. *Exp. Cell Res.*, **136**: 127-136. 1981.
- PEEBLES, C; GRUOL, D. & TAN, E.M. Association between the nucleolus and Coiled body. *J. Struc. Biol.*, **104**: 120-127. 1990a.
- RASKA, I.; OCHS, R. L.; ANDRADE, L. E. C.; CHIAN, E. K. L.;BURLINGAME, R.;
- RASKA, I.; ANDRADE, L. E. C.; OCHS, R.L.; CHAN, E.K.L., CHANG, C.M.; ROSS, G. & TAN, E.M. *Exp. Cell. Res.*. 1990b.
- RASTOGI, R.K; BAGNARA, J. I.; IELA, L. & KRASOVICH, M.A. Reproduction in the Mexican leaf frog, Pachimedusa dacnicolor. IV. Spermatogenesis: A light and ultrasonic study. *J. Morphol.*, **197**: 277-302, 1988.
- RATNER, J. B. Nuclear Shaping in Marsupial Spermatids. *J. Ultrastruct. Res.*, **40**: 498-512, 1972.
- RETZIUS, G. Die Spermien der Vogel. *Biol. Untersuch*, new ser., **14**: 22, 1909. Cit. em HENLEY et al. (1978), op. cit.
- RETZIUS, G. Zur Kenntris der Spermien der Vogel. *Biol. Untersuch.*, new ser., **16**: 89-92, 1911. Cit. em HENLEY et al. (1978) op. cit.
- RISLEY, M.S.; EINHERBER, S. & BUMCROT, D.A. Change in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma (Berl.)*, **94**: 217-227. 1986.

- ROSS, M. H. & DOBLER, J. The Sertoli cell junctional complex specializations and their relationship to the germinal epithelium as observed after efferent ductule ligation. *Anat. Rec.*, **183**: 267-292. 1975.
- ROTHWEEL, B. & TINGARI, M.D. The ultrastructure of the boundary tissue of the seminiferous tubule in the testis of the domestic fowl (Gallus domesticus). *J. Anat.*, **114**: 221-228. 1973.
- RUSCCHI, A. *Aves do Brasil (2) Chaves Artificiais e Analíticas*. Editora Rios. São Paulo, 237pp, 1981.
- RUSSEL, L. & CLERMONT, Y. Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat. Rec.*, **185**: 259-278. 1976.
- RUSSEL, L. Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region of late spermatids of the rat. *Anat. Rec.*, **194**: 233-246. 1979.
- RUSSEL, L. Further observations on the tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis. *Anat. Rec.*, **194**: 213-232. 1979.
- RUSSEL, L.; SAXENA, N.K. & TURNER, T.T. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue & Cell*, **21** (3): 361-379. 1989.
- SAITA, A. LONGO, O.M. & TRIPEPI, S. Osservazioni comparative sulla spermiogenesi. III. Aspectti ultrastrutturali della spermiogenesi in Jacana jacana (Caradriformes). *Accad. Naz. Lincei.*, **74**: 417-430. 1983.
- SAMOUR, J.H. SMITH, C.A., MOORE, H.D. & MARKHAN, J.A. Semem collection and spermatozoa characteristics in budgerigars (Melopsitacus undulatus). *Vet. Rec.*, **118**: 397-99, 1986.
- SCHULTZ, M. C. Ultrastructural study of coiled body and a new inclusion, the "mykarion", in the nucleus of the adult rat Sertoli cell. *Anat. Rec.*, **225**: 21-25. 1989.
- SCHULTZ, M.C.; HERMO, L. & LEBLOND, C.P. Structure, Development, and cytochemical properties of the nucleolus-associated "Round-body" in rat spermatocytes and early spermatids. *Am. J. Anat.*, **171**: 41-57. 1984.
- SICK, R.H. *Ornitologia Brasileira (1)*. UnB, Brasília, 481p. 1988a.
- SICK, R.H. *Ornitologia Brasileira (2)*. UnB, Brasília, 828p, 1988b.
- SILVEIRA, H.; RODRIGUES, P. & AZEVEDO, C. Fine structure of the spermatogenesis of Blennius pholis (Pisces, Blenniidae). *J. Submicroc. Cytol. Pathol.*, **22** (1): 103-108. 1990.

- 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: 622-633. 1976.
- SING, S. P.; CHARTURVERDI, R.P.; SRIVASTVA, K. B. & JAIN, P. C. Anti-espermatogenic effect of Brutea frondosa extrat in house sparrow Passer domesticus. *J. Cell Res. Plants. Med.*, 5 (1-2): 27-30. 1984
- SINHA-HIKIM, A.P.; BARTKE, A. & RUSSEL, L.D. The sezonal breeding hamster as a model to study the structure-function relationships in the rat testis. *Tissue & Cell*, 20: 63-78. 1988.
- SOLARI, A. J. The evolution of the ultrastructure of sex chromosomes (sex vesicle) during meiotic prophase in mouse spermatocytes. *J. Ultrastrc. Res.*, 27: 289-305. 1969.
- SOTELO, J.R. & TRUJILLO-CENOZ, O. Electron microscope study of the kinetic apparatus in the animal sperm cells. *Zeitschrift für Zellforschung*, 48: 565-601, 1958.
- SPINDLER, M. & HEMLEBEN, CH. Formation and possible function of annulate lamellae in a plantik foraminifer. *J. Ultrastruc. Res.*, 81: 341-348. 1982.
- SPRANDO, R.L. & RUSSEL, L. A comparative study of Sertoli cell ectoplasmic specializations in selected non-mammalian vertebrates. *Tissue & Cell*, 19 (4): 479-493. 1987.
- SPRANDO, R.L. & RUSSEL, L.D. Spermiogenesis in the red-ear turtle (Pseudemys scripta) and domestic fowl (Gallus domesticus): a study of citoplasmic events including cell volume change and citoplasmic elimination. *J. Morph.*, 198: 95-118. 1988.
- SPRANDO, R. L. & RUSSEL, L. Spermiogenesis in the bluegill (Lepomis macrochirus): a study of cytoplasmic elimination. *J. Morph.*, 198: 165-177. 1988b.
- STAFSTROM, H.P. & STAEHELIN, L.A. Are annulate lamellae in Drosophila embryo the result of oerproduction of nuclear pore components? *J. Cell Biol.*, 98: 699-708. 1984.
- STANLEY, H.P. Fine structural observations on the process of spermiation in the holocephalan fish Hydrolagus collei. *J. Morph.*, 204: 295-304. 1990.
- STANLEY, H.P. ; BOWMAN, J. T.; ROMRELL, L.J.; REED, S.C. & WILKISON, R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in Drosophila melanogaster. *J. Ultrastruc. Res.*, 41: 433-466, 1972.

- STANLEY, H. P. & LAMBERT, C. C. The role of a Sertoli Cell actin- myosin system in sperm bundle formation in ratfish Hidrolagus colliei (Chondrichthyes, Holocephali). *J. Morph.*, 186: 223-236. 1985.
- ZÖLLÖSI, A. & MARCAILLOU, C. Electron microscope study of the blood-testis barrier in insect *Locusta migratoria*. *J. Ultrastruc. Res.*, 59: 158-172. 1977.
- TABOGA, S.R. Estudo estrutural, ultraestrutural e citoquímico da espermatogênese, com ênfase na espermiogênese de Hyla ranki (Amphibia, Anura, Hylidae). Tese de Mestrado- UNICAMP. 172pp, 1990.
- TABOGA, S.R. & DOLDER, M.H. Substituição de proteínas básicas nucleares ao longo da espermatogênese de Hyla ranki (Amphibia, Anura, Hylidae). *Anais do VII Congresso Brasileiro de Biol. Cel.*, vol. 7, Supl. Jul. Ago., 1990.
- TAKEUCHI, IK.; & TAKEUCHI, Y. K. Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *J. Struc. Biol.*, 103: 104-112. 1990.
- THURSTON, R. J.; HESS, R.A.; HUGHES, B.L. & FROMAN, D.P. Ultrastructure of Guinea fowl (Numidia meleagris) spermatozoon. *Poultry Science*, 61: 1738-1743, 1982.
- THURSTON, R.J. & BIELLIER, H.V. Ultrastructure studies of the turkey semen. *Poultry Sci.*, 51: 1879, 1972.
- TINGARI, M.D. Observations on the fine structure of the spermatozoa in the testis and the excurrent ducts of the male fowl, Gallus domesticus. *J. Reprod. Fert.*, 34: 255-265, 1973.
- TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in the Drosophila melanogaster IV. Nuclear Transformation. *J. Ultrastruct. Res.*, 48: 284-303, 1974.
- TRHEDGOLD, L.T. A study of annual cycle of the house sparrow at various latitudes. *Condor*, 62: 190-205. 1960a
- TRHEADGOLD, L. T. Testicular reponse of the house sparrow Passer domesticus to short photoperiods and low intensities. *Physiol. Zool.*, 33: 190-205. 1960b
- VENABLE, J. H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-408. 1965.
- VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: B.C. Vidal & M.L.S. Mello. *Biologia Celular*. Atheneu, Rio de Janeiro. 5-34, 1987.
- VITALE-CALPE, R. & BURGOS, M.H. The mechanism of spermiation in the hamster.I. Ultrastructure of spontaneous spermiation. *J. Ultrastruc. Res.*, 31: 381-393. 1970.

- UENO, H.; NISHIMUNE, Y & MORI, H. Cyclic localization change of the Golgi Apparatus in the sertoli Cells induced by mature spermatids in the rats. *Biol. Reprod.*, 44: 656-662. 1991.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Bioch. Cytol.*, 4 (4): 475-478. 1958.
- WEBSTER, P.M. & RICHARDS, K.S. Spermiogenesis in the Enchytraeid Lumbricus rivalis (Oligochaeta: Annelida). *J. Ultrastruct. Res.*, 61: 62-77, 1977.
- WEISS, D.G.; SEITZ-TUTTER, D. & LANGFORD, G. M. Characteristics of the motor responsible for the gliding of native microtubules from squid axoplasm. *J. Cell Sci. (Supl.)*, 14: 157-161. 1991.
- WEST, D.L. Ultrastructural and Cytochemical aspects of Spermiogenesis in Hidra hymanae, with reference to factors involved in sperm head shaping. *Developmental Biol.*, 65: 139-154, 1978.
- WETMORE, A. Classification of the recent birds of the world. *Smithsonian Misc.Coll.*, 139 (11): 1-37. 1960. Cit. em SICK (1988a), op. cit.
- WYROBEK, A. J.; MEISTRICH, M. L.; FURRER, R. & BRUCE, W.R. Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys. J.*, 16: 811-825. 1976.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato a)  
Rejane Maira Góes  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27.11.2014

*M. Dolder*

**Rejane Maira Góes**

**Espermatogênese em**  
**Passer domesticus (Aves, Passeriformes):**  
**Estudo estrutural e**  
**ultra-estrutural**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para a  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências Biológicas na Área de  
Biologia Celular.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Mary Anne Heide Dolder**

**CAMPINAS**

**1992**

72.20499

**G553e**  
**v.2**  
**17188/BC**

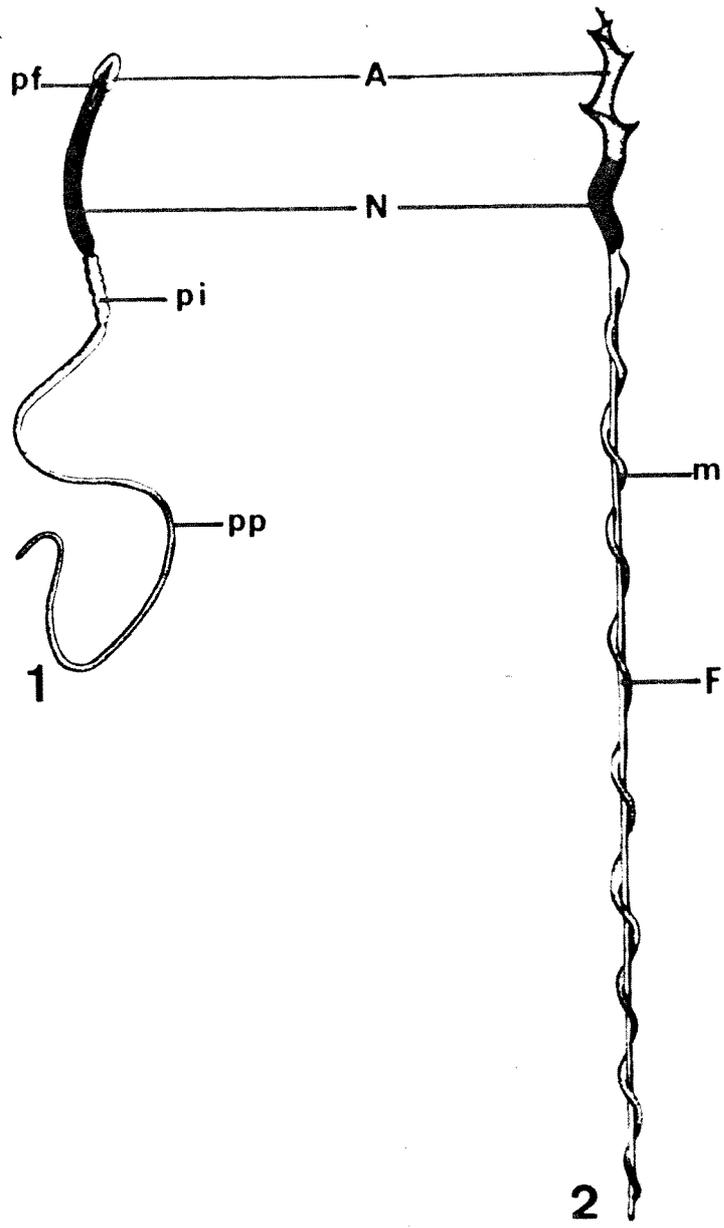
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**VOLUME  
II**

O presente volume apresenta as fotomicrografias e eletromicrografias com legendas explicativas referentes a cada figura. As abreviações utilizadas nas figuras estão sumarizadas na página 5. As pranchas referentes às fotomicrografias trazem especificados os métodos utilizados no preparo do material. As demais pranchas contém eletromicrografias, cujos métodos de fixação e coloração estão descritos no ítem 2.2.5.

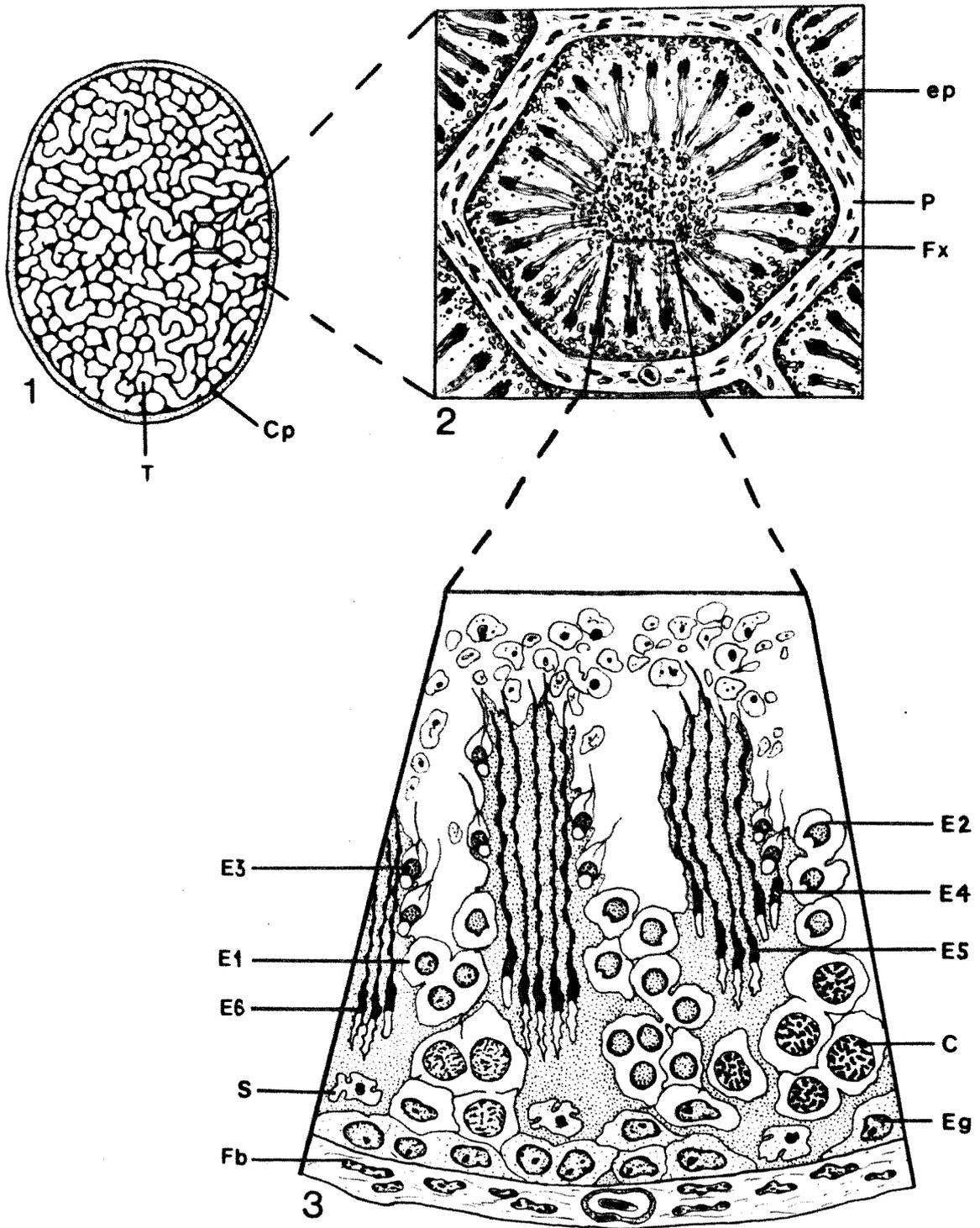
## ABREVIÇÕES UTILIZADAS NAS FIGURAS

**A** - acrossomo  
**ac** - material adjunto do centríolo  
**an** - "annulus"  
**ax** - axonema flagelar  
**C** - espermátocito primário em prófase  
**ce** - crista espiral  
**Cp** - cápsula testicular  
**cr** - corpo reticulado  
**cS** - citoplasma da célula de Sertoli  
**cn** - complexo sinaptonêmico  
**ct** - centríolo  
**D** - espermátocito primário em diplóteno  
**E1** - espermátide na fase 1 de diferenciação  
**E2** - espermátide na fase 2 de diferenciação  
**E3** - espermátide na fase 3 de diferenciação  
**E4** - espermátide na fase 4 de diferenciação  
**E5** - espermátide na fase 5 de diferenciação  
**E6** - espermátide na fase 6 de diferenciação  
**Ef** - espermátide final  
**Eg** - espermátogônia  
**Ei** - espermátide inicial  
**ep** - epitélio germinativo  
**F** - flagelo ou região caudal  
**Fb** - fibroblasto  
**fc** - fibras colagênicas  
**fd** - fibras densas  
**fx** - feixe de espermátides  
**fi** - filamentos intermediários  
**H** - hemácea  
**G** - complexo de Golgi  
**ga** - grânulo acrossomal  
**gi** - grânulo acrossomal interno  
**I** - lisossomo  
**LA** - lamela anulada  
**lb** - lâmina basal  
**m** - mitocôndria  
**Me** - material citoplasmático a ser eliminado  
**Mc** - massas citoplasmáticas densas  
**mt** - microtúbulos  
**N** - núcleo  
**Nu** - nucléolo  
**P** - parede do túbulo seminífero  
**pf** - "perforatorium"  
**pi** - peça intermediária  
**pp** - peça principal  
**r** - resíduo de eliminação citoplasmática  
**Rr** - retículo endoplasmático rugoso  
**Rl** - retículo endoplasmático liso  
**S** - célula de Sertoli  
**T** - túbulo seminífero  
**VA** - vesícula acrossomal  
**vd** - vesículas densas  
**vS** - vacúolo da célula de Sertoli



**ESQUEMA1:** Esquema representativo dos dois tipos básicos de espermatozoides encontrados entre as aves: (1) espermatozóide dos não passeriformes e passeriformes subóscinos, e (2) espermatozóide dos passeriformes óscinos. Modificado de RETZIUS (1909) e FAWCETT (1970). A - acrossomo; F - flagelo; m - mitocôndria; N - núcleo; pf - "perforatorium"; pi - peça intermediária; e pp - peça principal.

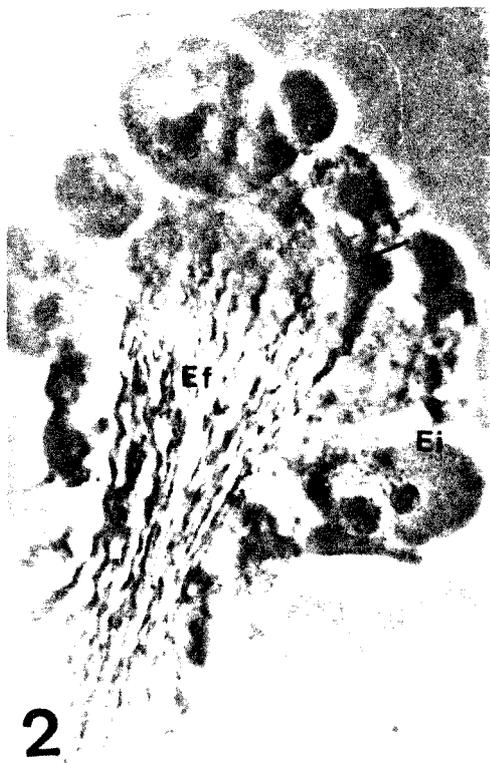
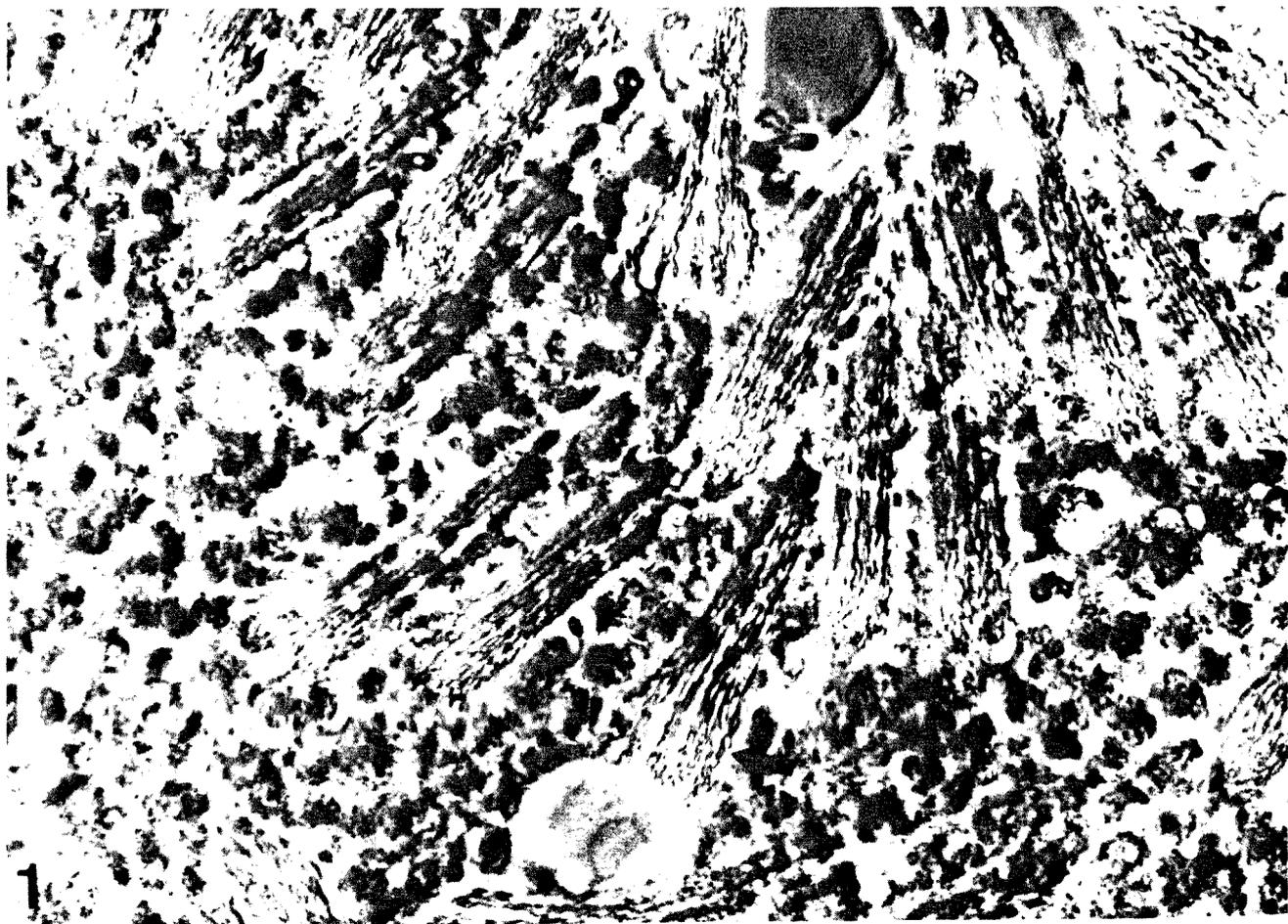
**ESQUEMA2:** (1) Testículo do pardal, constituído externamente pela cápsula testicular (Cp) e internamente pelos túbulos seminíferos (T) anastomosados; (2) túbulo seminífero, onde além do tecido peritubular (P) e do epitélio germinativo (ep) notam-se os feixes de espermatídes (fx), organizados radialmente; (3) epitélio germinativo mostrando a disposição da célula de Sertoli (S) e das células germinativas (C - espermatócito primário; E1 a E6-espermatídes; e Eg - espermatogônia), bem como os fibroblastos (Fb) do tecido peritubular.



## PRANCHA I

Material intratesticular fresco observado sob microscopia de contraste de fase.

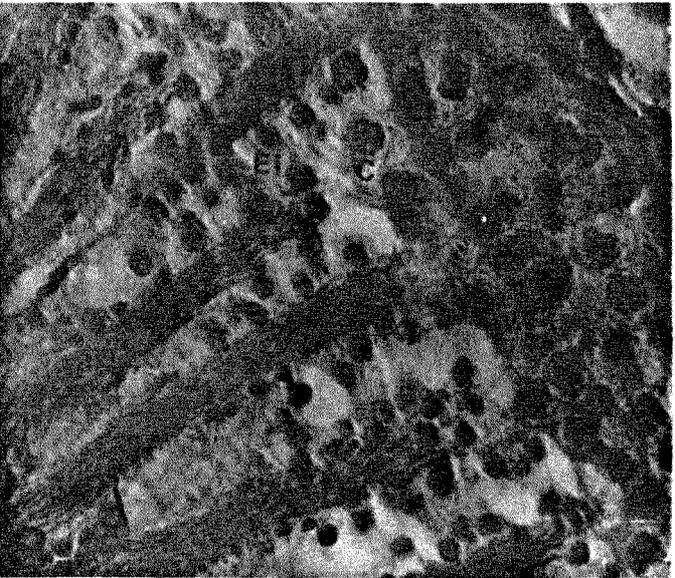
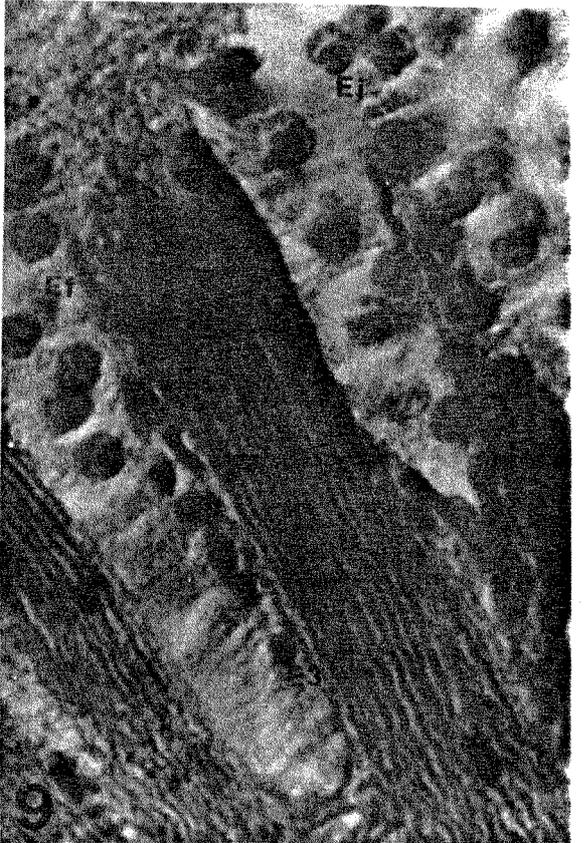
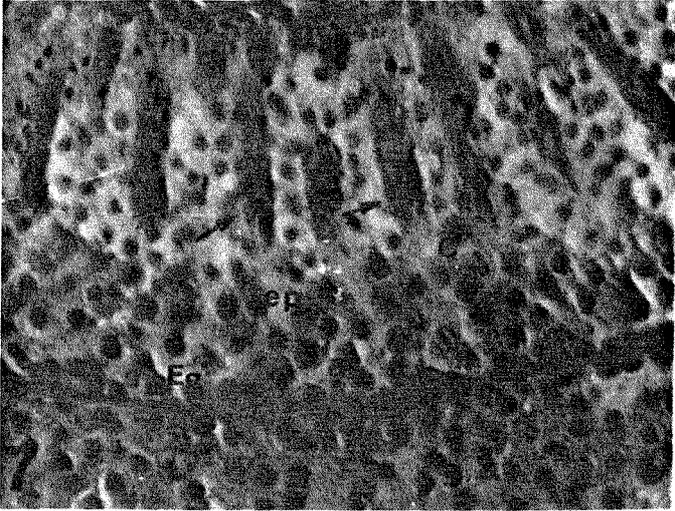
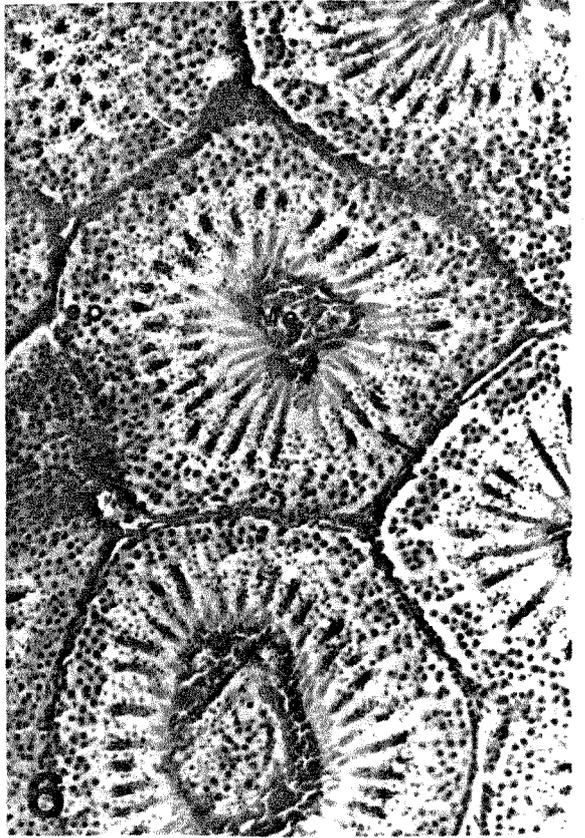
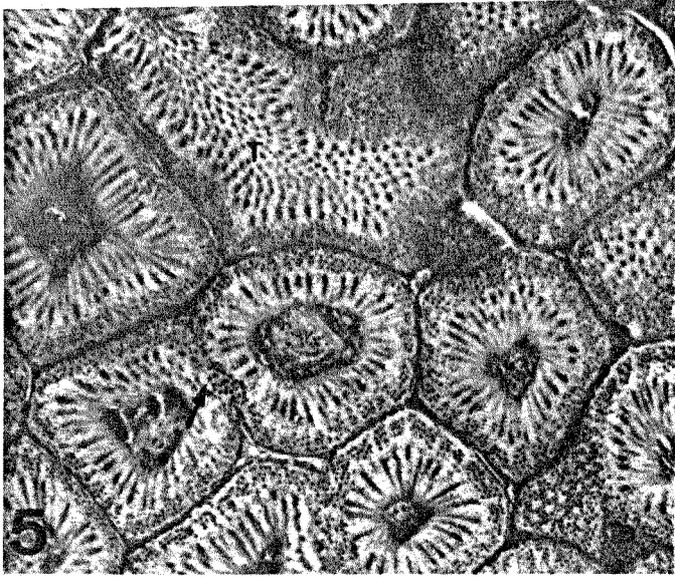
- Figura 1** Conjunto de feixes de espermátides e células do epitélio seminífero em diversos graus de diferenciação. Notar a forma helicoidal das espermátides (seta). 1.450X.
- Figura 2** Feixe de espermátides finais (Ef) rodeado por espermátides iniciais (Ei). Observar os núcleos das espermátides finais mergulhados em uma única massa citoplasmática (seta). 1.900X.
- Figura 3** Feixe com várias espermátides finais (Ef) e E4. Gotículas citoplasmáticas (seta) são observadas na região terminal das caudas. 2.080X.
- Figura 4** Espermátides finais helicoidais nas quais se distingue a região nuclear (N) e caudal (F). 2.250X.



## PRANCHA II

Cortes de 6µm de espessura, obtidos a partir de material incluído em parafina e corados com Hematoxilina-Eosina.

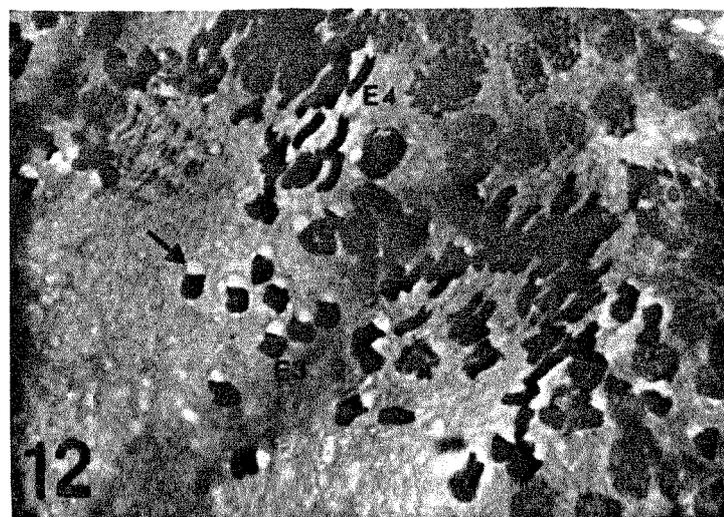
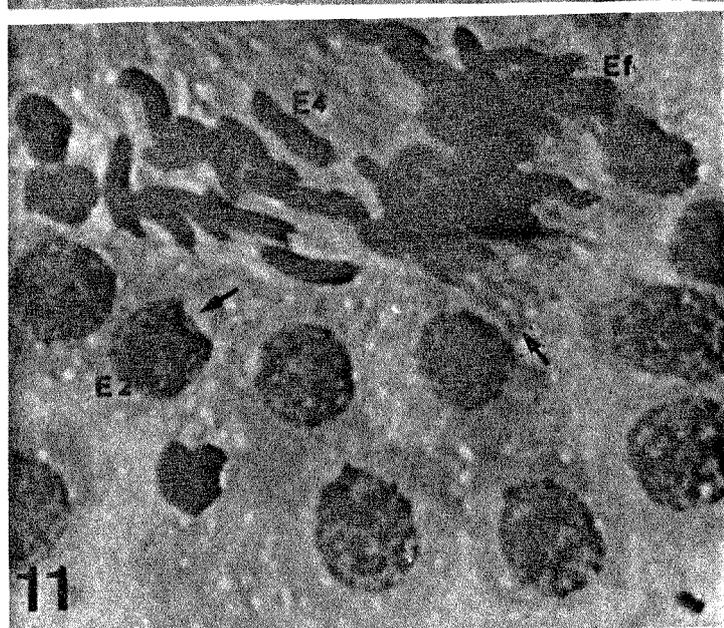
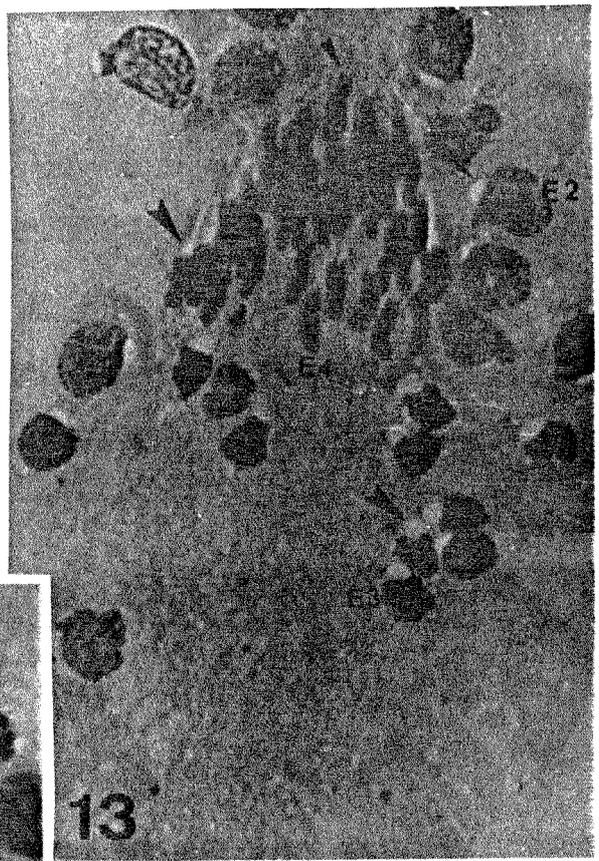
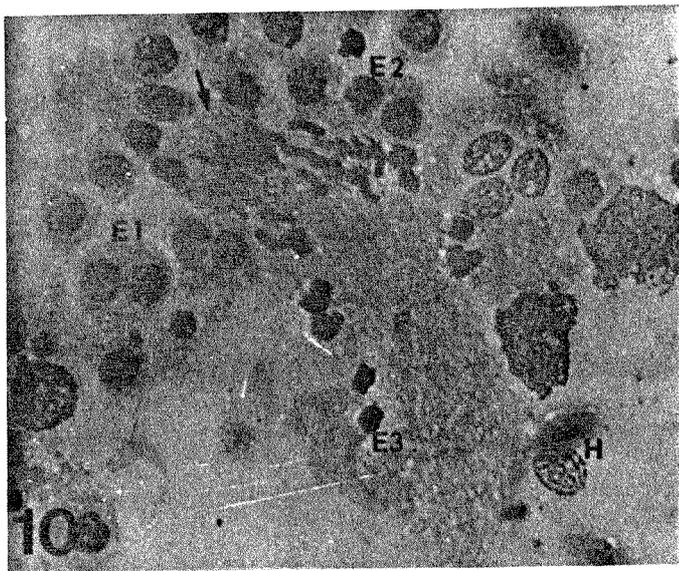
- Figura 5** Aspecto geral do testículo com os túbulos seminíferos (T) no seu interior. Observar as comunicações entre dois túbulos (seta). 200X.
- Figura 6** Vista geral dos túbulos seminíferos mostrando: a parede de tecido conjuntivo (P), o epitélio germinativo (ep), os feixes de espermátides (seta) e o material a ser eliminado na luz do túbulo (Me). 400X.
- Figura 7** Parte basal de um túbulo seminífero onde se nota: a parede (P) deste, o epitélio germinativo (ep), espermatogônias (Eg), espermatócitos primários (C), e os feixes de espermátides (setas), em corte longitudinal, com espermátides em diferentes fases de desenvolvimento. 1.300X.
- Figura 8** Visão parcial do epitélio germinativo contendo: espermatogônias (Eg); espermatócitos primários em prófase (C); espermátides iniciais (Ei); E3; E4; e espermátides finais (Ef). Notar a grande quantidade de E3 na região caudal dos feixes. 2.000X.
- Figura 9** Detalhe de um feixe de espermátides em corte longitudinal, onde se distinguem espermátides iniciais (Ei), E3 e espermátides finais (Ef). 4.000X.



### PRANCHA III

Decalques submetidos ao corante de Leishmann.

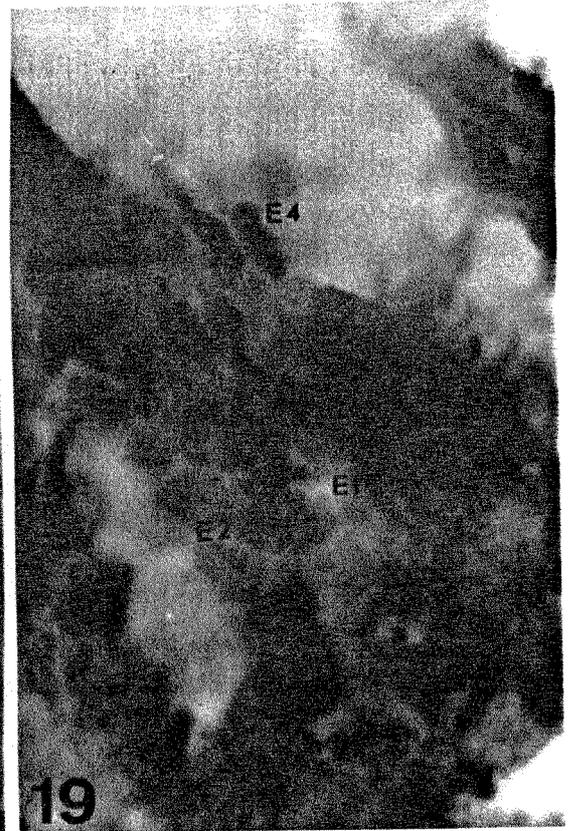
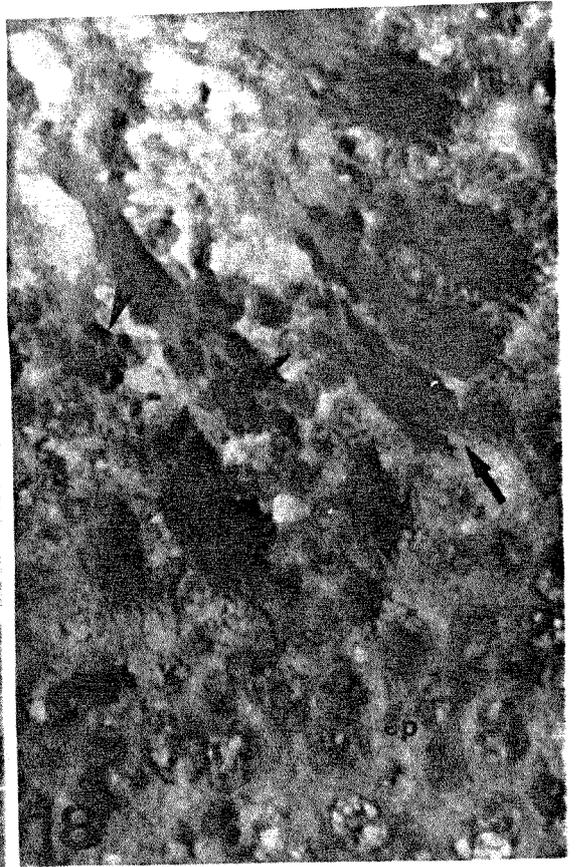
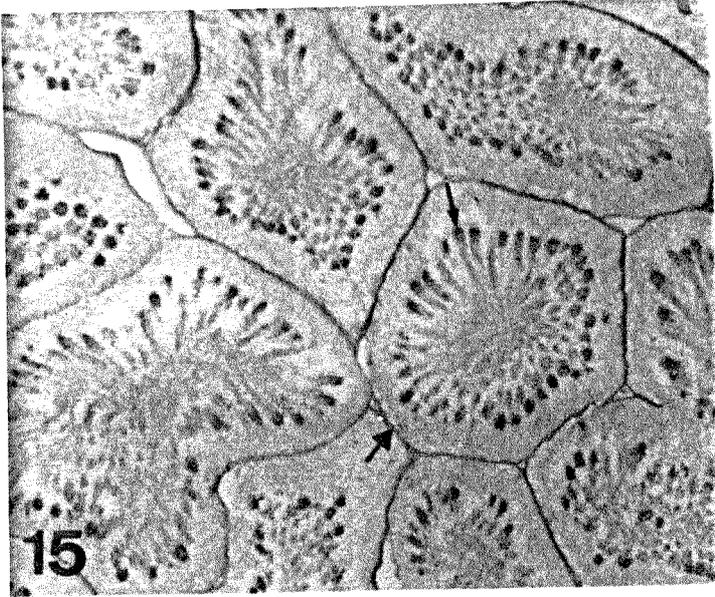
- Figura 10** Feixe com espermátides em vários graus de maturação: E1, E2, E3, e espermátides finais (Ef). Os acrossomos (seta) e os flagelos (F) das espermátides finais coram suavemente em azul. Hemáceas(H) também são visualizadas nesta figura. 2.000X.
- Figura 11** Detalhe do feixe de espermátides contendo E2, E4 e espermátides finais (Ef). As setas indicam a região do acrossomo. 5.000X.
- Figura 12** Feixes de espermátides com grande quantidade de E3 e E4. Observar que os acrossomos das E3 não se coram (seta). 2.500X.
- Figura 13** Conjunto de espermátides onde se nota que a região acrossomal das E2, E3 e E4 (cabeça de seta maior) não são coradas. Observar as projeções na região anterior do núcleo das E4e das espermátides finais (cabeça de seta menor). 3.200X.
- Figura 14** Espermátides alongadas ainda não helicoidais (E4)e espermátides finais (Ef) helicoidais. Os acrossomos das E4 (seta) não são corados. 3.200X.



## PRANCHA IV

Cortes de 6µm de espessura, submetidos ao teste do PAS (Fig. 15-17) e PAS/Hematoxilina (Fig. 18-19).

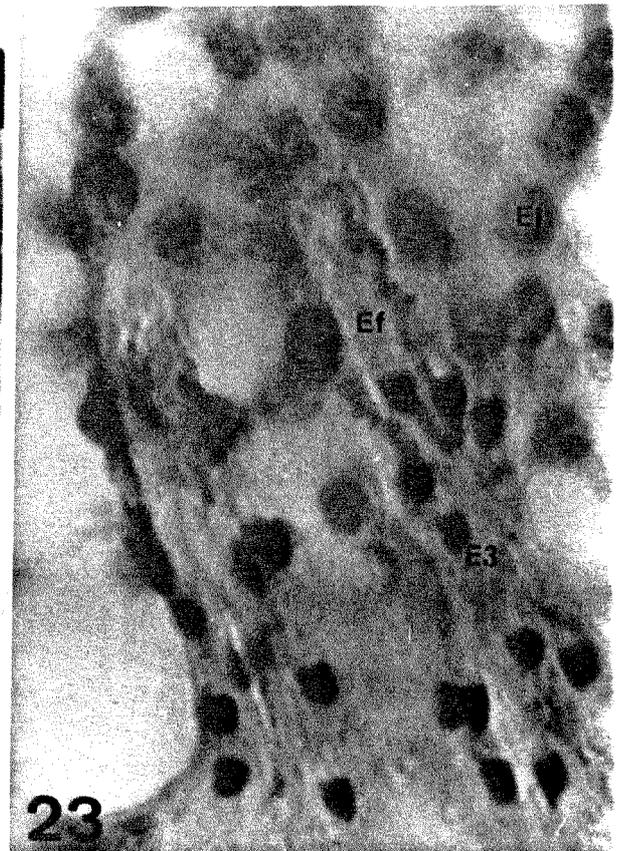
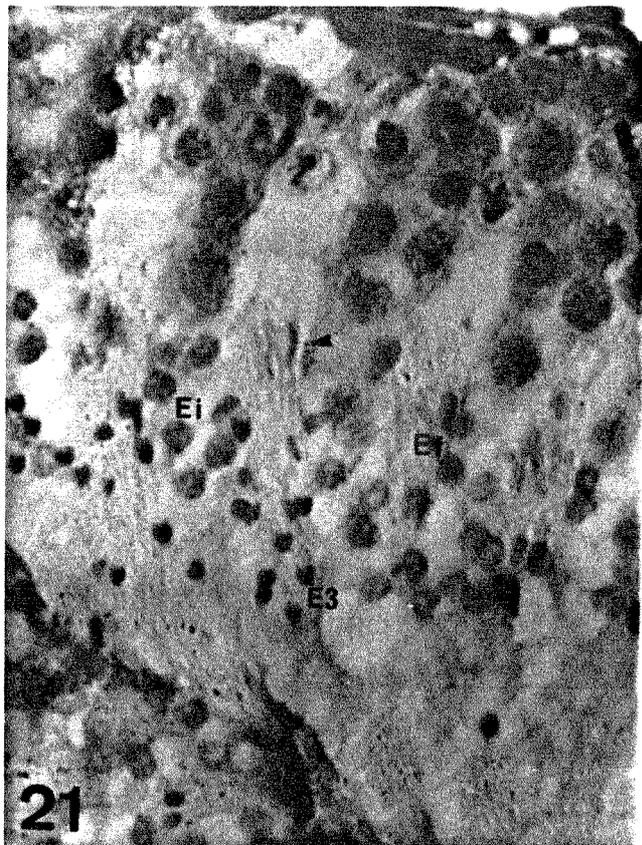
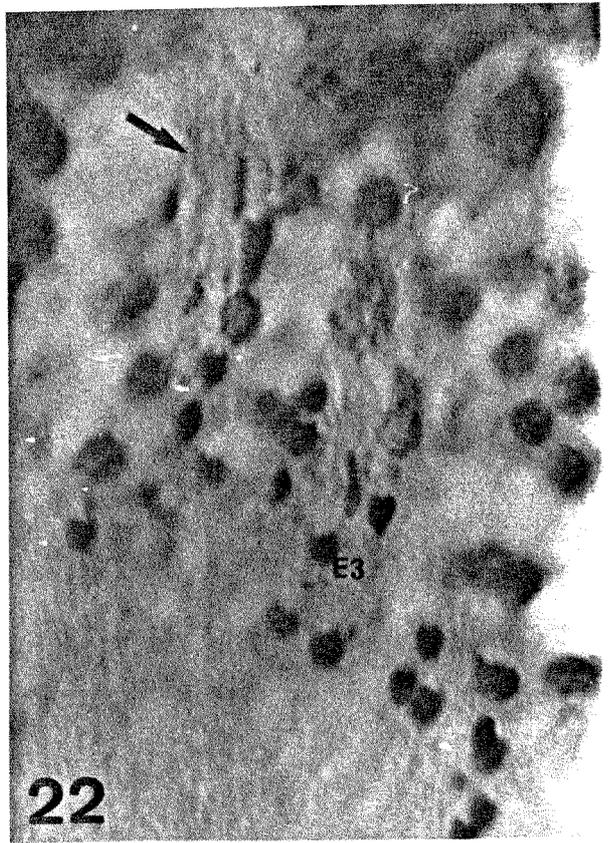
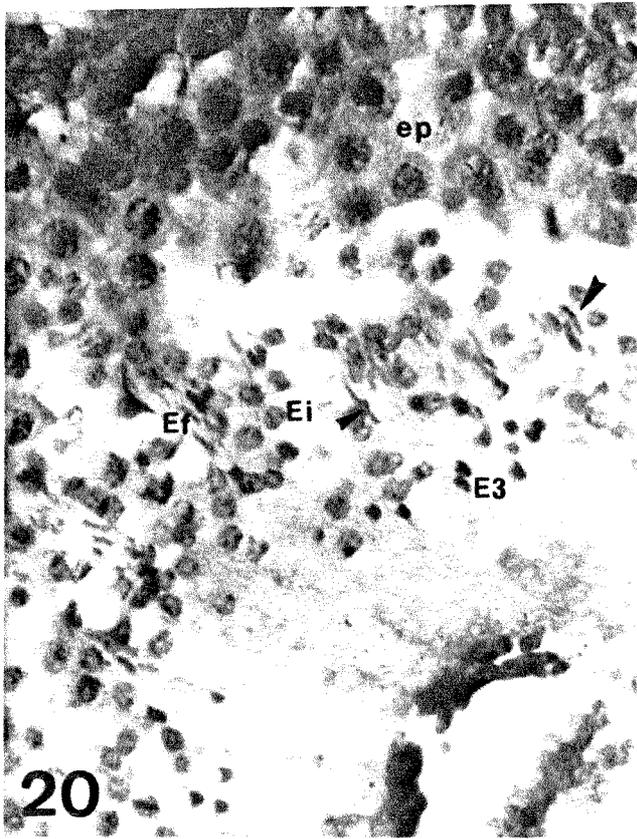
- Figura 15** Aspecto geral do órgão. O tecido conjuntivo da parede dos túbulos seminíferos (seta maior) e os acrossomos das espermátides (seta menor) apresentam-se PAS-positivos. 310X.
- Figura 16** Visão parcial de um túbulo seminífero. A figura mostra: o tecido peritubular (P); o epitélio germinativo (Ep); caudas (F) das espermátides fracamente PAS-positivas e seus acrossomos (setas) fortemente corados. 1.600X.
- Figura 17** Detalhe de um feixe com acrossomos das espermátides fortemente PAS-positivos e helicoidais (seta maior) e os das espermátides E3 (seta menor), arredondados e menos intensamente corados. 5.000X.
- Figura 18** Vista parcial do epitélio germinativo onde se realça: os acrossomos das espermátides finais corados intensamente em rosa (seta maior) e os acrossomos das E2 (seta menor), bem como os das E3 (cabeça de seta), corados suavemente. 2.500X.
- Figura 19** Espermátides em vários graus de desenvolvimento do acrossomo: E2, E3, E4 e espermátides finais (Ef). Notar o núcleo das E4 corado em roxo, em início de helicoidização. 5.000X.



## PRANCHA V

Cortes de 6µm de espessura corados com Azul de Toluidina à pH 4.0

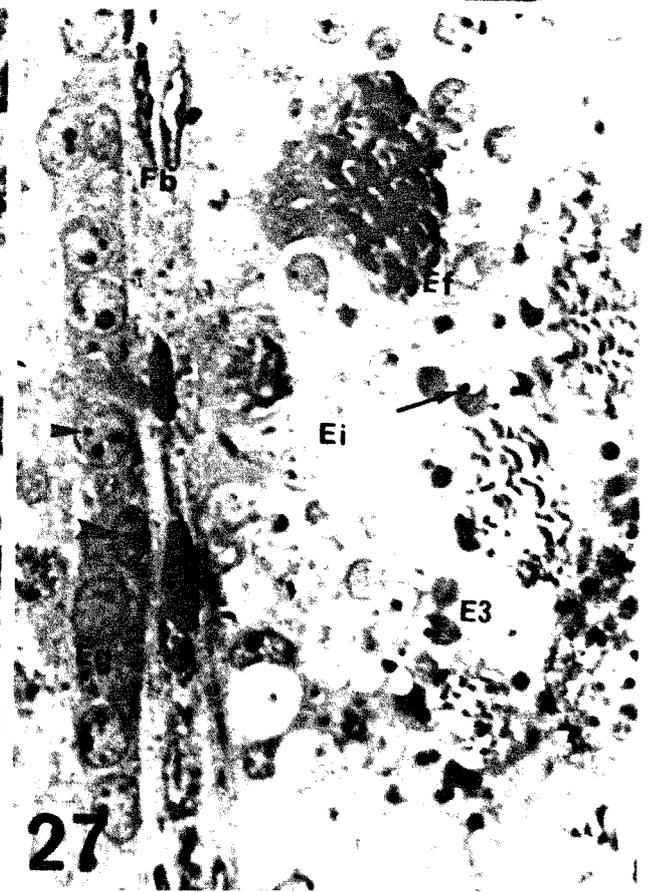
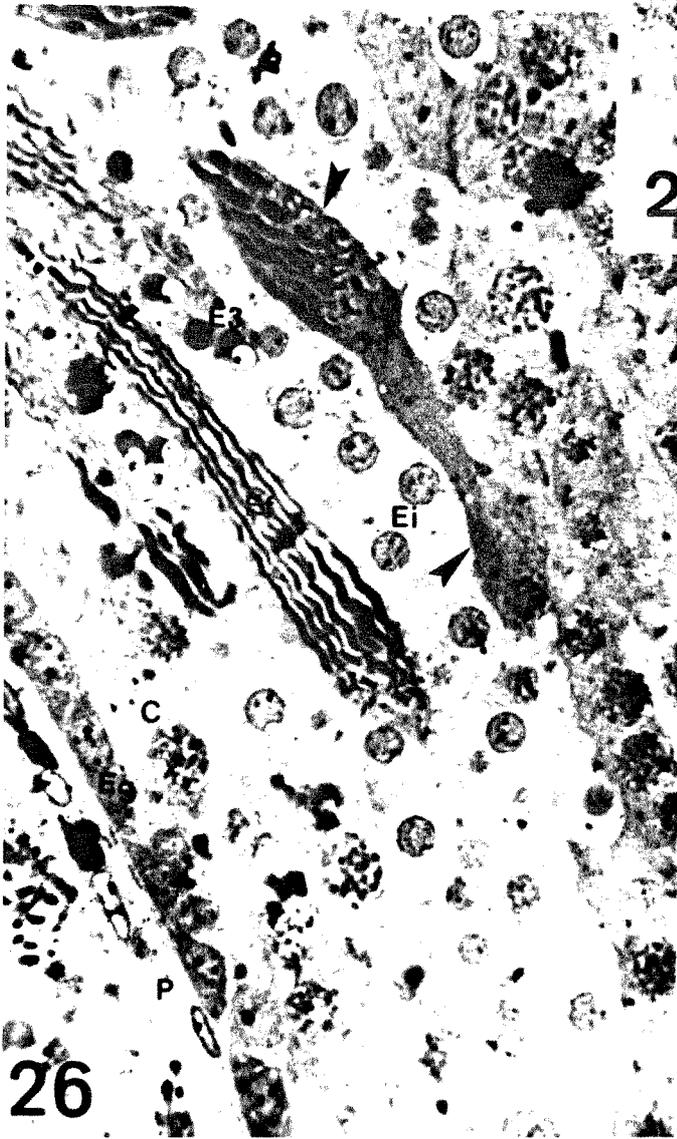
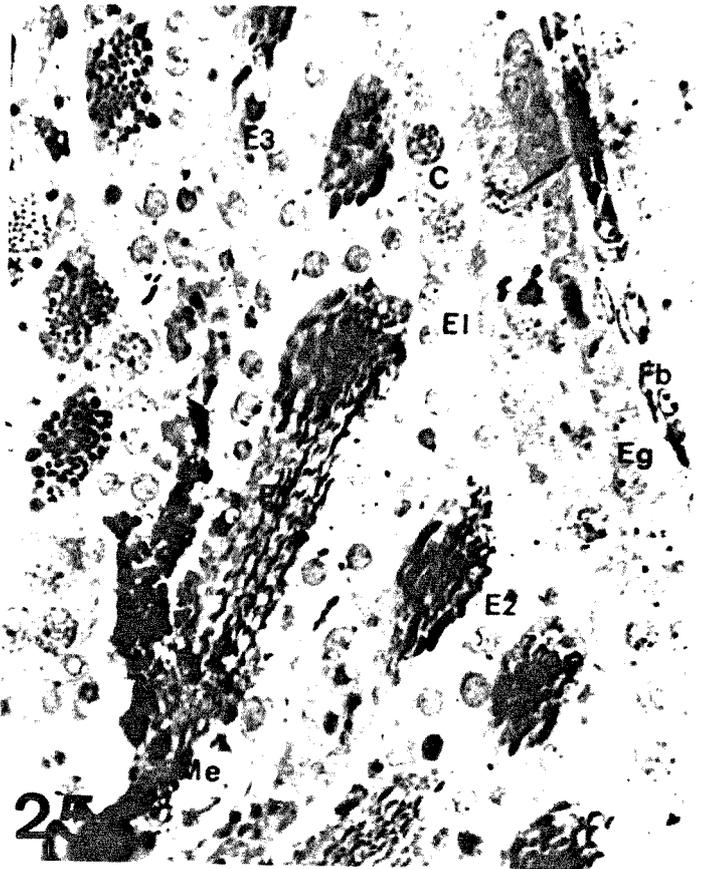
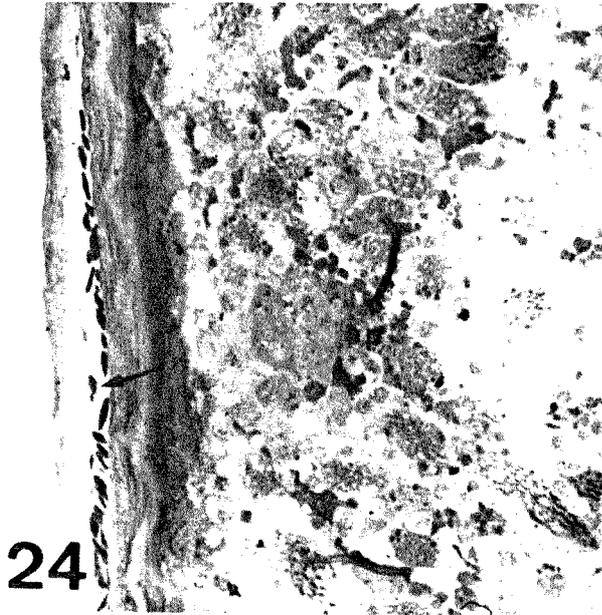
- Figura 20** Aspecto parcial de um túbulo seminífero. A figura mostra: o epitélio germinativo (ep); espermátides iniciais (Ei); E3; e espermátides finais (Ef). As E4 apresentam núcleos variando entre o violeta azulado (cabeça de seta maior) e o violeta (seta menor). 2.000X.
- Figura 21** Alguns feixes contendo espermátides iniciais (Ei), E3, E4 (cabeça de seta) e espermátides finais (Ef). 2.500X.
- Figura 22** Feixe com espermátides finais, com núcleos corados em verde (seta), e E3, com núcleos corados fortemente em violeta azulado. 4.000X.
- Figura 23** Detalhe de um feixe contendo espermátides finais (Ef) coradas em verde, E3, coradas fortemente em violeta azulado e espermátides iniciais (Ei), com núcleos violeta azulados. 5.000x.



## PRANCHA VI

Cortes semifinos corados com solução de Azul de Toluidina a 1% em água.

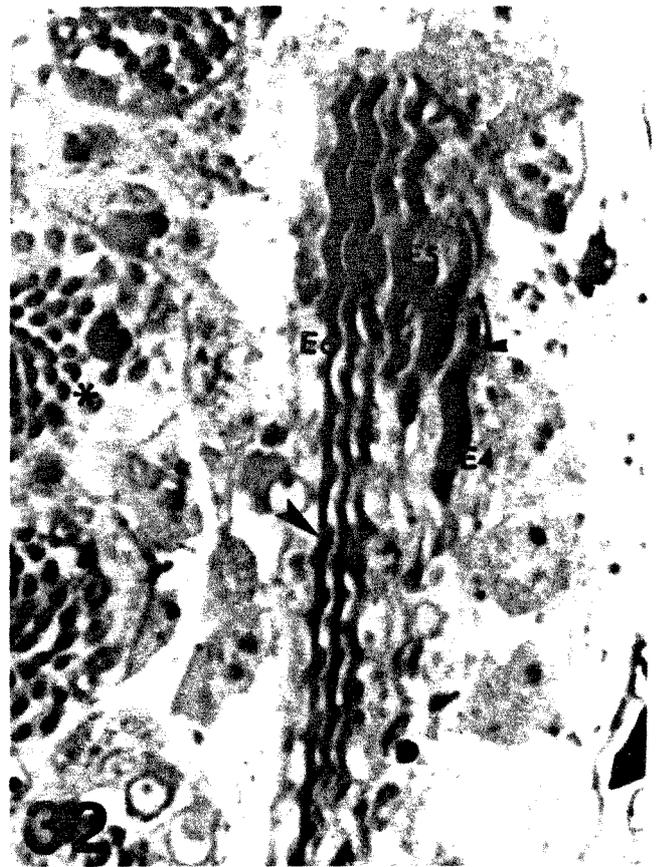
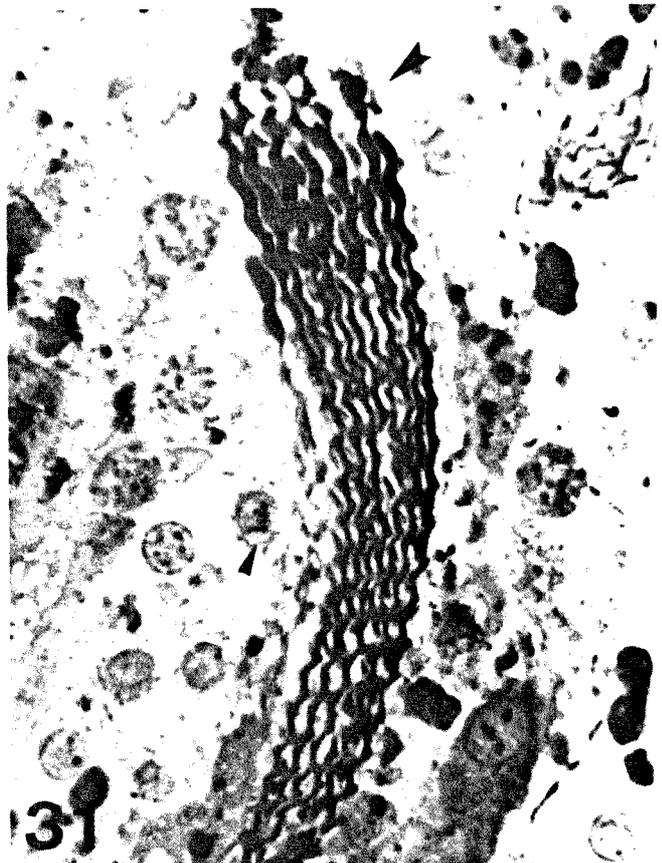
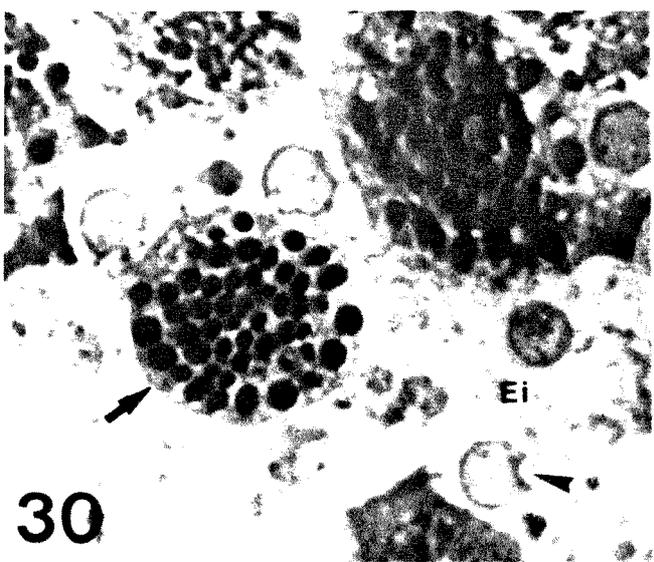
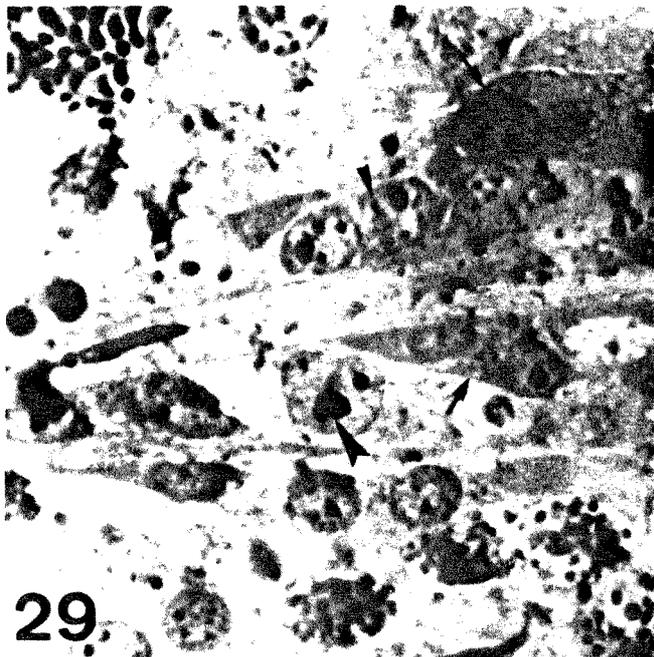
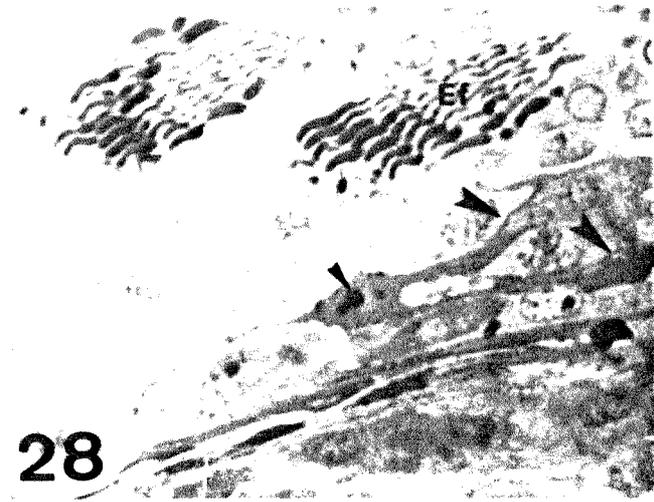
- Figura 24** Vista parcial de um túbulo seminífero onde se observa o epitélio germinativo (ep) adjacente à cápsula testicular, no interior da qual visualiza-se um vaso sanguíneo com hemáceas (seta). 1.050X.
- Figura 25** Epitélio germinativo contendo:espermatogônias (Eg); espermatócitos primários (C); E1; E2; E3; espermátides finais (Ef) organizadas em feixe; e material a ser eliminado (Me). A figura também evidencia a parede do túbulo com fibroblastos (Fb) e capilar com hemácea (seta). 2.000X.
- Figura 26** Vista parcial do epitélio germinativo mostrando: a parede do túbulo (P), espermatogônias (Eg), espermatócitos primários (C), espermátides iniciais (Ei), E3, e feixe de espermátides finais (Ef). Observar o citoplasma da célula de Sertoli, mais fortemente corado, envolvendo as espermátides finais (cabeça de seta). 2.900X.
- Figura 27** Segmento do testículo onde se encontra: a parede do túbulo com fibroblastos (Fb), espermatogônias (Eg), espermátides iniciais (Ei), E3 e espermátides finais (Ef) em corte oblíquo. No núcleo das espermatogônias observam-se nucléolos (cabeça de seta maior) e grumos de cromatina condensada (cabeça de seta menor). Na figura também se destaca o grânulo acrossomal interno (seta) das E3. 3.400X.



## PRANCHA VII

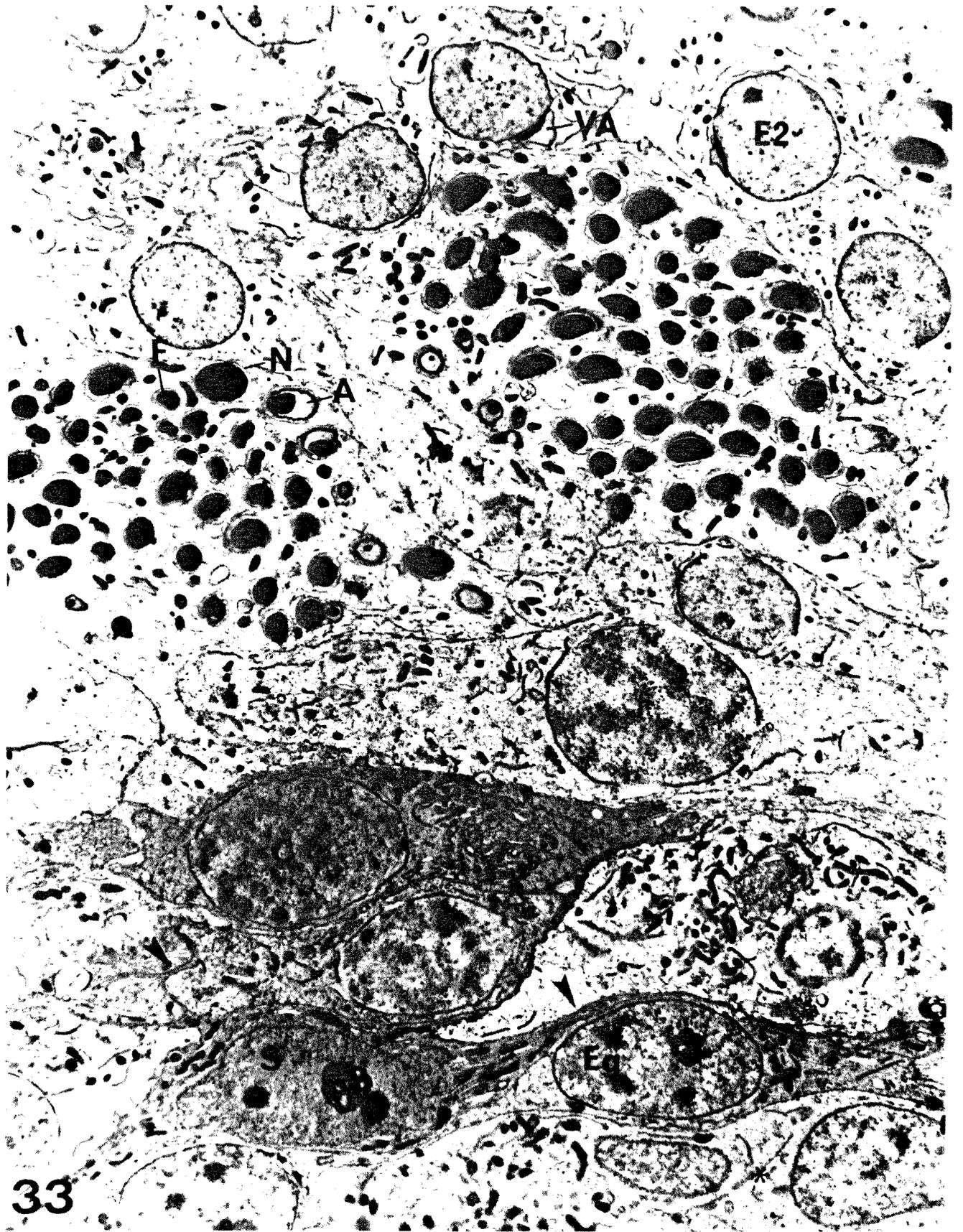
Cortes semifinos corados com solução de Azul de toluidina a 1% em água.

- Figura 28** Região basal do epitélio germinativo. Na figura observam-se: a célula de Sertoli com prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta maior) e nucléolo saliente (cabeça de seta menor), e feixes de espermátides finais (Ef). 2.500X.
- Figura 29** Espermatogônias adjacentes à parede do túbulo em cujos núcleos destacam-se nucléolos (cabeça de seta maior) e grumos de cromatina mais condensada (cabeça de seta menor). As setas indicam o citoplasma das células de Sertoli fortemente corado. 4.000X.
- Figura 30** Feixe de espermátides finais em corte transversal e oblíquo, rodeado por espermátides iniciais (Ei). Observar o citoplasma da célula de Sertoli (seta) envolvendo as espermátides finais. A cabeça de seta indica a região acrossomal da E2. 5.000X.
- Figura 31** Feixe de espermátides finais em corte longitudinal. A figura evidencia: as regiões caudal (F) e nuclear (N) das espermátides finais, espermátides E2 com vesícula acrossomal saliente (cabeça de seta menor), e resíduos de eliminação citoplasmática (r). Observar o limite do citoplasma da célula de Sertoli, no qual as espermátides finais estão mergulhadas (cabeça de seta maior). 3.400X.
- Figura 32** Feixes de espermátides finais em corte longitudinal e transversal (\*). Na figura observam-se: E4 contendo acrossomo com grânulo acrossomal (cabeça de seta menor); E5; e E6 cuja forma helicoidal da cauda é realçada (cabeça de seta maior). 5.000X.



## PRANCHA VIII

**Figura 33** Visão geral do epitélio germinativo onde se observam: espermatogônias (Eg); célula de Sertoli (S) com prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta maior); espermatócitos primários (C); E2 com vesícula acrossomal (VA) e material adjunto do centríolo (cabeça de seta menor); e feixes de espermátides finais seccionadas na região caudal (F), nuclear (N) ou acrossomal (A). Notar que as espermatogônias parecem ocupar o mesmo citoplasma (\*). 4.800X.



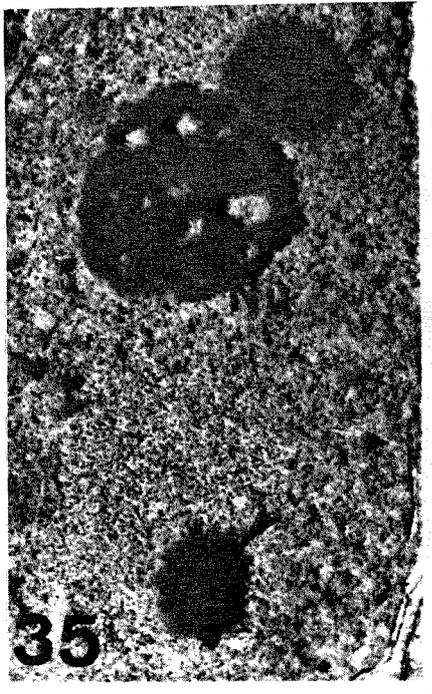
## PRANCHA IX

**Figura 34** Parte do epitélio seminal contendo: célula de Sertoli (S) com prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta maior) e vesícula eletrodensa (seta); espermatogônia (Eg); espermatócitos primários em prófase com corpo redondo (cabeça de seta menor); E2; E4; E5; e E6. 4.700X.



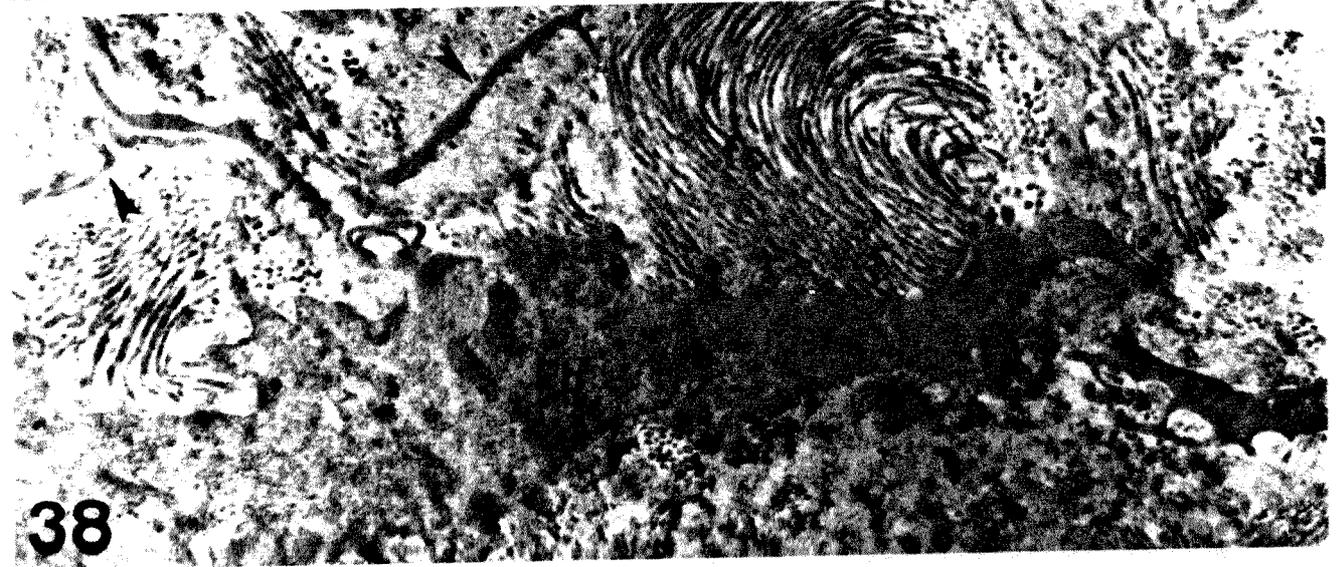
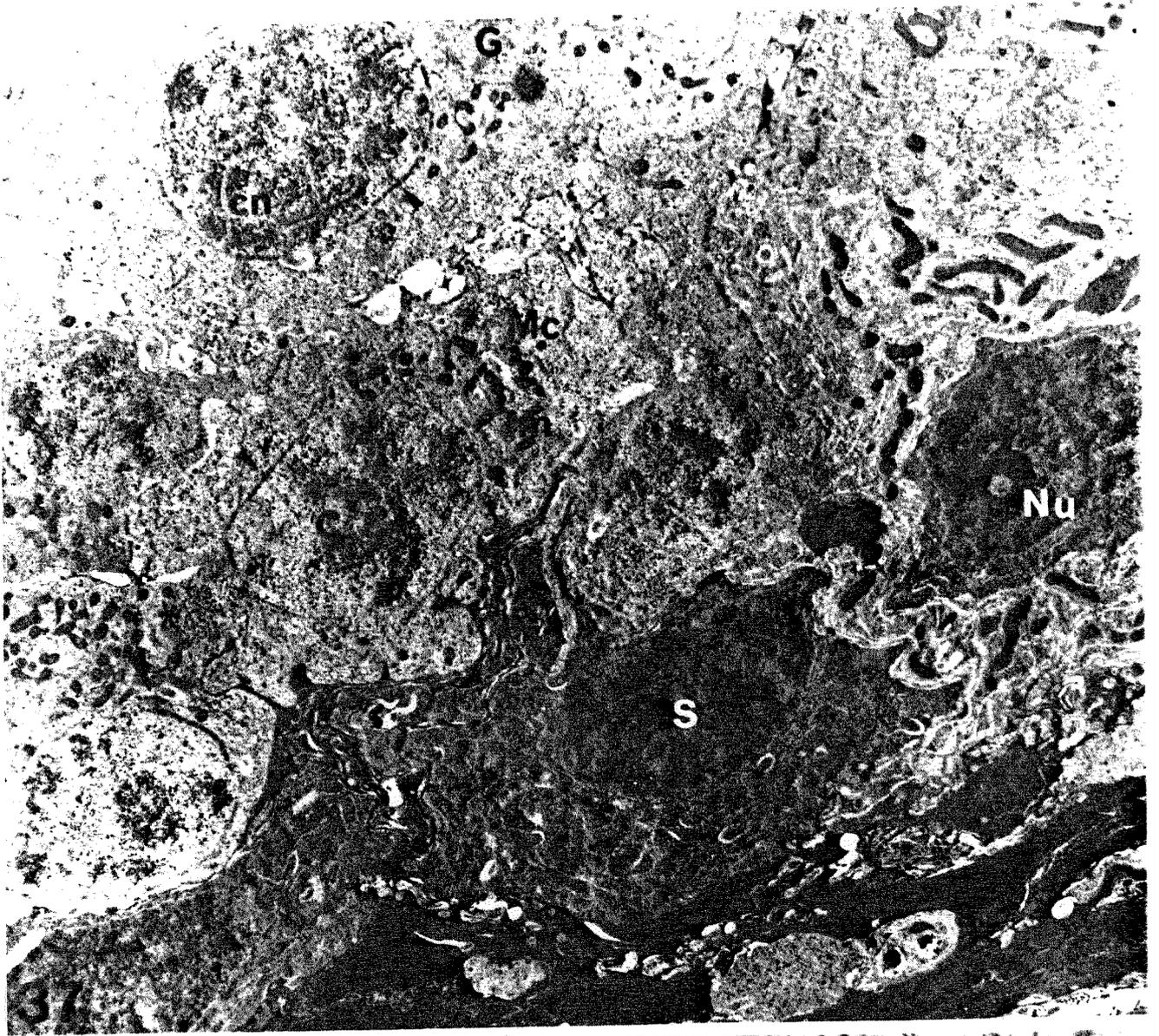
## PRANCHA X

- Figura 35** Detalhe do núcleo de uma célula de Sertoli onde se destaca o nucléolo vacuolizado (Nu) e "corpos enovelados" (cabeça de seta), um dos quais associado ao nucléolo. 15.500X.
- Figura 36** Região basal do epitélio seminífero, na qual visualizam-se: os fibroblastos (Fb) da parede do túbulo; a lâmina basal (lb); a célula de Sertoli (S) com prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta maior) e "corpos enovelados" no interior do seu núcleo; e espermatócitos primários em diplóteno (D) contendo corpo redondo com região interna menos densa (cabeça de seta menor), complexo de Golgi (G) e mitocôndrias (m). 8.000X.



## PRANCHA XI

- Figura 37** Segmento do túbulo seminífero adjacente à parede, no qual salientam-se: as células de Sertoli (S) com nucléolo (Nu) esférico e volumoso e os espermatócitos primários em prófase contendo cromossomos condensados pareados pelos complexos sinaptonêmicos (cn), complexos de poros distribuídos em grupos pelo envólucro nuclear (cabeça de seta menor), ou destacados do núcleo (cabeça de seta maior), complexo de Golgi (G), mitocôndrias (m), e massas citoplasmáticas densas (Mc). Comunicação entre estes espermatócitos também são observadas (\*). 7.200X.
- Figura 38** Detalhe do tecido peritubular onde se observam parte do citoplasma de um fibroblasto (Fb) com seus prolongamentos citoplasmáticos (cabeça de seta) e feixes de fibras colagênicas (Fc). 19.300X.



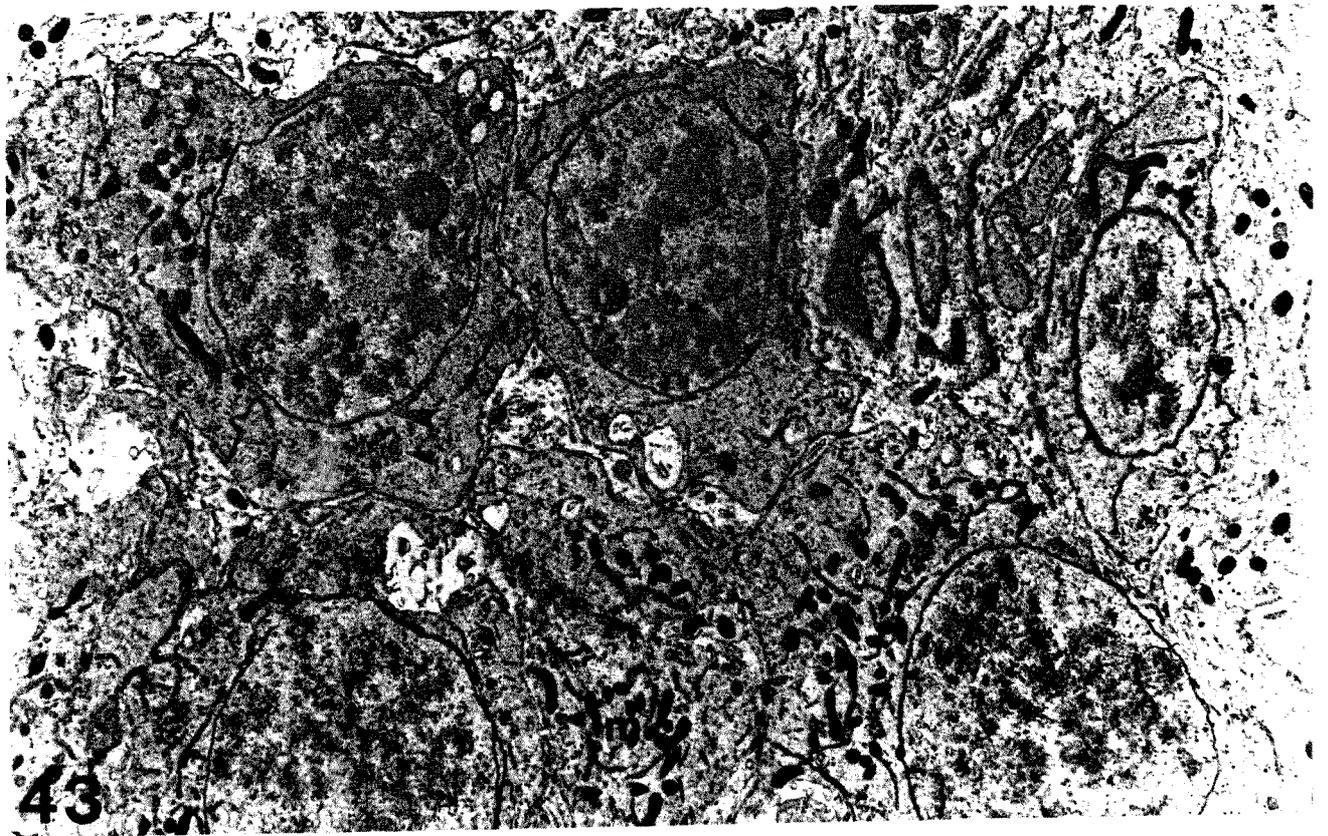
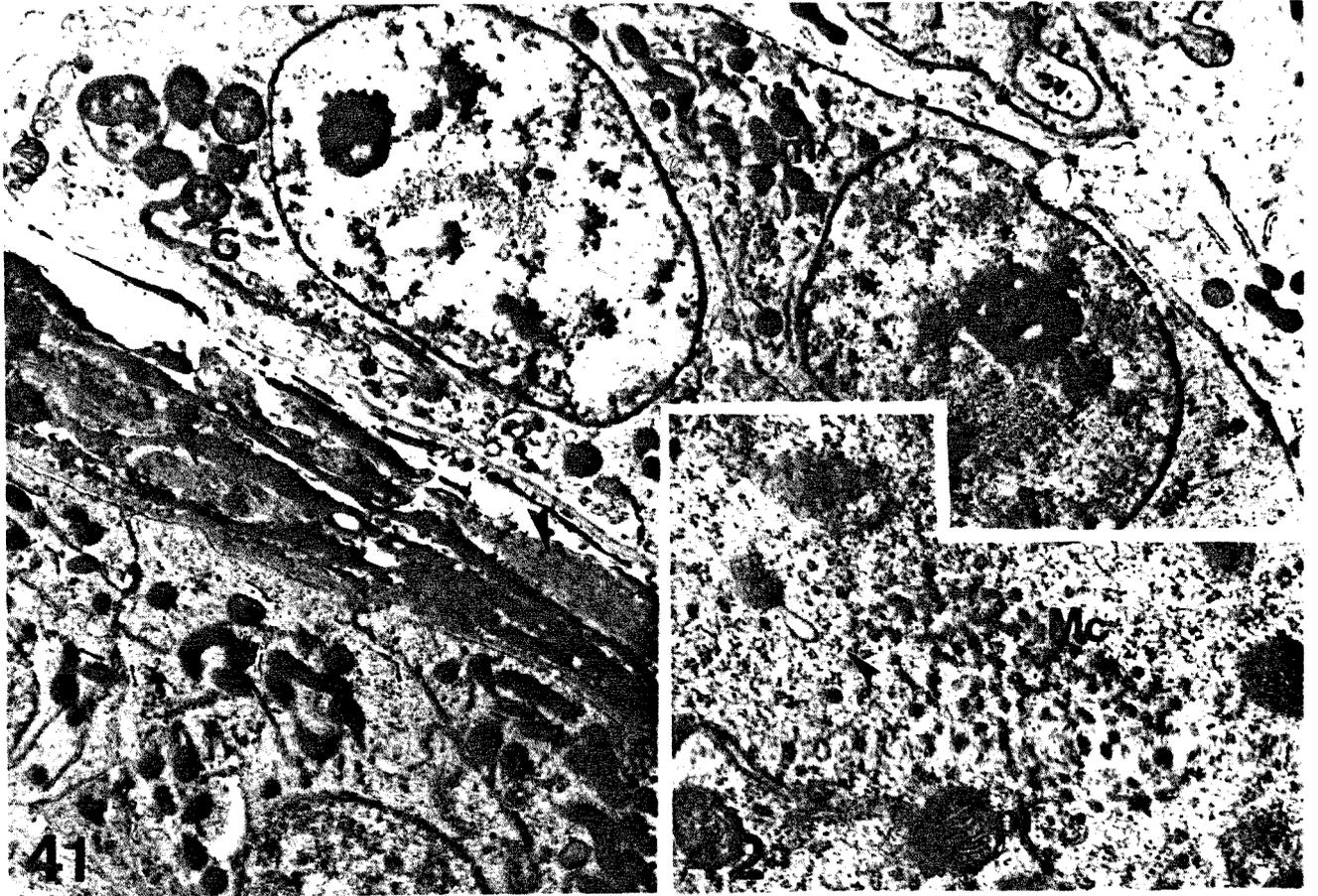
## PRANCHA XII

- Figura 39** Aspecto parcial do epitélio seminal de dois túbulos seminíferos. A figura mostra: fibroblastos (Fb) na parede do túbulo; lâmina basal (lb); célula de Sertoli (S) com núcleo irregular e rico em complexos de poros (cabeça de seta menor); espermatogônias (Eg) contendo nucléolo (Nu), grumos de cromatina mais condensada (cabeça de seta maior) e massas citoplasmáticas densas (Mc); e espermatócitos primários (C) onde se notam complexos sinaptonêmicos (seta), complexo de Golgi (G) e massas citoplasmáticas densas. 6.300X.
- Figura 40** Detalhe de uma espermatogônia. No núcleo observam-se grumos de cromatina condensada (cabeça de seta menor), dois nucléolos (cabeça de seta maior), e uma área constituída de grânulos pequenos (seta). No citoplasma visualizam-se massas citoplasmáticas densas (Mc). 6.400X.



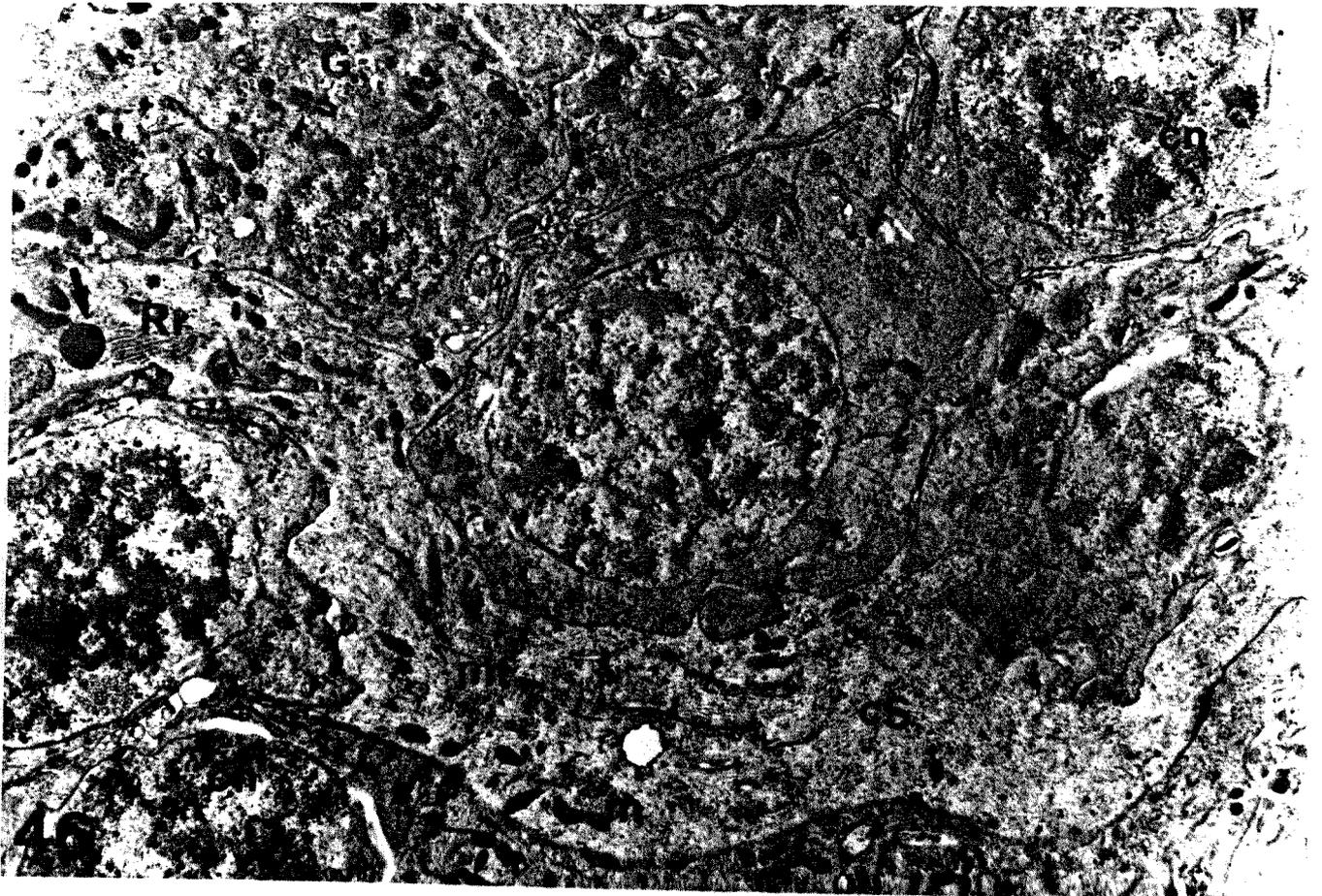
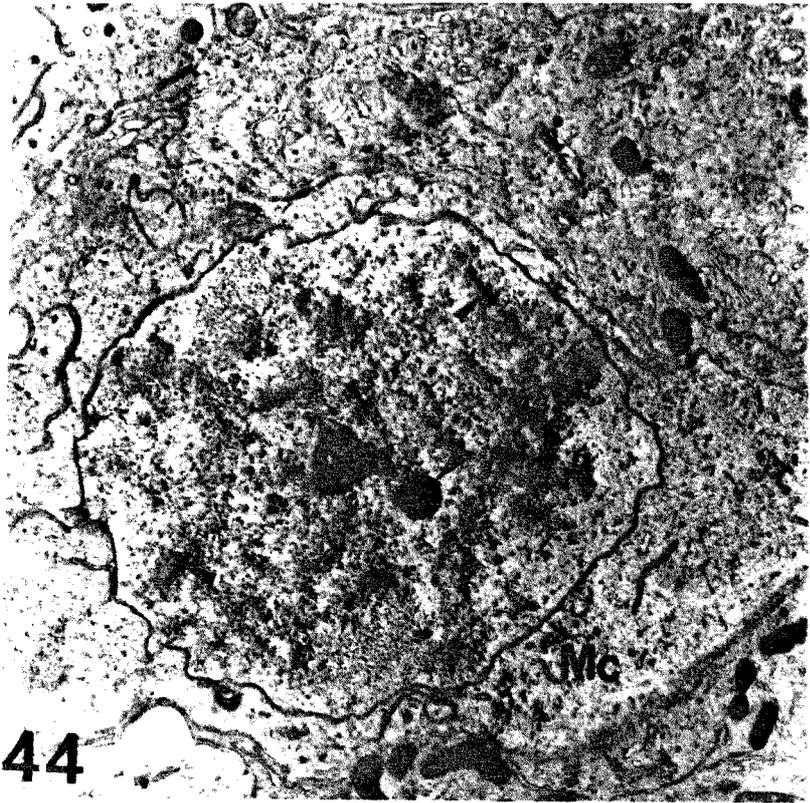
## PRANCHA XIII

- Figura 41** Espermatogônias adjacentes à parede do túbulo seminífero. Observar a posição basal do complexo de Golgi (G) e o nucléolo (Nu) proeminente. No interior da parede visualizam-se partes do citoplasma de células mioepiteliais (cabeça de seta). 8.600X.
- Figura 42** Detalhe do citoplasma de uma espermatogônia contendo polissomos (cabeça de seta), mitocôndrias (m) e massas citoplasmáticas densas (Mc). 27.400X.
- Figura 43** Espermatócitos primários em início de prófase onde se observam: o início da condensação dos cromossomos; o nucléolo compacto (Nu); os complexos de poros distribuídos em grupos pelo envólucro nuclear (cabeça de seta maior); massas citoplasmáticas densas (cabeça de seta menor); cisternas de retículo endoplasmático; e mitocôndrias (m) agrupadas preferencialmente em um polo do citoplasma. 6.300X.



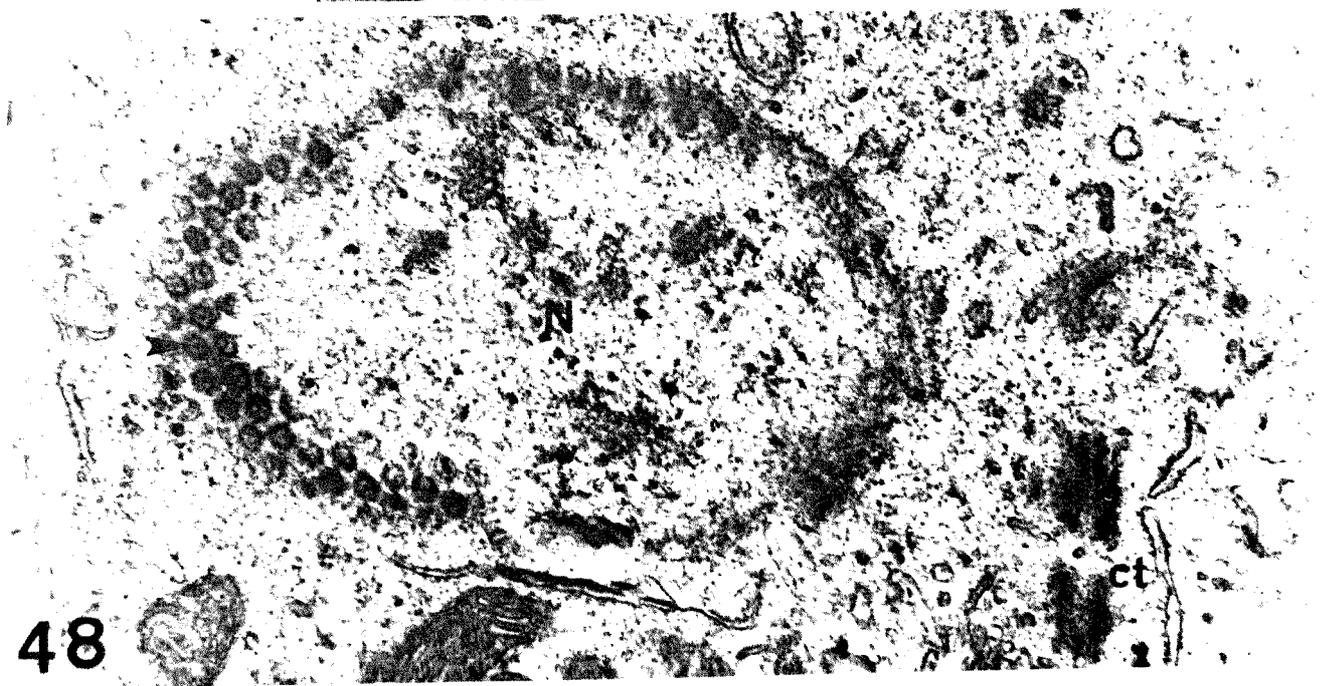
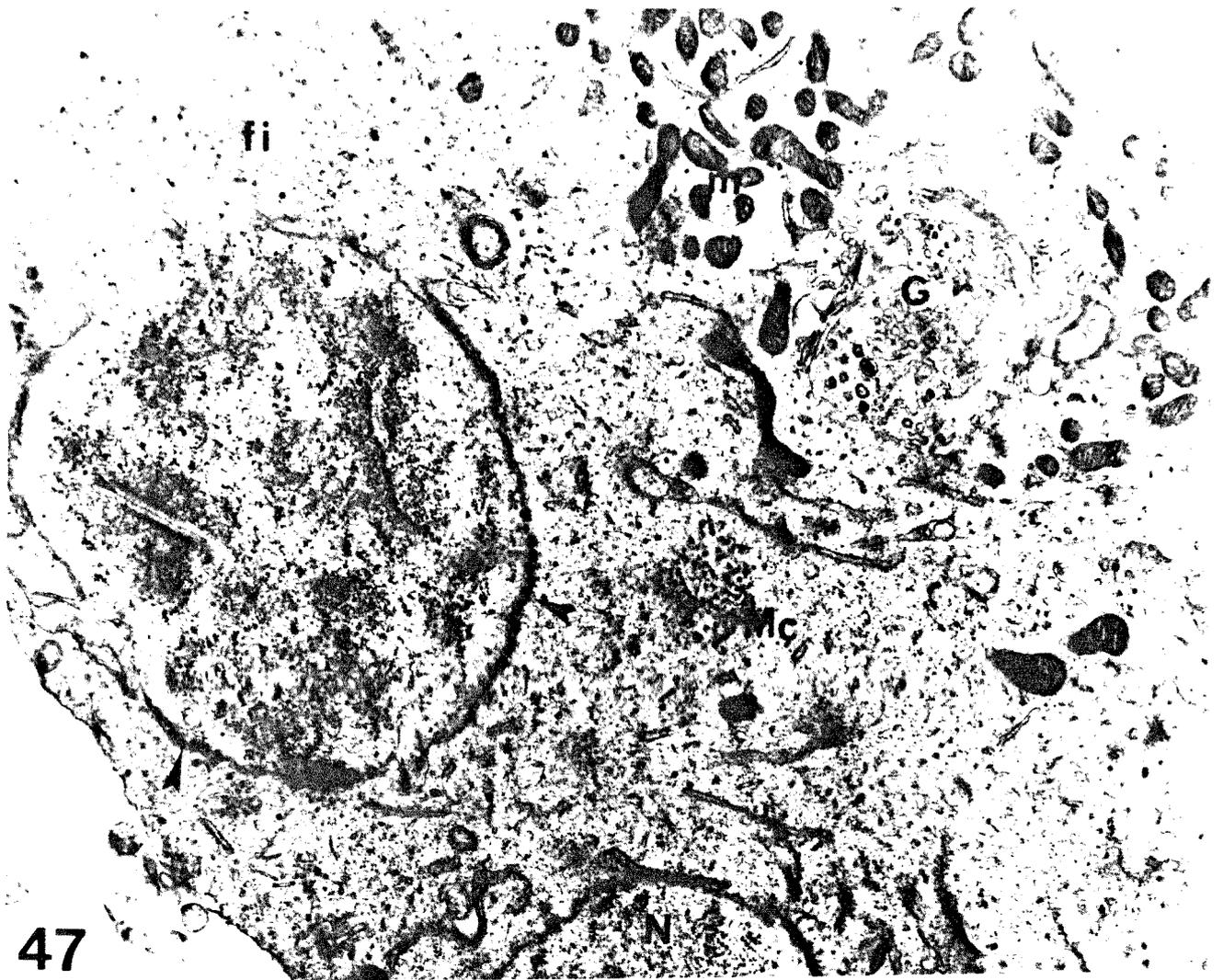
## PRANCHA XIV

- Figura 44** Espermatócito primário em prófase. No citoplasma destacam-se massas citoplasmáticas densas (Mc); no núcleo observam-se os cromossomos descompactados, algumas regiões lineares mais eletrodensas (cabeça de seta menor), e o corpo redondo (cabeça de seta maior). 10.300X.
- Figura 45** Espermatócitos primários em prófase: no núcleo destacam-se cromossomos em condensação e o corpo redondo (cabeça de seta); mitocôndrias(m) se acumulam em uma região do citoplasma e as massas citoplasmáticas densas (Mc) são abundantes. 2.400X.
- Figura 46** Espermatócitos primários em prófase contendo: cromossomos pareados pelos complexos sinaptonêmicos (cn); complexos de poros (cabeça de seta maior) agrupados em conjuntos; centríolos (cabeça de seta menor); complexo de Golgi (G) e massas citoplasmáticas densas (Mc). Entre os espermatócitos, é observado o citoplasma da célula de Sertoli (cS) contendo muitos microtúbulos (mt), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (Rr) e vesícula densa (seta). 2.500X.



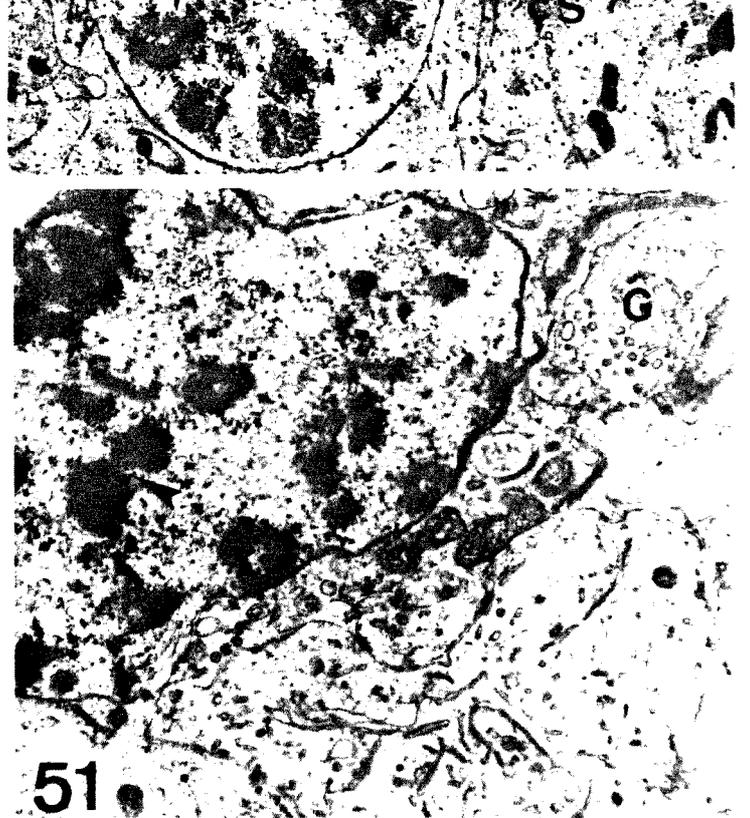
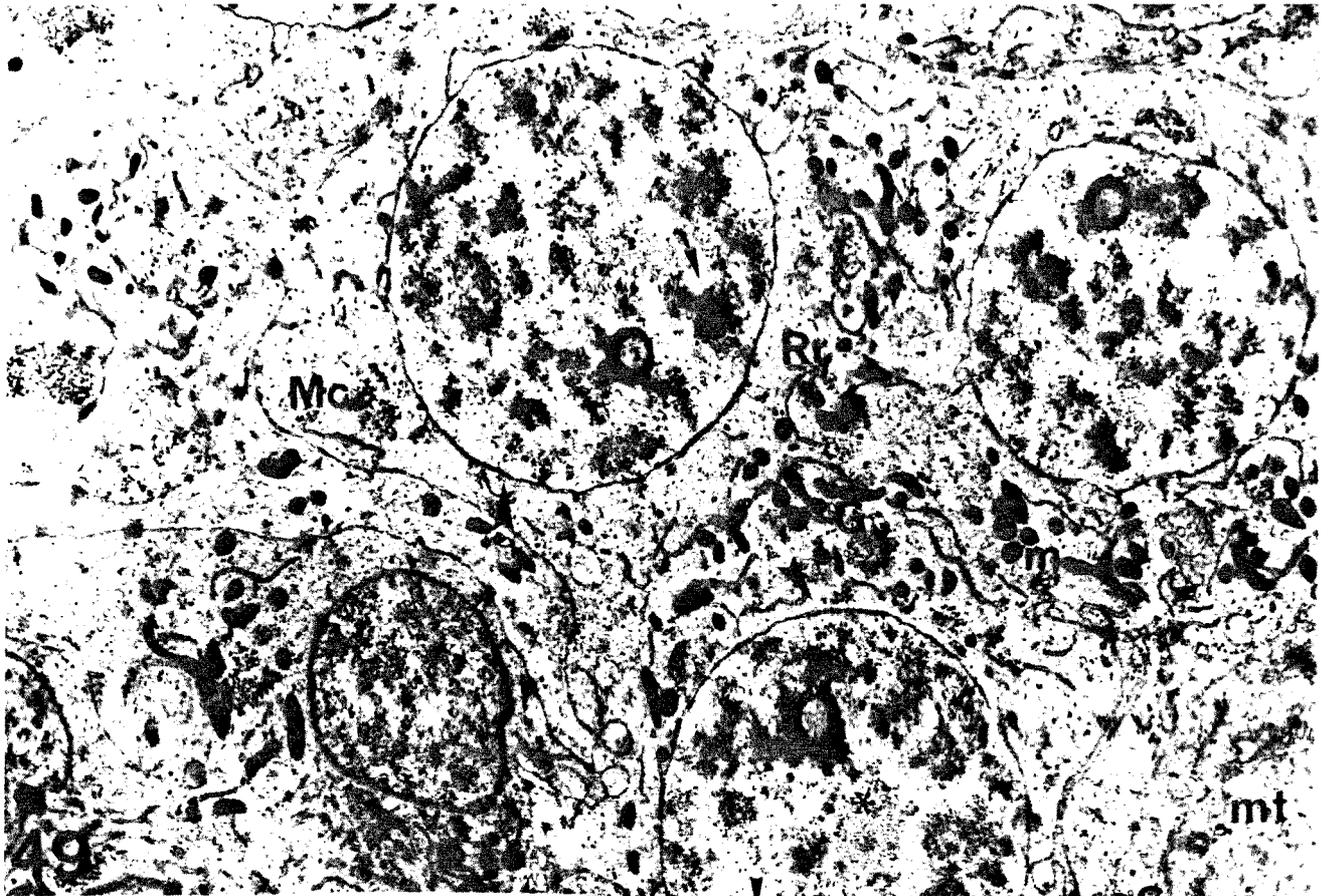
## PRANCHA XV

- Figura 47** Espermatócitos primários em prófase contendo: complexos sinaptonêmicos cujo elemento central (cabeça de seta menor) é bem visível; complexos de poros (cabeça de seta maior); complexo de Golgi (G) rodeado por mitocôndrias (m); massas citoplasmáticas densas (Mc); e feixe de filamentos intermediários (fi). Observar que dois núcleos (N) são visualizados na mesma massa citoplasmática. 15.300X.
- Figura 48** Detalhe da calota nuclear (N) de um espermatócito primário em prófase, contendo inúmeros complexos de poros, cujo elemento central pode ser notado (cabeça de seta). O par de centríolos (ct) é observado na região perinuclear. 32.900X.



## PRANCHA XVI

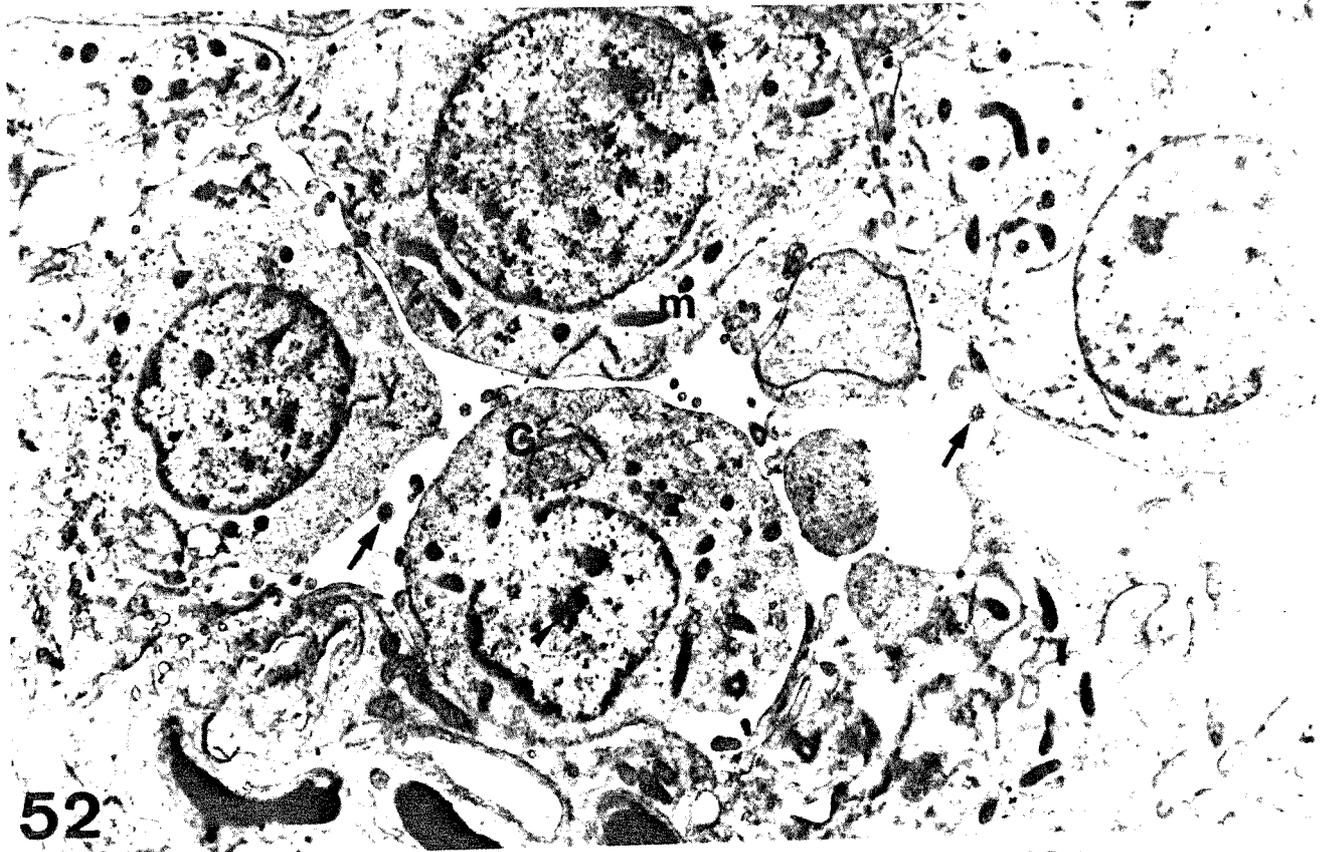
- Figura 49** Espermatócitos primários em diplóteno. A figura mostra: núcleos com cromossomos em condensação (cabeça de seta menor), corpo redondo anelado (seta), e área granular bem delimitada (\*); complexos de poros agrupados em domínios pelo envólucro nuclear (cabeça de seta maior); massas citoplasmáticas densas (Mc); mitocôndrias (m); complexos de Golgi (G); e perfis de retículo endoplasmático granular (Rr). Observar o citoplasma da célula de Sertoli (cS) com inúmeros microtúbulos (mt). 6.600X.
- Figura 50** Núcleo de espermatócito primário em diacinese, contendo cromossomos bastante condensados (seta), corpo redondo (cabeça de seta) e área granular bem delimitada (\*). Notar que o nucleoplasma apresenta-se eletrolúcido. 10.300X.
- Figura 51** Espermatócito em diacinese onde se observam os cromossomos bastante condensados (cabeça de seta) e complexo de Golgi (G). 11.200X.



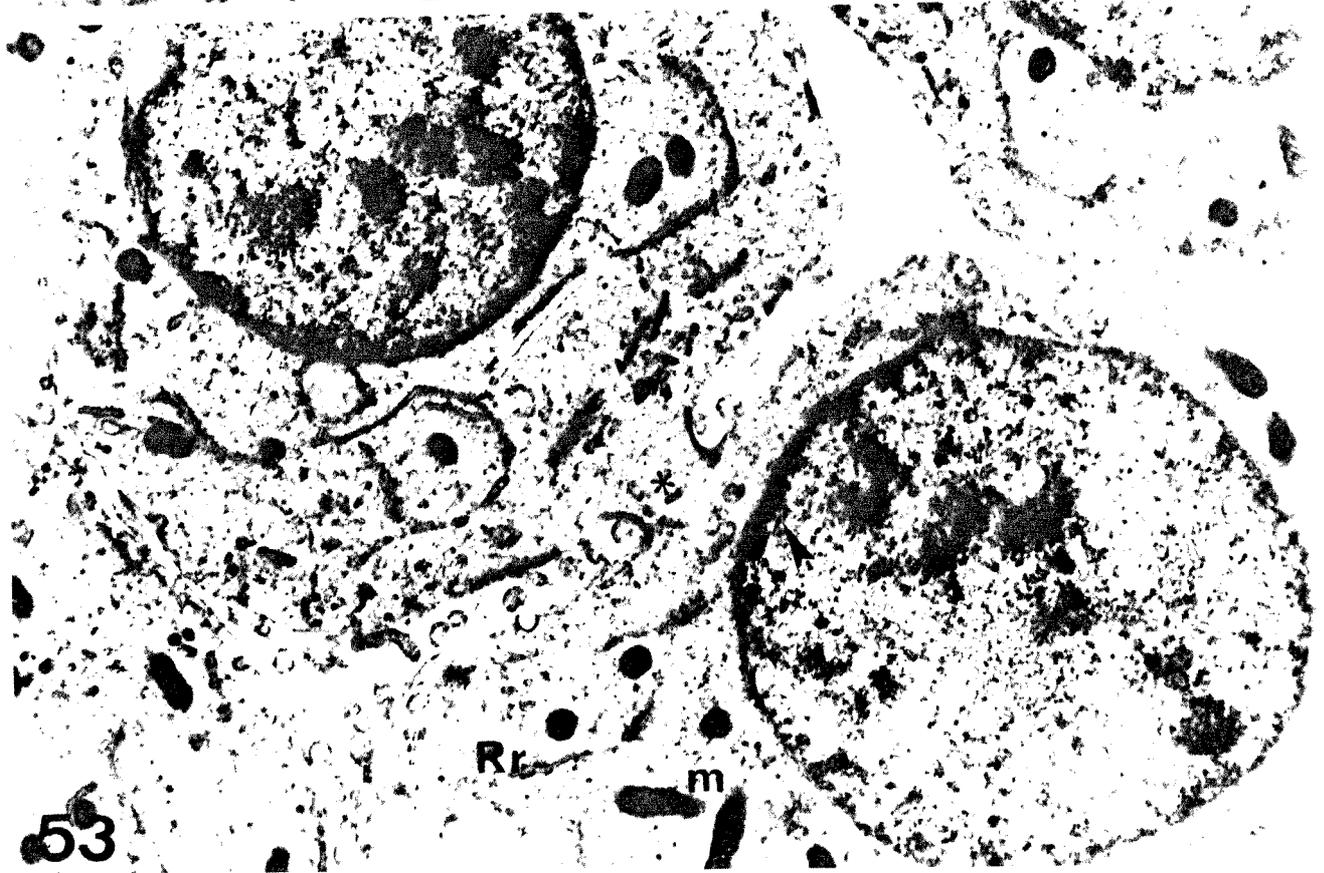
## PRANCHA XVII

**Figura 52** Espermátides E1 com forma poligonal e núcleo esférico. Na figura visualizam-se: a região de cromatina compactada na periferia nuclear (cabeça de seta maior) e grumos condensados (cabeça de seta menor); mitocôndrias (m); cisternas de retículo endoplasmático; e complexo de Golgi (G). As setas indicam flagelos com axonema simples em corte transversal, próximos às espermátides. 6.200X.

**Figura 53** Detalhe de duas espermátides E1 interligadas por ponte citoplasmática (\*), onde se observam: núcleo com a região cromatínica perinuclear (cabeça de seta maior) e grumos de cromatina mais condensada (cabeça de seta menor), mitocôndrias (m) e cisternas de retículo endoplasmático (Rr). 16.200X.



52



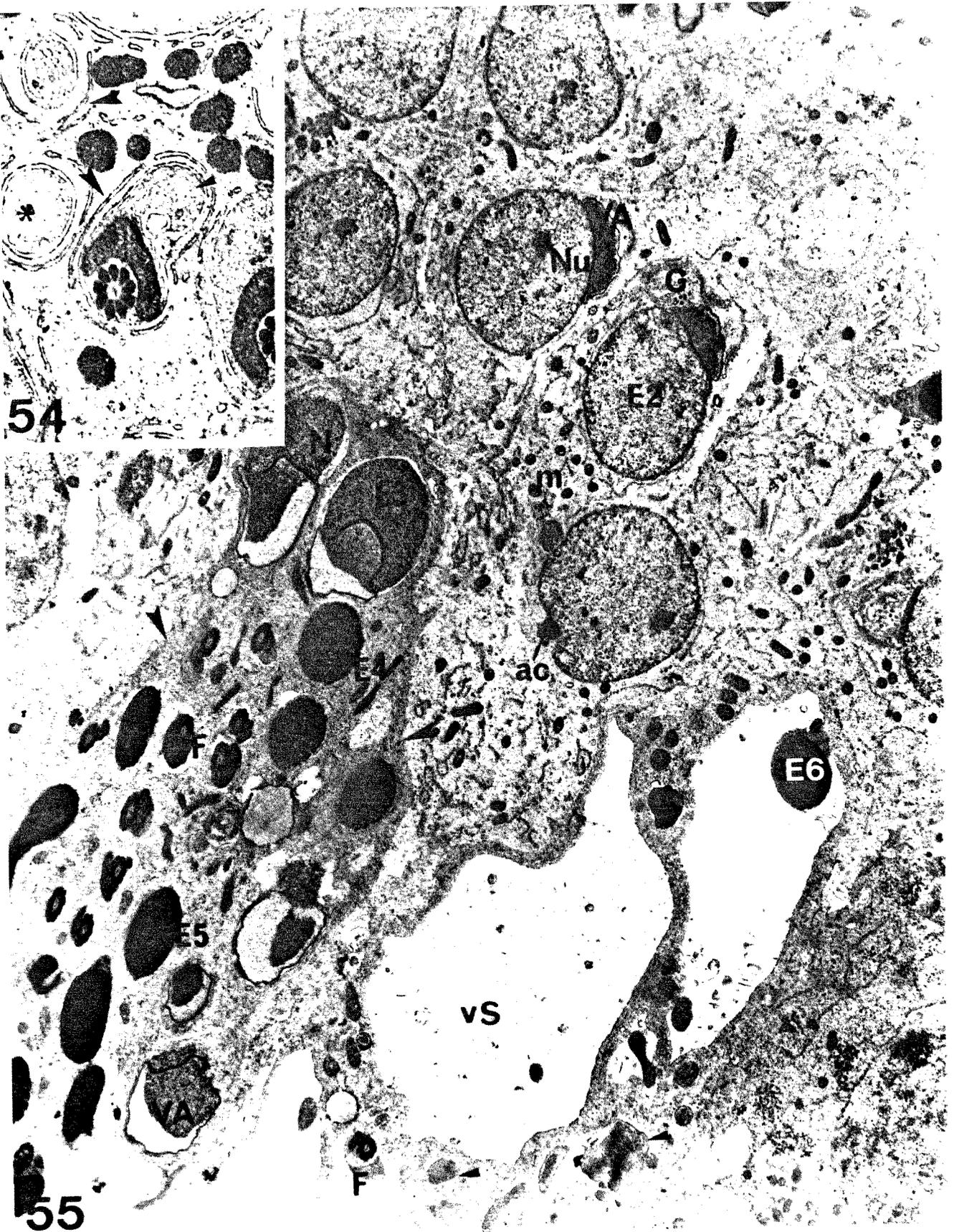
53

## PRANCHA XVIII

- Figura 54** Detalhe do citoplasma da célula de Sertoli na região caudal do feixe de espermatídes. Nesta figura observam-se espermatíde com o feixe de microtúbulos protuberante (cabeça de seta menor), vesículas contendo citoplasma rico em microtúbulos (\*), e cisternas de retículo endoplasmático liso (cabeça de seta maior). 24.200X.
- Figura 55** Parte do epitélio seminal contendo: espermatíde E2 com vesícula acrossomal (VA), material adjunto do centríolo (ac), nucléolo (Nu), mitocôndrias (m), e complexo de Golgi (G); espermatíde E3, E4, e E5 em corte na região da vesícula acrossomal (VA), região nuclear (N) ou caudal (F); e o citoplasma da célula de Sertoli (cabeça de seta maior) com vacúolos (vS), no interior dos quais visualizam-se núcleo (N) e cauda (F) das E6. Neste citoplasma estão presentes de vesículas de citoplasma, rico em microtúbulos, das espermatídes (cabeça de seta menor). 7.500X.



54



55

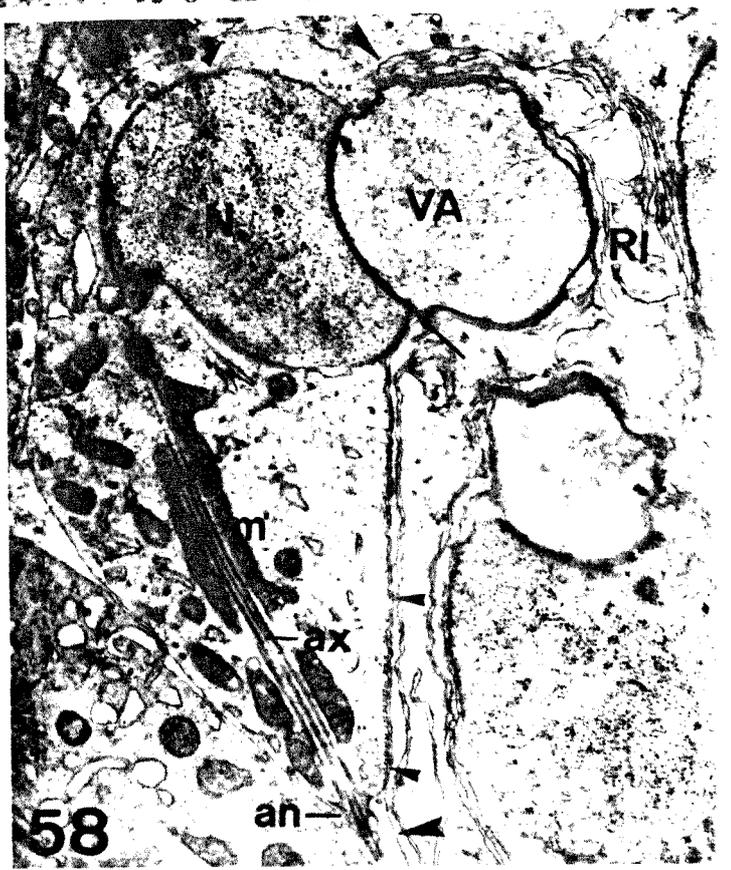
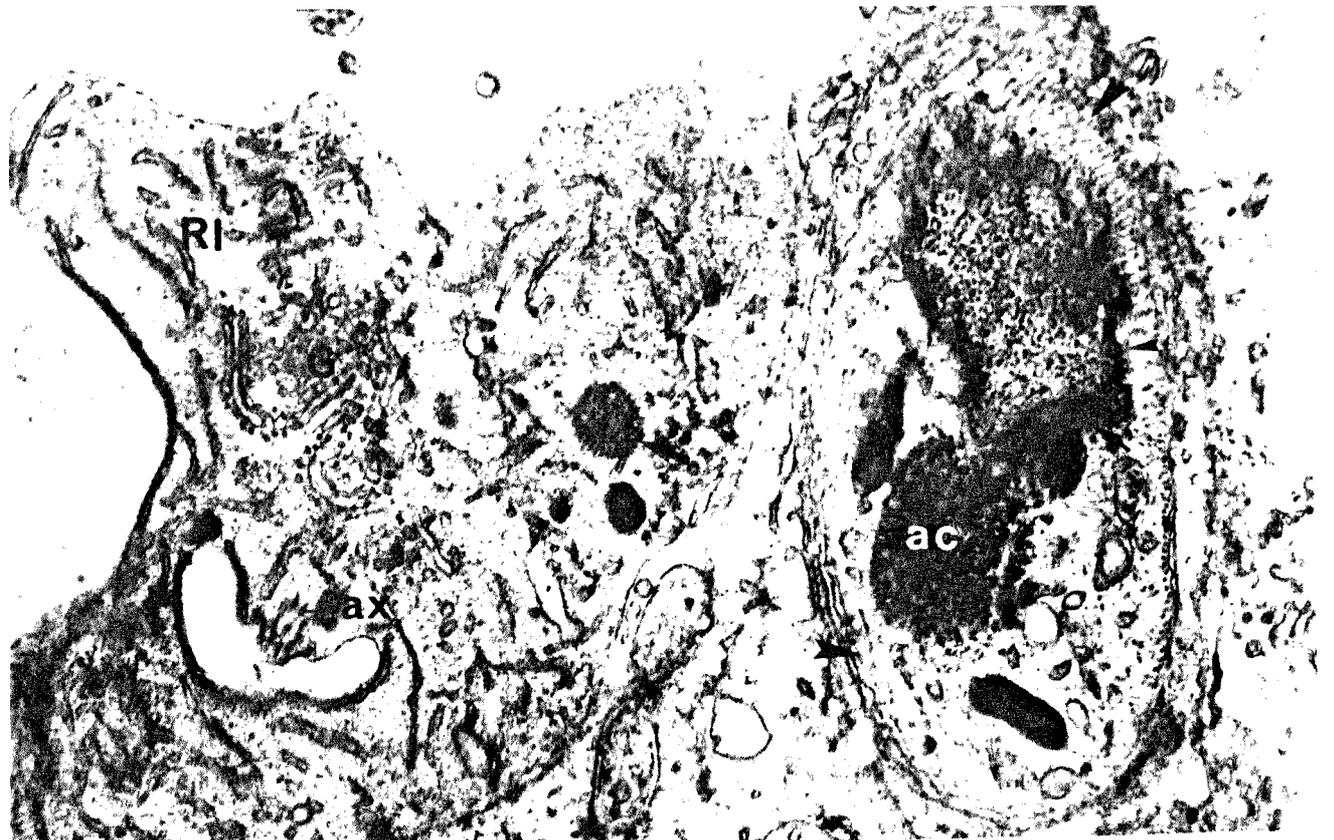
## PRANCHA XIX

**Figura 56** A figura mostra: E2 contendo núcleo com grumos de cromatina mais condensada (seta), vesícula acrossomal com grânulo acrossomal (ga), complexo de Golgi (G) e perfis de retículo endoplasmático liso (RI); E3 contendo cromatina organizada em grânulos, vesícula acrossomal (VA) apoiada sobre um espessamento da membrana nuclear (seta maior), flagelo (F) em desenvolvimento, e mitocôndrias (m); cauda de E5 composta de material adjunto do centríolo (ac), axonema (ax) com fibras densas acessórias (fd), mitocôndria (m), e feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior). Notar o processo da célula de Sertoli alcançando a região caudal das E3 (cabeça de seta menor) e a ponte citoplasmática entre E2 (\*). 20.200X.



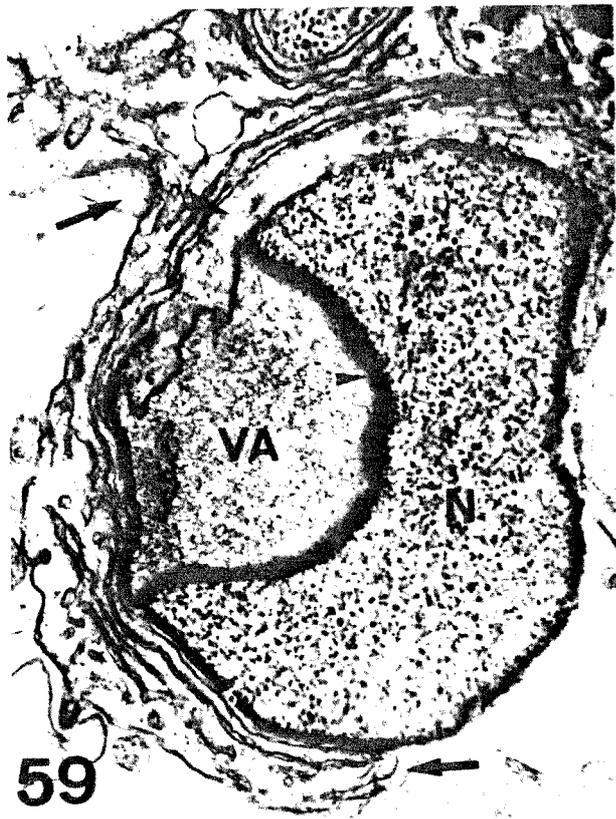
## PRANCHA XX

- Figura 57** Corte tangencial de espermatídes E3. A figura mostra: núcleo (N) com cromatina organizada em grânulos densos; concavidade nuclear preenchida pelo material adjunto do centríolo (seta menor); complexos de poro (cabeça de seta menor), e o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior). Em corte da região caudal desta espermatídes observa-se o citoplasma mais volumoso em um lado do axonema (ax), contendo cisternas de retículo endoplasmático liso (Rl), complexo de Golgi (G) e corpos eletrodensos (seta maior). 25.000X.
- Figura 58** Espermatídes E3 em corte longitudinal. A figura mostra: a vesícula acrossomal (VA) cuja região de contato com o núcleo (N) apresenta-se eletrondensa (seta); o arranjo granular da cromatina; axonema (ax) do flagelo em desenvolvimento; mitocôndrias (m); o "annulus" (an); os microtúbulos (cabeça de seta menor) que perfazem um trajeto helicoidal da cauda até o acrossomo; e processos da célula de Sertoli envolvendo a espermatíde na região acrossomal e caudal (cabeça de seta maior). Na figura também se observa o citoplasma da célula de Sertoli adjacente à vesícula acrossomal contendo cisternas de retículo endoplasmático liso (Rl). 13.500X.



## PRANCHA XXI

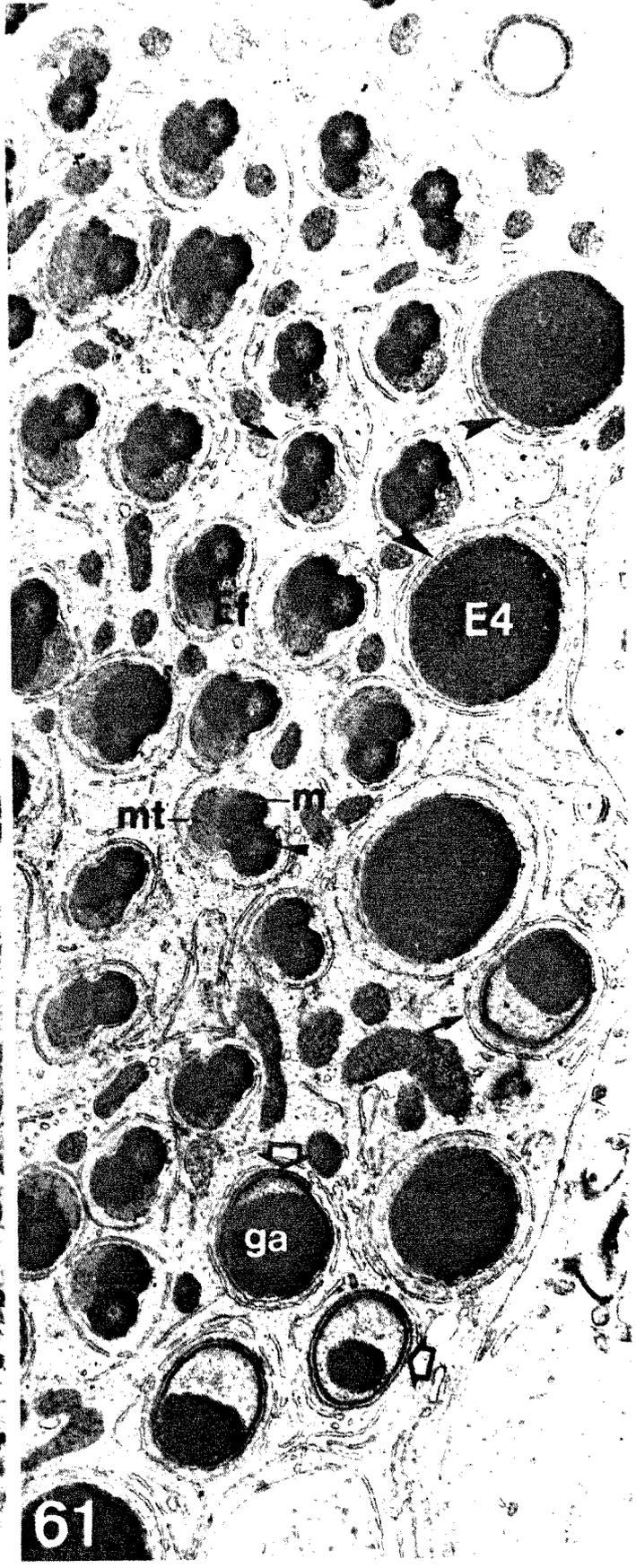
- Figura 59** Corte tangencial em espermátide E3 contendo cromatina organizada em grânulos; vesícula acrossomal (VA) com material eletrodenso depositado internamente à sua membrana (cabeça de seta menor); e o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior) alcançando a região acrossomal. Observar o processo da célula de Sertoli rico em retículo endoplasmático liso envolvendo a espermátide na região acrossomal (seta). 20.000X.
- Figura 60** Espermátides E4 e E5 em corte longitudinal e tangencial. As espermátides E4 apresentam: núcleo com cromatina organizada em cordões espessos; material adjunto do centríolo (ac); e flagelo com fibras densas (cabeça de seta maior). As E5 possuem: núcleo contendo pequenas manchas eletrolúcidas e material adjunto do centríolo bastante alongado (seta). Notar que a dupla central de microtúbulos do axonema parece alcançara região anterior do flagelo (cabeça de seta menor). 7.000X.
- Figura 61** Corte transversal de um feixe de espermátides. Na figura observam-se: núcleo das E4 com regiões eletrodensas arredondadas, os cordões cromatínicos, e o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior); acrossomos das E4 com grânulo acrossomal (ga) e material eletrodenso depositado internamente à sua membrana; região caudal das espermátides finais (Ef), contendo o axonema rodeado pelas nove fibras densas (cabeça de seta menor), a mitocôndria (m) e o feixe de microtúbulos (mt); cisternas de retículo endoplasmático liso ao redor das espermátides (setas) e o material eletrodenso depositado internamente à membrana da célula de Sertoli (seta oca). 15.700X.



59



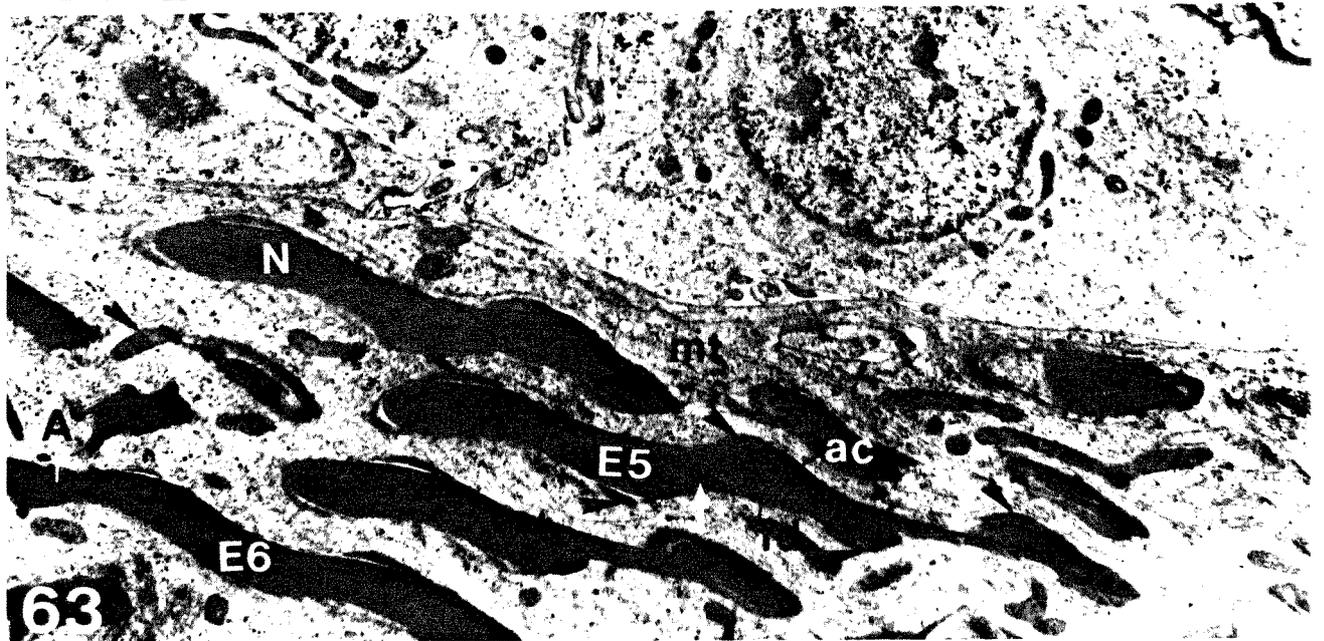
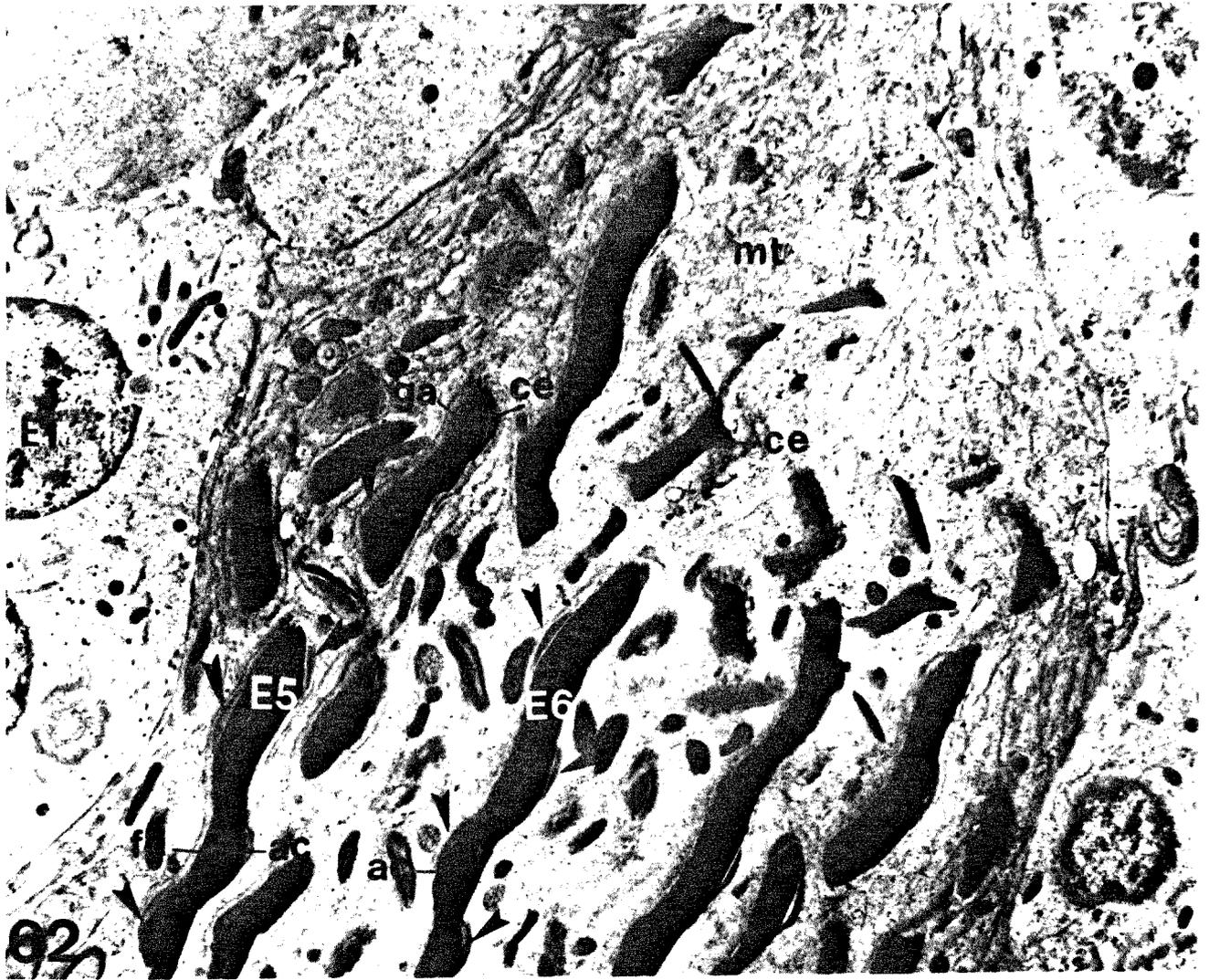
60.



61

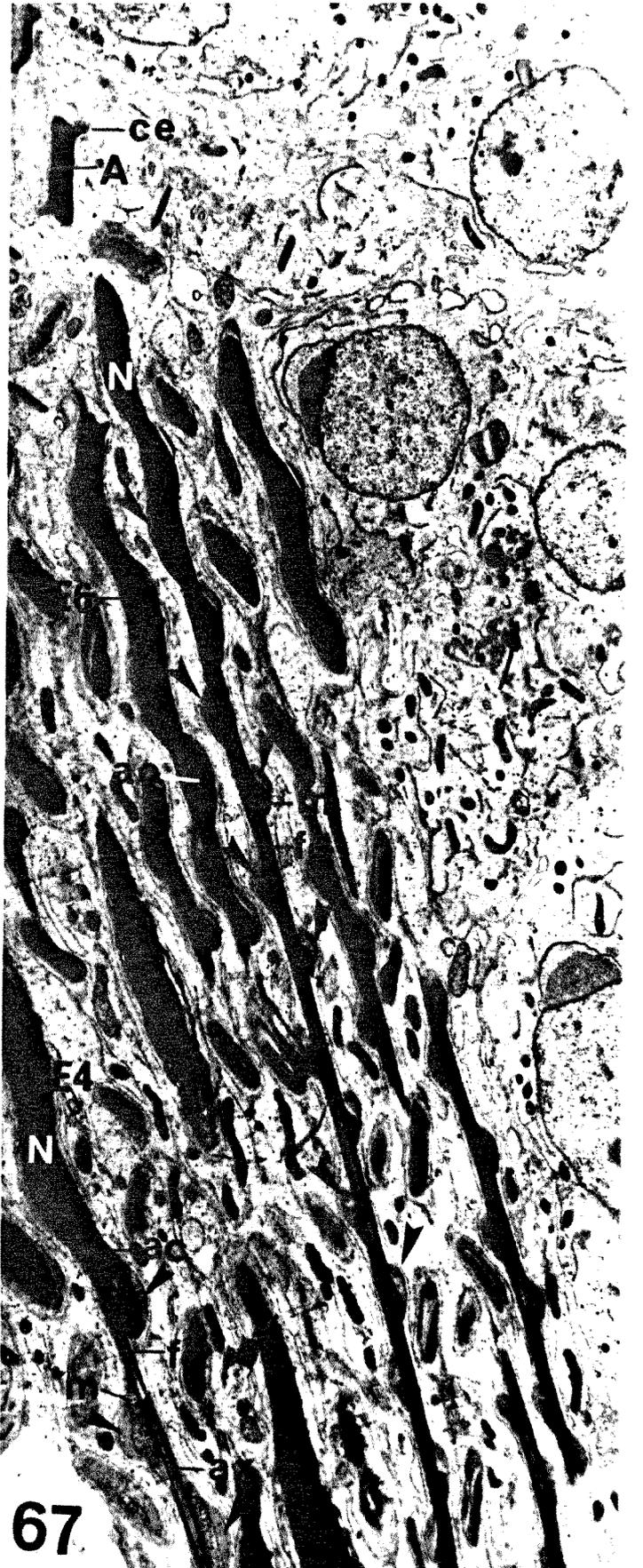
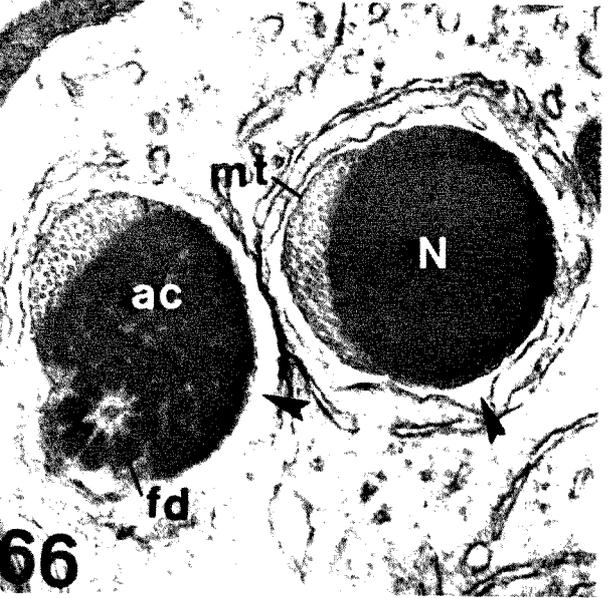
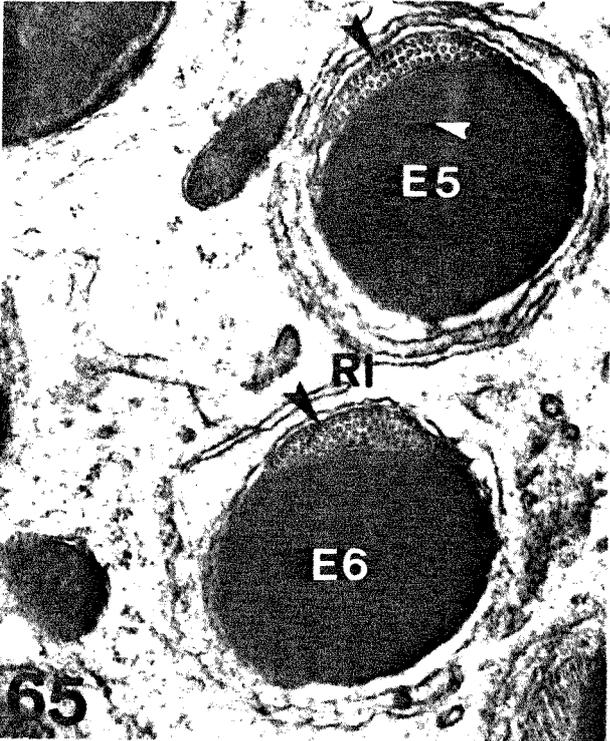
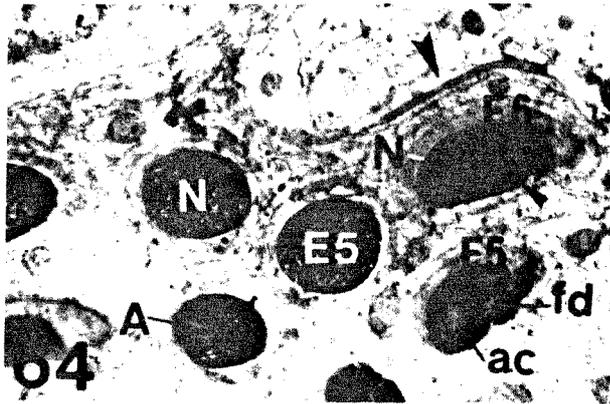
## PRANCHA XXII

- Figura 62** Corte longitudinal na região superior de um feixe de espermátides finais rodeado por espermátides iniciais (E1). As E5 apresentam: acrossomo com grânulo acrossomal (ga) e crista espiral (ce) em início de formação; núcleo com cromatina bastante compactada restando apenas pequenas áreas eletrolúcidas; o material adjunto do centríolo (ac) e fibras densas (fd). As espermátides E6 apresentam acrossomo com crista espiral; núcleo totalmente eletrodenso; fibras densas associadas ao axonema; e material adjunto do centríolo. Observar o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior) nas convexidades das espermátides e o citoplasma da célula de Sertoli com diminutas vesículas (cabeça de seta menor) e microtúbulos (mt). 7.300X.
- Figura 63** Feixe de espermátides E5 e E6. A E5 apresenta: núcleo com algumas regiões eletrolúcidas; material adjunto do centríolo (ac); material pericentríolar (seta); axonema com fibras densas acessórias (fd); e feixe de microtúbulos (cabeça de seta). As E6 possuem núcleo (N) totalmente eletrodenso, acrossomo (A), e organização da cauda muito semelhante à E5. Observar os microtúbulos (mt) do citoplasma da célula de Sertoli. 8.600X.



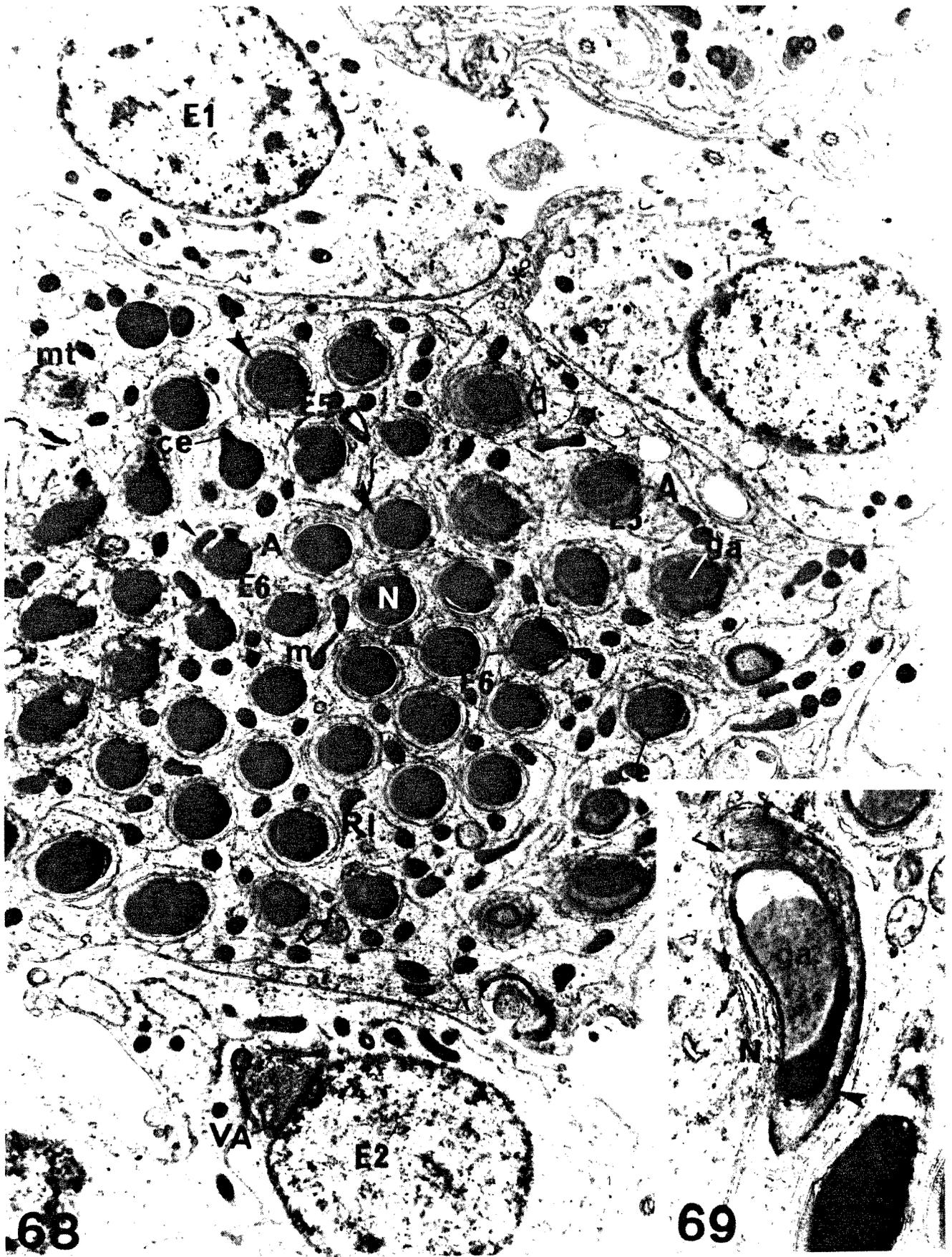
## PRANCHA XXIII

- Figura 64** Corte oblíquo de espermatídes finais. A figura mostra: núcleos (N) de E5 com cromatina quase totalmente compactada restando apenas pequenas áreas eletrólúcidas; um desses núcleos foi cortado próximo do acrossomo (A); início da região caudal de E5 com axonema, fibras densas (fd) e material adjunto do centríolo (ac); início da região caudal de E6 contendo parte do núcleo, material adjunto do centríolo e material pericentriolar com forma estrelada (cabeça de seta menor). Observar a extensa região de junção de membrana entre o citoplasma da célula de Sertoli e espermatíde adjacente (cabeça de seta maior). 10.000X.
- Figura 65** Corte aproximadamente transversal na região nuclear de espermatídes E5 e E6. A figura mostra: pequenas áreas eletrólúcidas (cabeça de seta menor) no núcleo da E5; o feixe de microtúbulos adjacente ao núcleo (cabeça de seta maior); e cisternas de retículo endoplasmático liso (RI) da célula de Sertoli. 26.500X.
- Figura 66** Espermatídes E6 em corte aproximadamente transversal na região nuclear (N) e início da região caudal. Na figura observam-se: feixe de microtúbulos (mt); fibras densas acessórias (fd); e material adjunto do centríolo (ac). Notar o espaço entre as espermatídes e a célula de Sertoli (cabeça de seta). 27.400X.
- Figura 67** Corte longitudinal de feixe de espermatídes. A figura evidencia: E4 com núcleo (N) alongado, cauda helicoidal constituída de axonema (ax), fibras densas (fd), mitocôndrias (m) e o feixe de microtúbulos (cabeça de seta); E6 contendo acrossomo (A) com crista espiral (ce), núcleo, material adjunto do centríolo (ac), axonema com fibras densas, mitocôndria e feixe de microtúbulos (cabeça de seta). Observar que a mitocôndria e o feixe de microtúbulos são encontrados por toda a extensão da cauda. A seta indica uma ponte citoplasmática entre espermatídes E2. 6.300X.



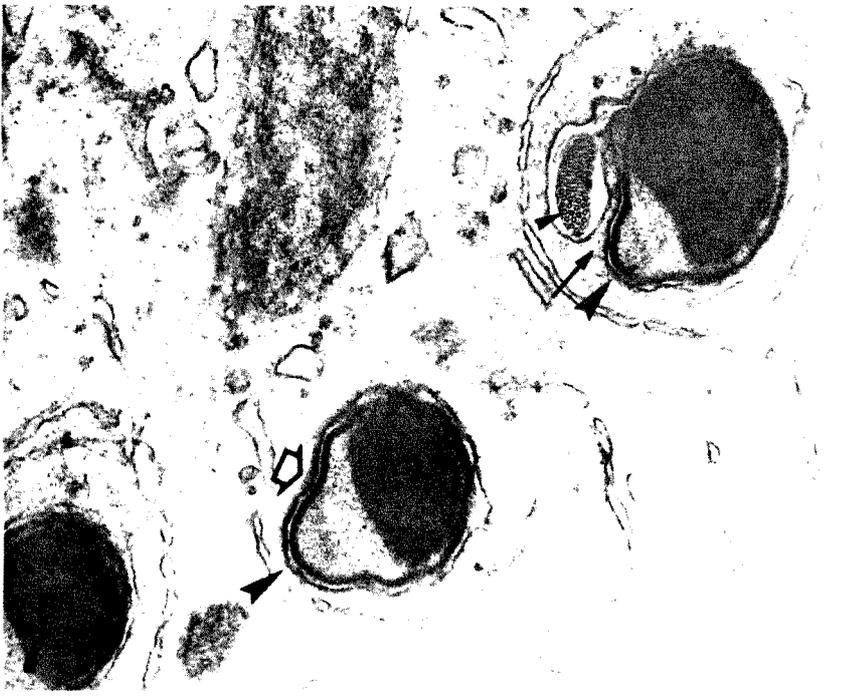
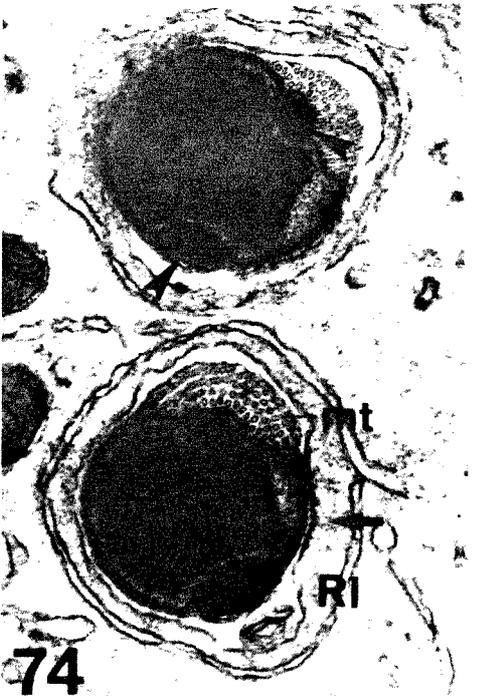
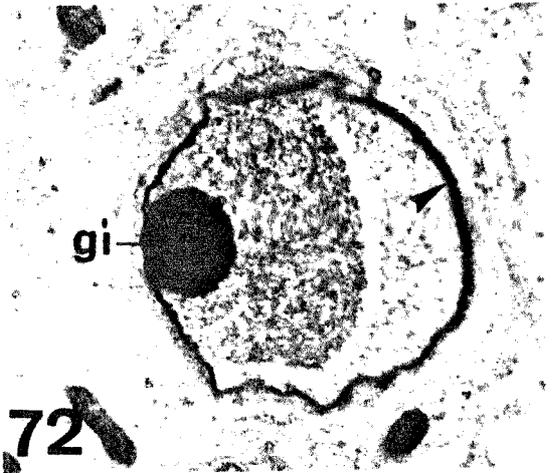
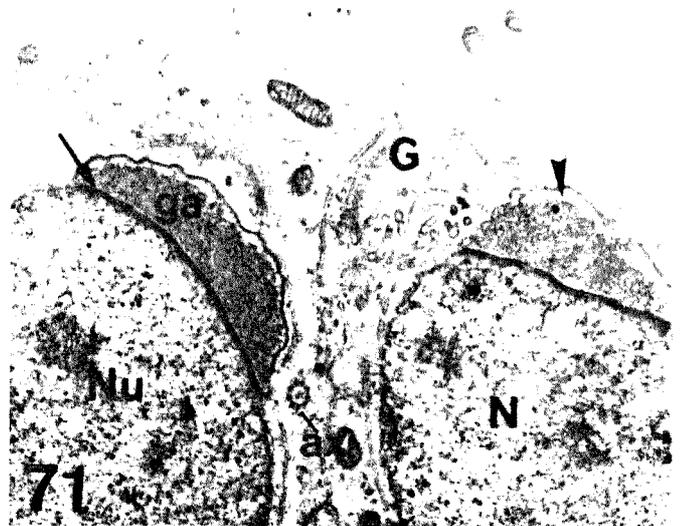
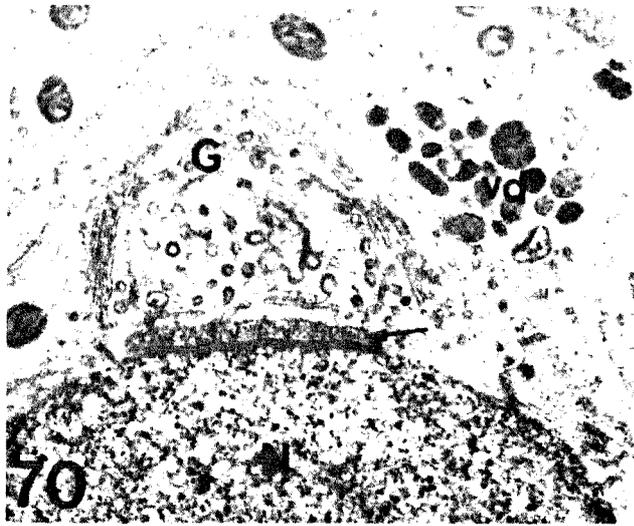
## PRANCHA XXIV

- Figura 68** A figura mostra: E2 com vesícula acrossomal (VA) e complexo de golgi (G); núcleo (N) de E5 e E6 associado ao feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior); acrossomo (A) de E5 com grânulo acrossomal (ga) e início da formação da crista espiral, e feixe de microtúbulos associado (cabeça de seta menor); início da cauda de E6 contendo parte do núcleo (seta menor), material adjunto do centríolo (ac), e o material pericentriolar com forma estrelada (seta maior); citoplasma da célula de Sertoli com mitocôndrias (m), microtúbulos (mt), cisternas de retículo endoplasmático liso (RI), e material eletrodense apostado ao acrossomo (seta oca); região de junção de membrana entre a célula de Sertoli e espermatíde ( ); e processo da célula de Sertoli envolvendo a espermatíde inicial (\*). 10.200X.
- Figura 69** Corte oblíquo de espermatídes E5 onde se observam: parte do núcleo (N), o acrossomo com grânulo acrossomal (ga), feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior) alcançando o acrossomo (cabeça de seta menor), e um pequeno processo da célula de Sertoli penetrando entre o acrossomo e o feixe de microtúbulos. 19.200X.



## PRANCHA XXV

- Figura 70** Início da formação da vesícula acrossomal. A figura mostra: o complexo de Golgi (G), a vesícula acrossomal (seta) e um grupo de vesículas densas (vd). Observar a deposição de material eletrodense no lado interno da membrana acrossomal que está em contato com o núcleo (N). 21.600X.
- Figura 71** Espermátides E2 contendo: núcleo (N) com nucléolo (Nu); vesícula acrossomal com grânulo acrossomal (ga) e uma estreita faixa eletrólucida (cabeça de seta); complexo de Golgi (G); material eletrodense (seta) depositado na região de contato entre o núcleo e a vesícula acrossomal. Entre as espermátides observa-se um axonema (ax) flagelar em corte transversal. 15.300X.
- Figura 72** Corte transversal da vesícula acrossomal de espermátides E3 onde se observa o grânulo acrossomal e no seu interior o grânulo acrossomal interno (gi). Notar o material eletrodense depositado internamente à membrana acrossomal (cabeça de seta). 17.900X.
- Figura 73** Corte longitudinal através do acrossomo de E3 em início de alongação. Na figura observa-se parte do núcleo (N) com cromatina granular; a vesícula acrossomal com grânulo (ga) e material eletrodense depositado internamente à sua membrana (cabeça de seta). 15.000X.
- Figura 74** Corte transversal de espermátides E5 na região distal do acrossomo, próxima ao núcleo. Na figura observam-se: as projeções nucleares (cabeça de seta); o acrossomo com grânulo acrossomal (ga); o feixe de microtúbulos (mt); o citoplasma da célula de Sertoli com material eletrodense adjacente ao acrossomo (seta) e cisternas de retículo endoplasmático liso (Rl). 17.900X.
- Figura 75** Corte aproximadamente transversal na região acrossomal de espermátides E5 onde se notam: a protuberância no acrossomo indicando o surgimento da crista espiral (cabeça de seta maior); grânulo acrossomal (ga); o feixe de microtúbulos (cabeça de seta menor); um pequeno processo da célula de Sertoli (seta) penetrando entre o acrossomo e o feixe de microtúbulos; e material eletrodense da célula de Sertoli nas adjacências do acrossomo (seta oca). 31.000X.



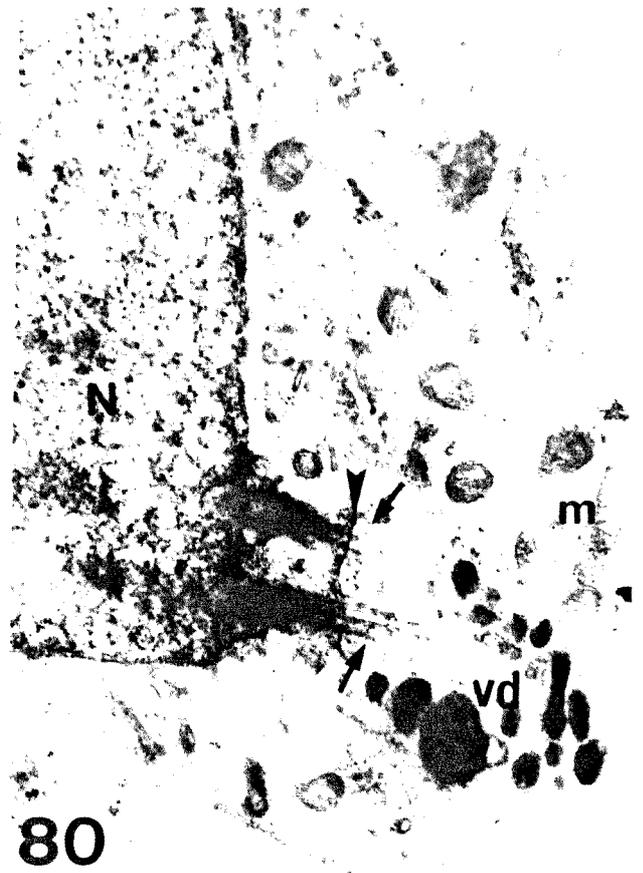
## PRANCHA XXVI

- Figura 76** Espermátides E4 e E6 em corte longitudinal. A figura mostra: E4 com núcleo (N) alongado e cromatina formando cordões densos, acrossomo alongado, com grânulo acrossomal (ga); cauda constituída de material adjunto do centríolo (ac), axonema com fibras densas (fd), mitocôndrias (m) e feixe de microtúbulos (cabeça de seta); E6 contendo núcleo com cromatina muito compactada e duas projecções anteriores, e acrossomo (A) com crista espiral (ce). 10.400X.
- Figura 77** Espermátides E5 e E6 em cortes tangenciais e aproximadamente transversais, na região da cauda, onde se notam: acrossomos das E5 com grânulo acrossomal e crista espiral (ce) em início de formação, acrossomos das E6 com crista espiral (cabeça de seta maior), algumas das quais cortadas superficialmente (cabeça de seta menor). As setas mostram o material eletrodense do citoplasma da célula de Sertoli, aposto aos acrossomos. 9.500X.
- Figura 78** Corte oblíquo em espermátides E6 onde se observam: parte do núcleo (N); o acrossomo (A) com crista espiral saliente (cabeça de seta menor), algumas das quais cortadas superficialmente (cabeça de seta maior); e material eletrodense da célula de Sertoli nas adjacências dos acrossomos (setas). 9.300X.



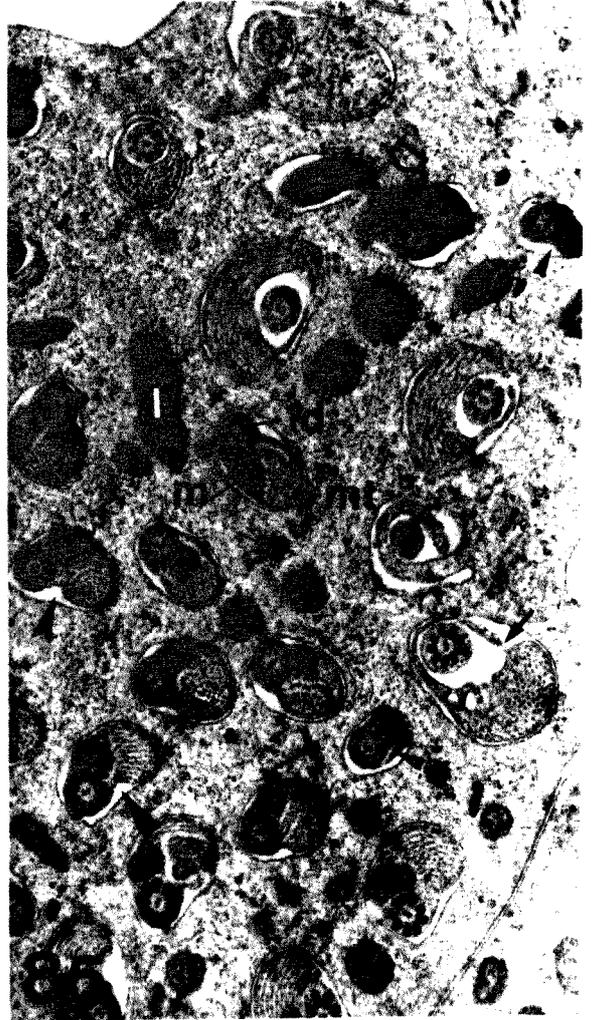
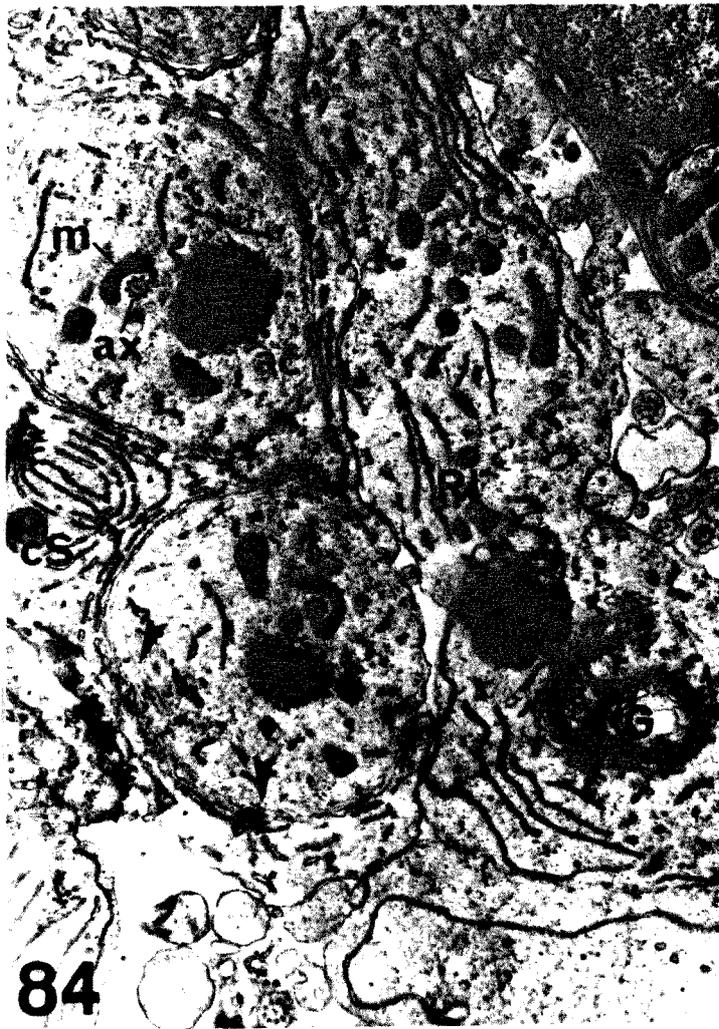
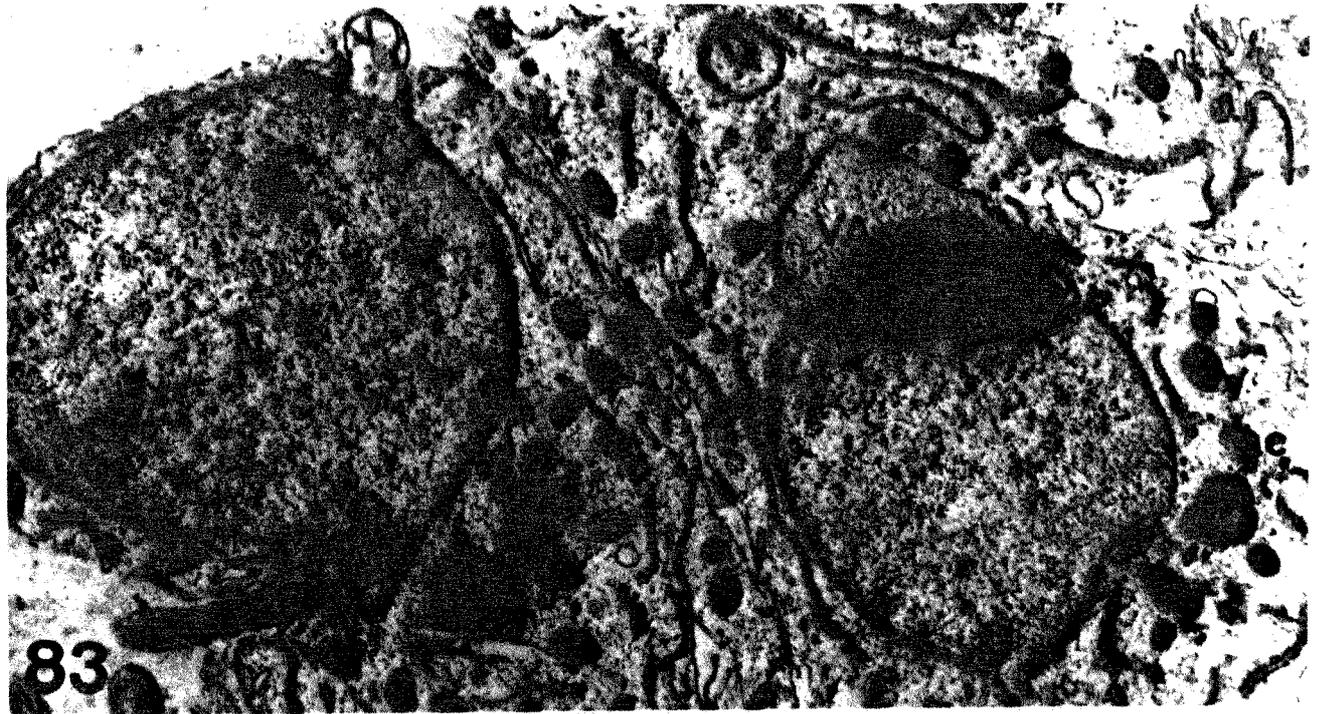
## PRANCHA XXVII

- Figura 79** Vista parcial de espermatíde E2 onde se observam: vesícula acrossomal (VA) em desenvolvimento, associada ao núcleo (N); dois centríolos, um dos quais em contato com o núcleo (cabeça de seta); complexo de Golgi (G); mitocôndrias (m) e cisternas de retículo endoplasmático liso (RI). 22.800X.
- Figura 80** Parte de espermatíde E2 anômala, na qual visualizam-se: os microtúbulos do axonema flagelar em crescimento (setas) a partir dos centríolos adjacentes ao núcleo; o "annulus" (cabeça de seta) cortado longitudinalmente; mitocôndrias (m); e vesículas densas (vd). 25.800X.
- Figura 81** Corte longitudinal através do flagelo em formação de E2. A figura mostra: centríolo (seta) apoiado numa dupla concavidade nuclear, a partir do qual originam-se os microtúbulos do axonema (ax); o "annulus" (an); e vesículas densas (vd). A dupla central de microtúbulos do axonema flagelar é visualizada (cabeça de seta). 23.800X.
- Figura 82** Espermatídes E2 ligadas por ponte citoplasmática (\*). Em uma das espermatídes, adjacente ao complexo de Golgi (G) e à vesícula acrossomal (VA), visualiza-se o axonema flagelar em corte tangencial (cabeça de seta). 12.600X.



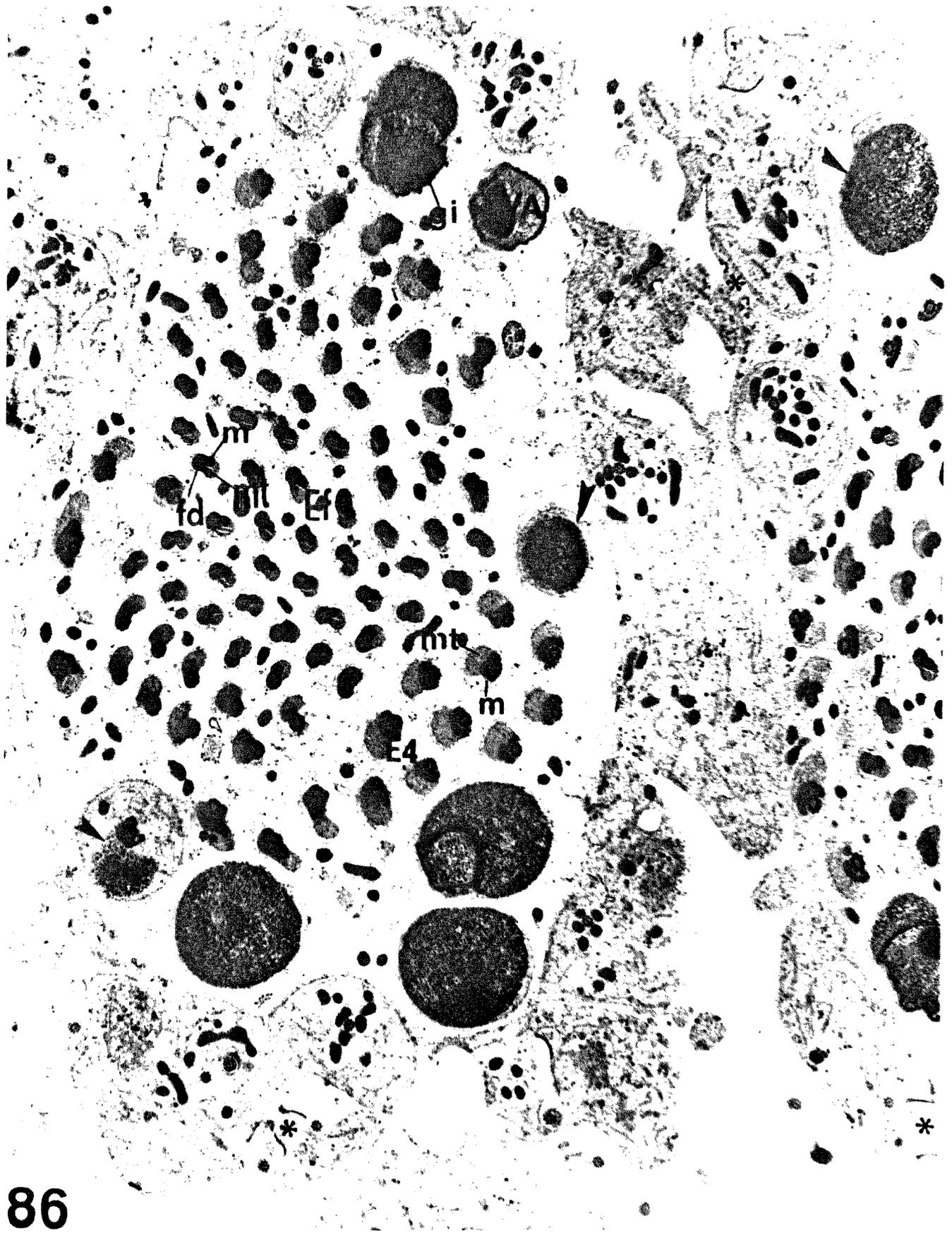
## PRANCHA XXVIII

- Figura 83** Espermátides E2 onde se observam: o flagelo em crescimento apoiado em uma concavidade nuclear (seta) e afastado da vesícula acrossomal (VA), o "annulus" (cabeça de seta) e o material adjunto do centríolo (ac). 16.700X.
- Figura 84** Corte transversal na região caudal das E3. A figura mostra: material adjunto do centríolo (ac); axonema (ax) com fibras densas; mitocôndrias (m); microtúbulos (cabeça de seta maior); lobo citoplasmático contendo perfis de retículo endoplasmático liso (RI), complexo de Golgi (G) e estrutura esférica eletrodensa (\*); e o citoplasma da célula de Sertoli (cS) rico em cisternas de retículo endoplasmático liso num arranjo reticulado. 12.600X.
- Figura 85** Feixe de espermátides finais na região terminal da cauda onde são encontradas: caudas constituídas de axonema com fibras densas (fd), mitocôndria (m) e feixe de microtúbulos (mt); caudas onde o feixe de microtúbulos não é mais visualizado (cabeça de seta menor); caudas com o feixe de microtúbulos separado do axonema (seta); duas espermátides muito próximas prestes a ocuparem o mesmo vacúolo (seta oca); e lisossomos (l) no citoplasma da célula de Sertoli. Notar o espaço existente entre as espermátides e o citoplasma da célula de Sertoli (cabeça de seta maior). 19.300X.



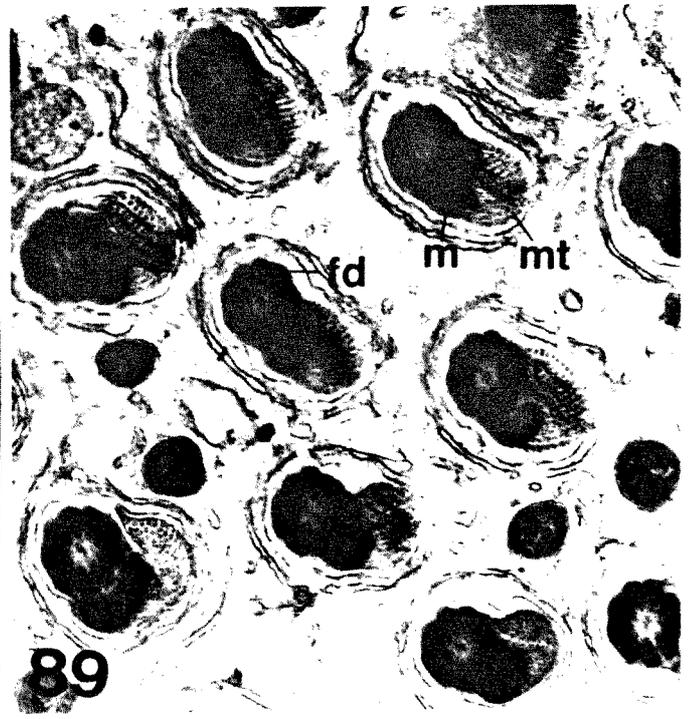
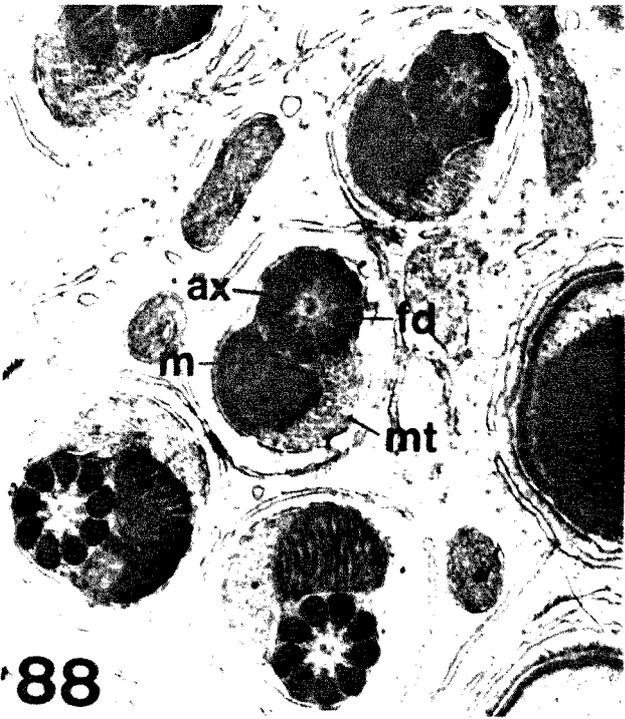
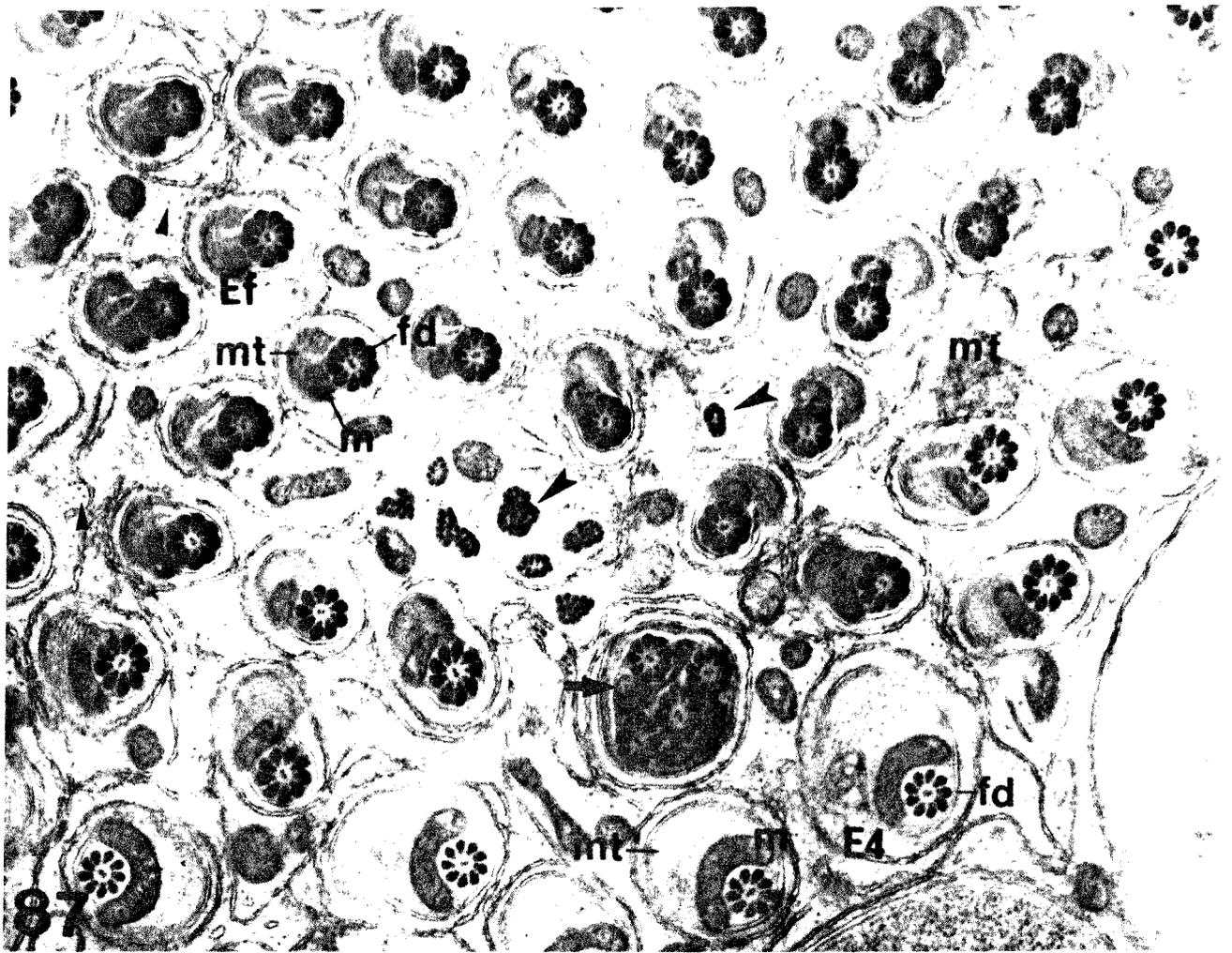
## PRANCHA XXIX

**Figura 86** Feixe de espermátides finais (Ef), em corte transversal rodeado por E3. A figura mostra: cauda das espermátides finais e E4 com axonema rodeado por fibras densas (fd), mitocôndrias (m) e feixe de microtúbulos (mt); E3 com cromatina formando grumos densos, vesícula acrossomal (VA) com grânulo acrossomal e grânulo acrossomal interno (gi), e complexos de poros (cabeça de seta). As pontes citoplasmáticas são comuns na região caudal destas espermátides (\*). 7.500X.



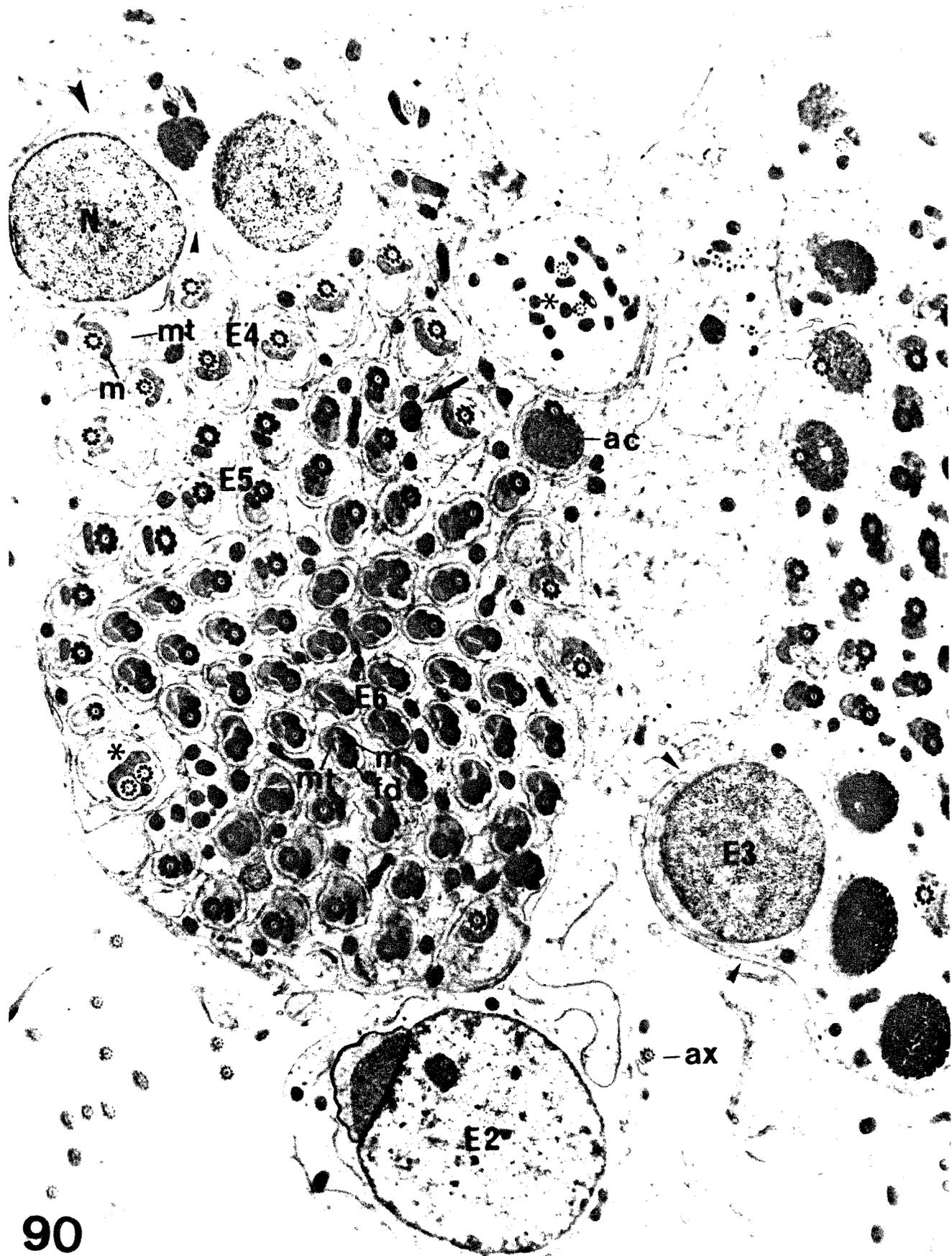
## PRANCHA XXX

- Figura 87** Vista parcial de um feixe de espermátides cortadas transversalmente na região caudal. A figura mostra: cauda de espermátides finais (Ef) e E4 constituídas de axonema 9+2 associado às fibras densas (fd), mitocôndria (m) e feixe de microtúbulos (mt) cortados longitudinalmente; E4 anômala (seta) contendo quatro axonemas associados às fibras densas e duas mitocôndrias; citoplasma da célula de Sertoli com microtúbulos (cabeça de seta menor), cortados transversalmente e aglomerados de estruturas semelhante às fibras densas (cabeça de seta maior). 19.000X.
- Figura 88** Região caudal de espermátides finais (E5 ou E6) em corte transversal onde se observam: o axonema (ax) com seu padrão 9 + 2 de microtúbulos; fibras densas (fd) reniformes; o feixe de microtúbulos (mt); e mitocôndria (m). 29.200X.
- Figura 89** Espermátides finais em corte tangencial da cauda onde se notam: axonema com as fibras densas (fd); mitocôndria (m); microtúbulos do feixe (mt) seccionados transversalmente; e cisternas de retículo endoplasmático liso (cabeça de seta) entre os microtúbulos. 23.700X.



## PRANCHA XXXI

**Figura 90** Feixes de espermátides finais seccionados transversalmente na região caudal e rodeados por espermátides menos maduras. A figura mostra: E2 com axonema flagelar (ax) adjacente; E3 com núcleo (N), material adjunto do centríolo (ac) e microtúbulos (cabeça de seta maior); cauda de E4, E5 e E6 constituídas pelo material adjunto do centríolo, axonema com fibras densas acessórias (fd), mitocôndrias (m) e feixe de microtúbulos (mt); espermátides anômalas (\*) contendo dois axonemas; vesícula densa (seta) no citoplasma da célula de Sertoli; e processos deste citoplasma envolvendo as E3 (cabeça de seta menor). 9.500X.



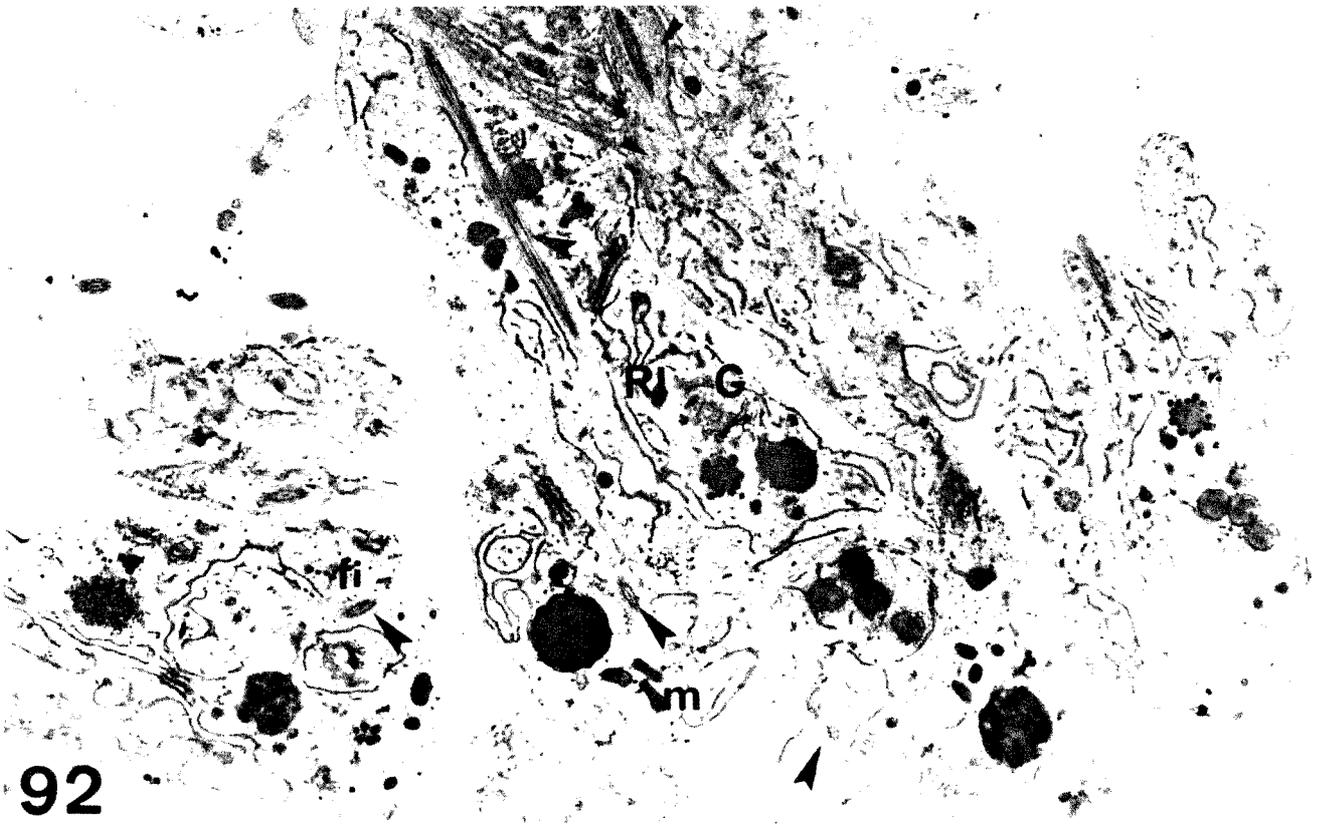
## PRANCHA XXXII

- Figura 91** Resíduos de eliminação citoplasmática em corte transversal ligados por pontes citoplasmáticas (\*) onde se encontram: perfis de retículo endoplasmático liso (Rl), mitocôndrias (m), complexo de Golgi (G), prováveis lisossomos (l), material eletrodenso (seta), e axonemas flagelares (cabeça de seta maior). Um destes resíduos apresenta citoplasma mais eletrodenso e rico em membranas (cabeça de seta menor). 15.300X.
- Figura 92** Resíduos de eliminação citoplasmática em corte longitudinal associados à região terminal da cauda de espermátides E4. Na figura observam-se: o feixe de microtúbulos (cabeça de seta menor); axonema flagelar (cabeça de seta maior); cisternas de retículo endoplasmático liso (Rl); mitocôndrias (m); complexos de Golgi (G); feixe de filamentos intermediários (fi); e lisossomos (l) contendo vesículas eletrodensas menores na sua periferia ou interior. 6.700X.

91

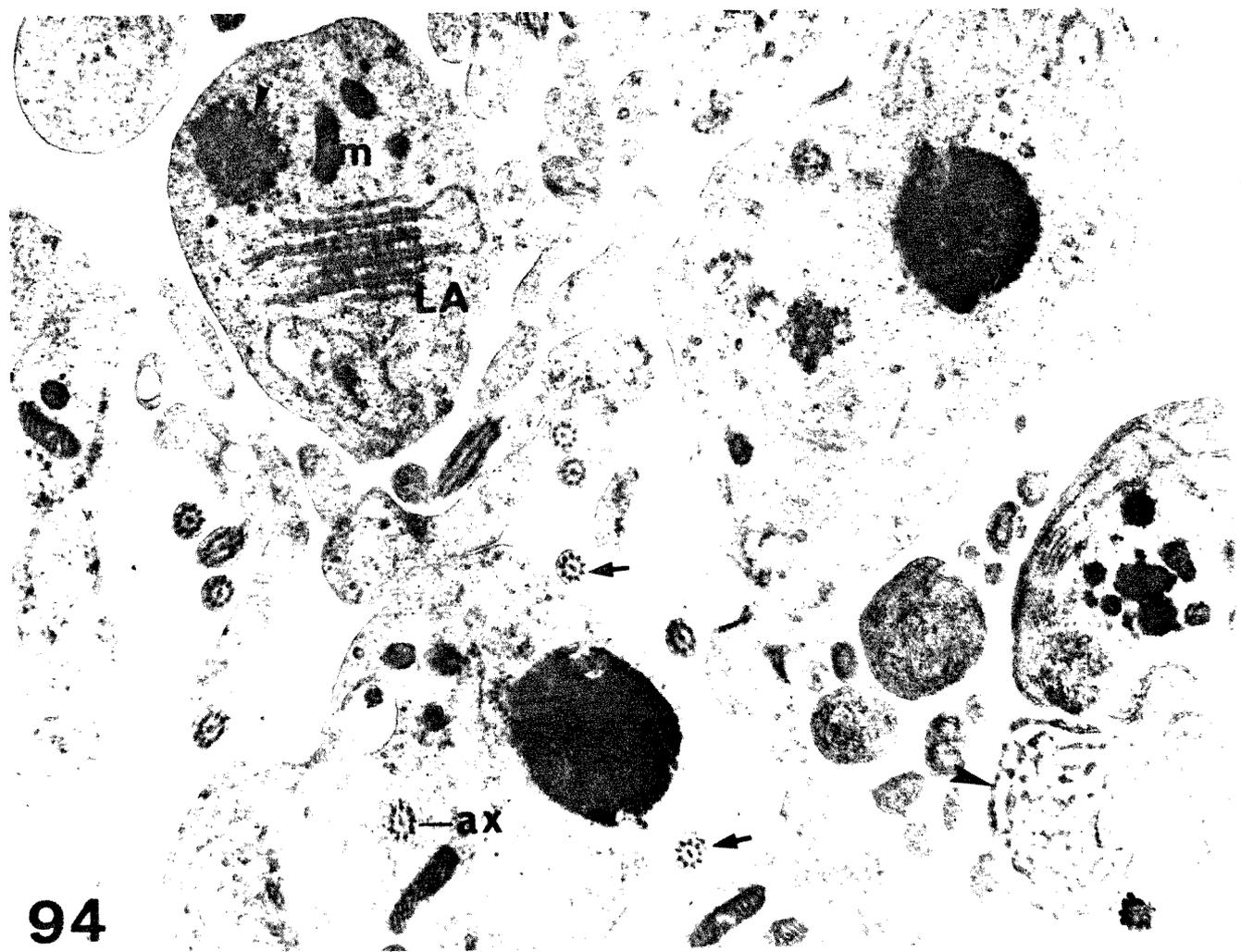
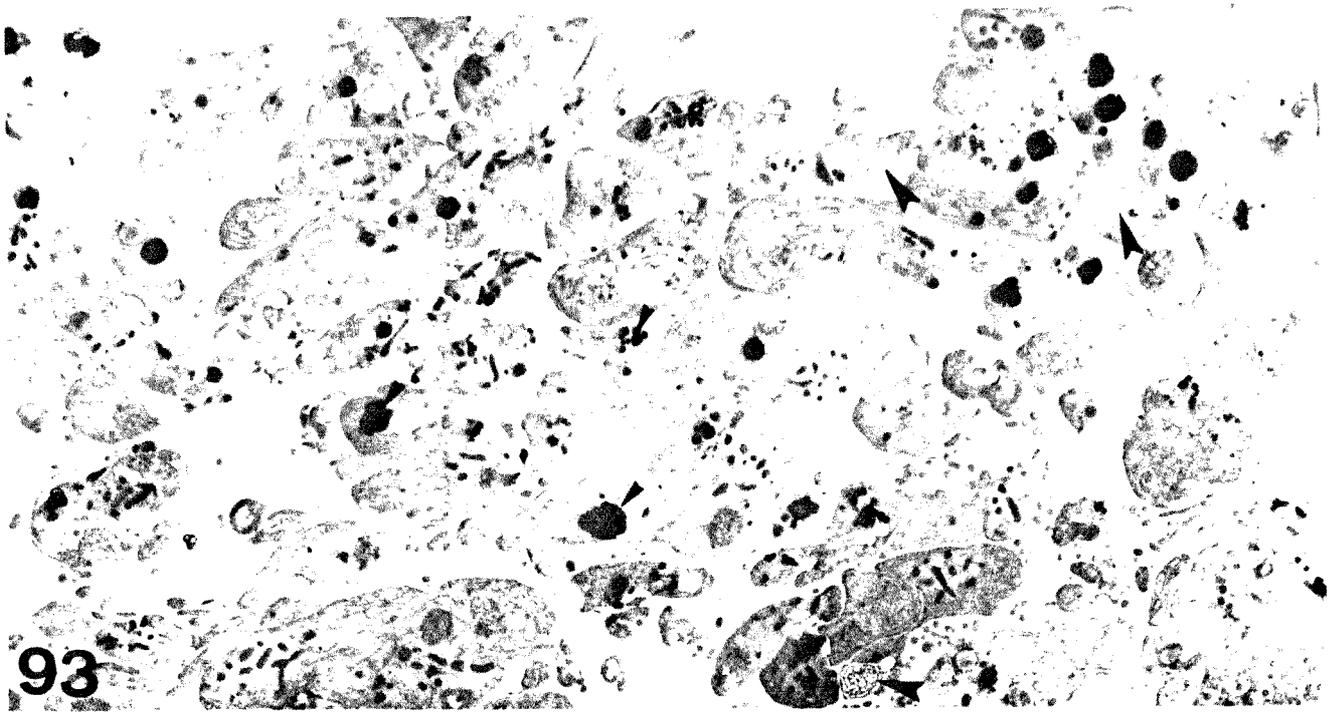


92



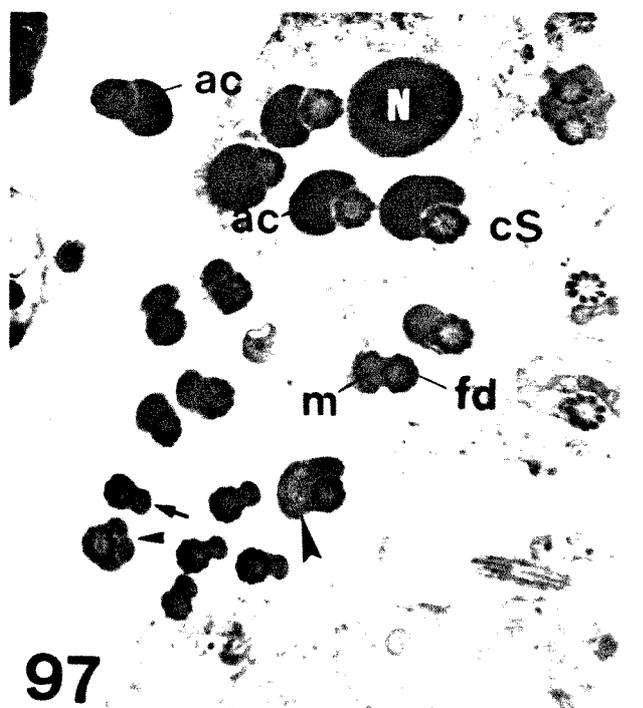
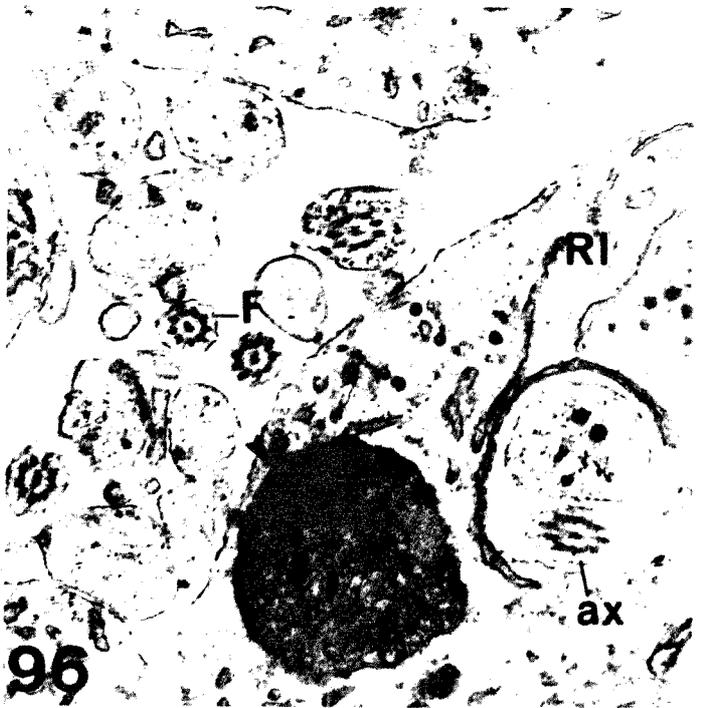
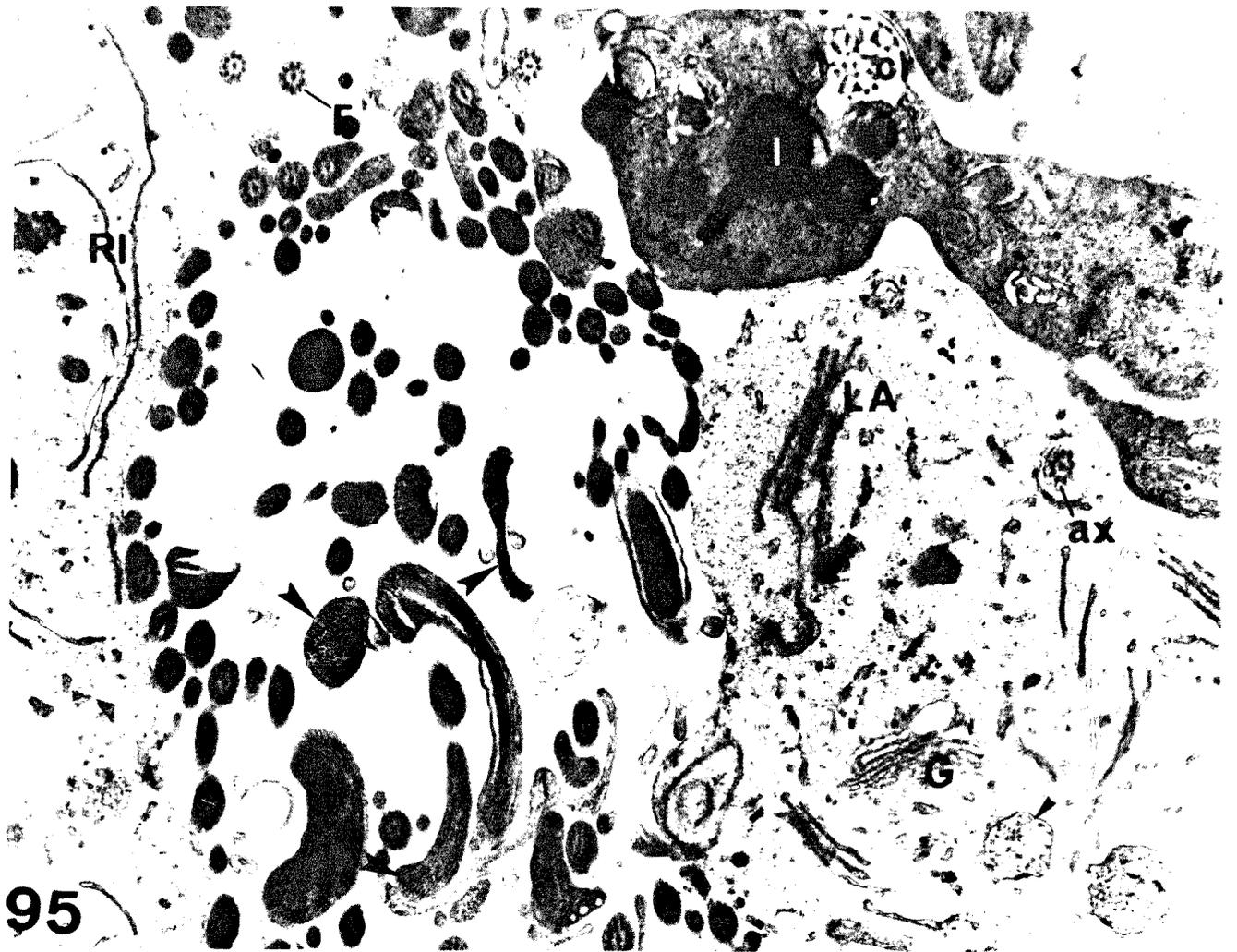
## PRANCHA XXXIII

- Figura 93** Resíduos de eliminação citoplasmática na luz do túbulo, onde se destacam estruturas esféricas eletrodensas, prováveis lisossomos (cabeça de seta menor), e corpos reticulados (cabeça de seta maior). 3.100X.
- Figura 94** Detalhe de resíduos de eliminação citoplasmática contendo axonema flagelar (ax), lisossomos (l), lamelas anuladas (LA), mitocôndrias (m), material finamente granular (cabeça de seta menor), e corpos reticulados (cabeça de seta maior). Regiões terminais de flagelos também podem ser observadas (seta). 15.700X.



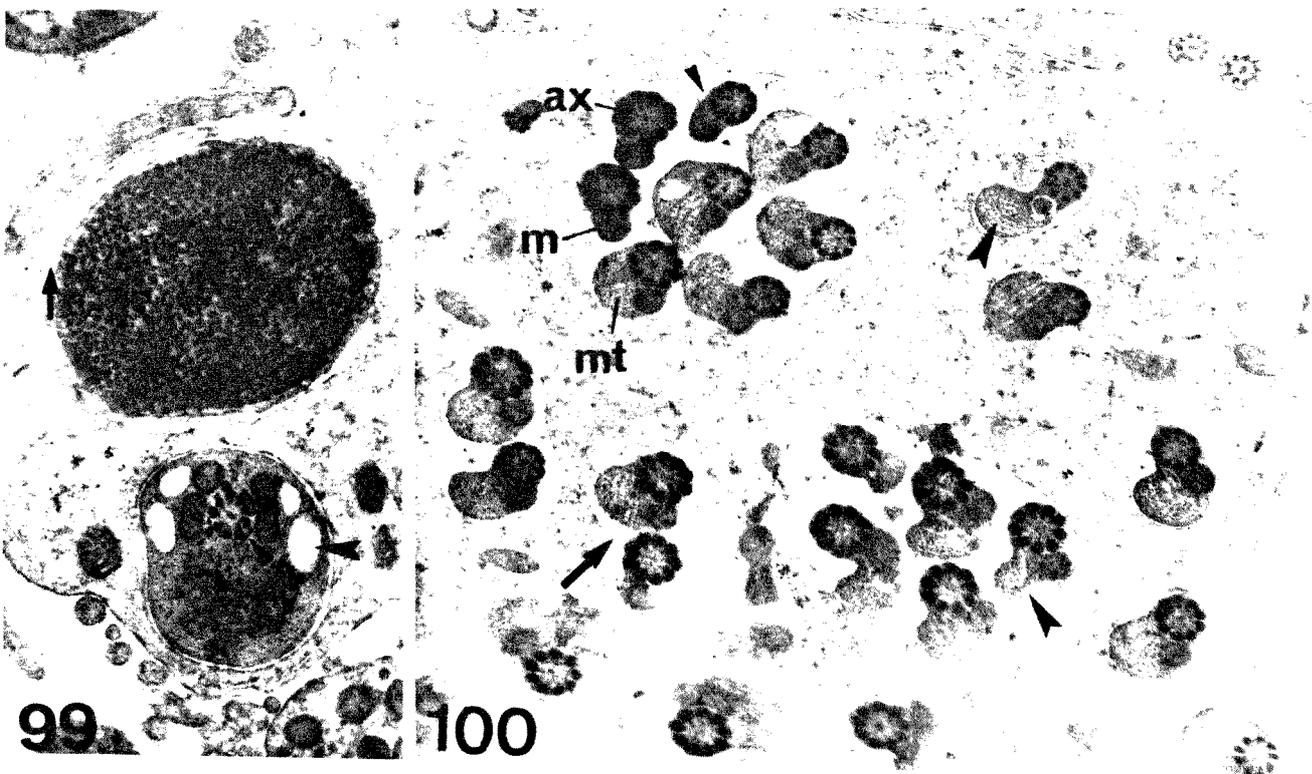
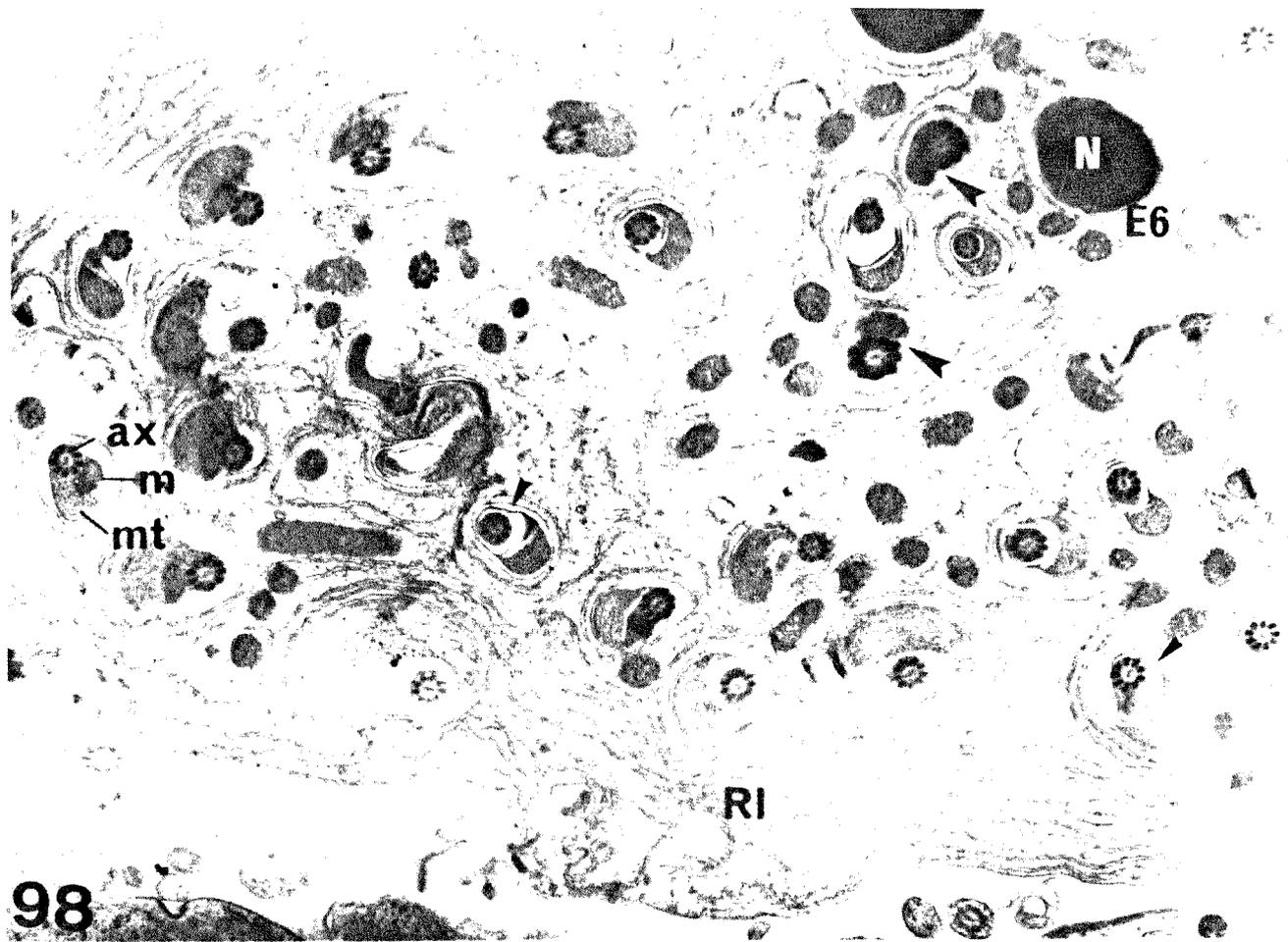
## PRANCHA XXXIV

- Figura 95** A figura mostra: resíduo de eliminação com citoplasma pouco eletrodense, contendo complexo de Golgi (G), corpo multivesicular (cabeça de seta menor), retículo endoplasmático liso (RI), lamelas anuladas (LA) e axonema flagelar (ax); resíduo de eliminação com citoplasma bastante eletrodense, onde são encontrados lisossomos (l) e o corpo reticulado (cr); flagelos na região terminal da cauda (F) e pequenos fragmentos citoplasmáticos ricos em microtúbulos (cabeça de seta maior). 16.200X.
- Figura 96** Detalhe de um resíduo de eliminação citoplasmática contendo o axonema (ax) em corte tangencial, perfis de retículo endoplasmático liso (RI) e lisossomo (l), no interior do qual são encontradas vesículas eletrodensas envoltas por membranas (cabeça de seta). Flagelos (F) na região terminal da cauda, contendo o axonema com padrão 9 + 2 também são observados. 18.300X.
- Figura 97** Espermátides finais localizadas em vacúolos no citoplasma da célula de Sertoli (cS) e espermatozóides livres na luz do túbulo. As células foram seccionadas na região nuclear (N); no início da cauda próximo ao material adjunto do centríolo (ac); na porção mediana da cauda onde se nota o axonema com fibras densas acessórias (fd) e a mitocôndria (m); ou na região terminal da cauda contendo mitocôndria com diâmetro reduzido (seta). Na luz do túbulo são encontradas espermátides contendo o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior), e espermátide anômala contendo duas mitocôndrias (cabeça de seta menor). 13.000X.



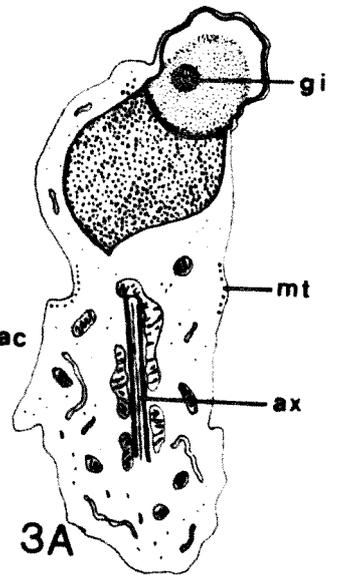
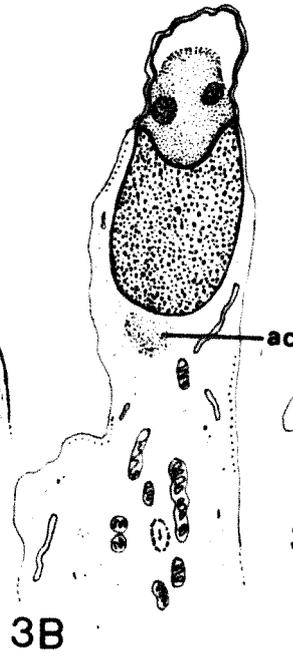
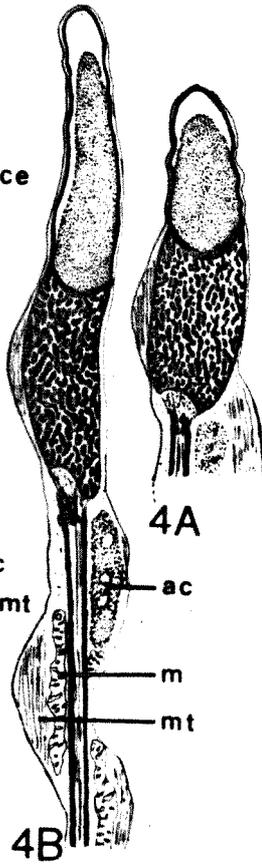
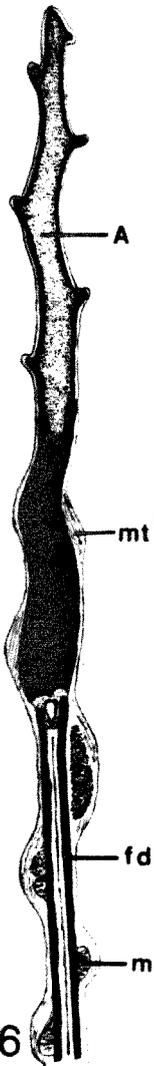
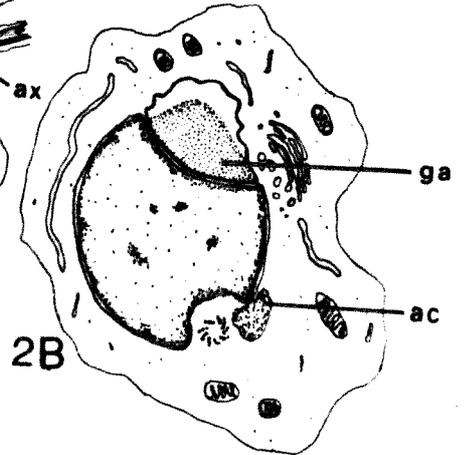
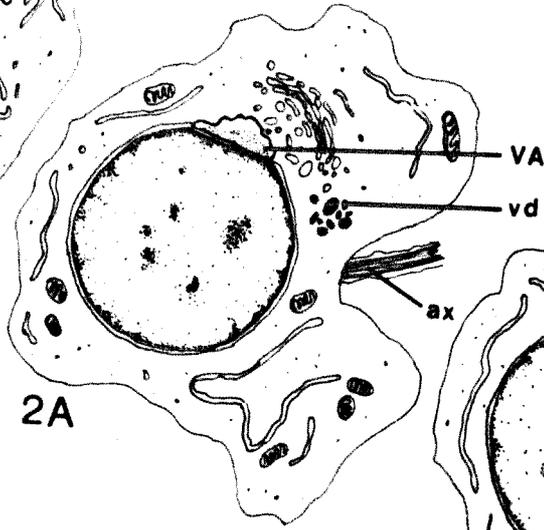
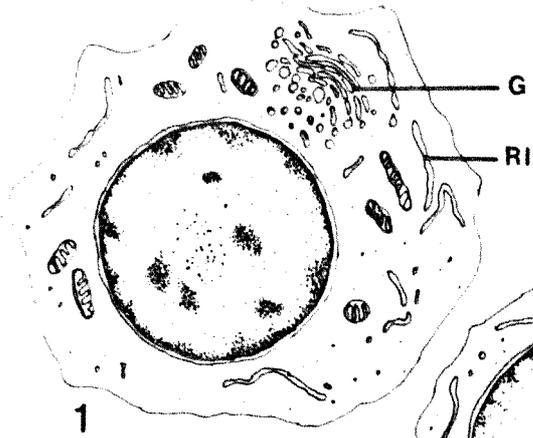
## PRANCHA XXXV

- Figura 98** Vista parcial de um feixe de espermátides finais. Na figura observam-se: cauda de espermátides contendo axonema (ax) com fibras densas, mitocôndrais (m), e feixe de microtúbulos (mt); espermátides sem o feixe de microtúbulos (cabeça de seta maior); caudas com o axonema separado do feixe de microtúbulos (cabeça de seta menor); e cisternas de retículo endoplasmático liso (RI) do citoplasma da célula de Sertoli. 15.700X.
- Figura 99** Espermátides intermediárias entre a fase 3 e 4 de diferenciação. Notar: o núcleo (N) com cromatina formando cordões densos de pequeno diâmetro; o citoplasma da célula de Sertoli (seta) entre o feixe de microtúbulos e o núcleo; e início da região caudal, com vacúolos (cabeça de seta maior), e mais de nove fibras densas acessórias (cabeça de seta menor). 19.000X.
- Figura 100** Espermátides finais, em corte transversal da cauda, localizadas no interior da célula de Sertoli. Certas espermátides encontram-se em vacúolos, alguns dos quais, recentemente formados (seta). O feixe de microtúbulos pode estar presente ou não (cabeça de seta menor). Em certas espermátides, o citoplasma contendo o feixe de microtúbulos parece formar uma projeção (cabeça de seta maior). 18.400X.



**ESQUEMA 3** Diagrama representando as fases da espermiogênese no pardal.

**1:**espermátide na fase 1 de diferenciação, contendo núcleo esférico posicionado centralmente, mitocôndrias esparsas, perfis de retículo endoplasmático liso (RI) e complexo de Golgi (G) perinuclear. **2A:** espermátide no início da fase 2 de diferenciação; a vesícula acrossomal (VA) surge, em associação com o complexo de Golgi, nas proximidades do flagelo em desenvolvimento, e vesículas densas (vd) são observadas nesta região. **2B:** espermátide na fase 2 de diferenciação, contendo vesícula acrossomal volumosa, em cujo interior destaca-se o grânulo acrossomal (ga), e centríolo localizado no outro polo da célula próximo ao material adjunto do centríolo (ac). **3A:** espermátide na fase 3 de diferenciação; a cromatina se compacta em grânulos pequenos, o citoplasma é direcionado para região caudal; no interior da vesícula acrossomal, além do grânulo acrossomal, observa-se o grânulo acrossomal interno (gi); as mitocôndrias se agrupam ao redor do axonema flagelar (ax) em desenvolvimento, as fibras densas aparecem e microtúbulos (mt) são observados no citoplasma. **3B:** espermátide na fase 3 de diferenciação; o núcleo e a vesícula acrossomal começam a alongar e o material adjunto do centríolo aumenta de volume. **4A:**espermátide no início da fase 4 de diferenciação; a alongação nuclear e acrossomal prosseguem, e a cromatina se organiza em cordões espessos. **4B:** espermátide na fase 4 de diferenciação; a forma helicoidal torna-se evidente, o feixe de microtúbulos transcreve um trajeto helicoidal por quase toda a extensão da célula e as mitocôndrias começam a se organizar helicoidalmente ao redor do axonema; o material adjunto do centríolo apresenta-se bastante alongado e com algumas regiões claras. **5:** espermátide na fase 5 de diferenciação; no acrossomo começa a ser formada a crista espiral (ce), a compactação cromatínica é quase completa, restando apenas pequenas áreas claras no núcleo; o material adjunto do centríolo ocupa a primeira volta da região caudal, e a mitocôndria apresenta-se totalmente fundida. **6:** espermátide na fase 6 de diferenciação; a célula apresenta acrossomo (A) longo com crista espiral, cromatina totalmente compactada, fibras densas (fd) contínuas por toda a cauda e mitocôndria helicoidal. Os espermatozoides são praticamente idênticos a estas células, apenas o feixe de microtúbulos não é mais encontrado.



**ESQUEMA 4** Diagrama mostrando a relação das espermatídes com a célula de Sertoli (representada com citoplasma pontilhado) e o modo de eliminação citoplasmática durante a espermiogênese. (E1 a E2- espermatídes em fases progressivas de maturação, r - resíduo de eliminação citoplasmática).

