

IRANI QUAGGIO-GRASSIOTTO

"CITODIFERENCIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DURANTE A ESPERMIOGÊNESE
NORMAL DE *Ceratitis capitata* Weidmann (DIPTERA-TEPHRITIDAE)".

Tese de Mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia da Universi-
dade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre.

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

Departamento de Biologia Celular
Instituto de Biologia
UNICAMP

1983

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

VOLUME I

TEXTO

"No ato de doar, algo nasce, e ambas as pessoas envolvidas são gratas pela vida que para ambas nasceu".

Erich Fromm

DEDICO,

A meu pai Lorival, *in memoriam*,

A minha mãe Irene,

A meu marido Oswaldo,

A meus filhos Sergio, Fabio, Eduardo, Cristina e
Cesar.

Por um passado de lutas comuns,
pela convivência do presente, e na esperança de
um futuro de paz e amor para todos nós.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mary Anne Heidi Dolder pela orientação, pelo interesse demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade e compreensão com que agraciou a minha pessoa.

À Dra. Carminda da Cruz-Landim, à Dra. Edy de Lello Montenegro, à Dra. Hebe M. L. de Souza e à Dra. Marina Silveira pela leitura zelosa do original deste trabalho, e pelas sugestões oferecidas que concorreram para o aprimoramento do mesmo.

Aos colegas, funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e do Centro de Microscopia Eletrônica que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

À Maria Tereza de Paula pelo seu inestimável e incansável auxílio na elaboração das cópias fotográficas.

À Maria Célia Giorgi Almeida, pela paciência e excelência de seus serviços datilográficos.

À minha mãe, cuja colaboração abnegada e constante, permitiu que eu alcançasse mais este grau de minha formação acadêmica.

À meu pai, pelo estímulo, enquanto em nosso convívio.

À meu marido, companheiro em todos esses anos.

À meus filhos, pelo amor.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	7
QUADRO METODOLÓGICO	17
RESULTADOS	18
ESQUEMA DA ULTRA-ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE DE <i>Ceratitis capitata</i>	42
DISCUSSÃO	43
RESUMO	73
SUMMARY	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

INTRODUÇÃO

A espermatogênese é o processo pelo qual se forma o gameta masculino dos animais. Constitui-se num evento no qual os pontos inicial e final são bem definidos, e que ocorre temporalmente isolado do desenvolvimento embriológico geral dos animais. Essas características tornam a espermatogênese um sistema celular preferencial para análise e muito se tem aprendido com relação à diferenciação e à estrutura e função das diversas organelas celulares em decorrência de estudos levados a efeito sobre as modificações pelas quais passam as células durante o desenrolar deste processo.

A formação do gameta masculino compreende fatos como: a produção das espermatogônias primárias por divisão das células germinativas primordiais; o aparecimento das espermatogônias secundárias a partir de divisões mitóticas das espermatogônias primárias; diferenciação sequencial das espermatogônias secundárias, durante o curso de numerosas divisões celulares espécie - específicas com citocineses incompletas, que resultam no aparecimento dos espermatócitos primários; maturação profásica e primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários dando origem aos espermatócitos secundários; espermatócitos secundários completando o processo meiótico e passando, assim, a espermatídes; e espermatídes sofrendo, por sua vez, extensas e profundas alterações estruturais que resultam na for

mação dos espermatozoides.

A sequência de modificações morfofuncionais pela qual passam as espermatides denomina-se "espermiogênese" e constitui-se no objeto de nosso estudo. As alterações das organelas celulares que ocorrem durante a diferenciação das espermatides conduzem a uma morfologia celular adaptada à reprodução.

Na primeira metade deste século vários citologistas desenvolveram inumeros estudos descrevendo acuradamente a anatomia microscópica do espermatozoide e da espermiogênese de muitas espécies de insetos. Porém as observações com microscópio ótico, neste campo, carecem de detalhes. Conforme os relatos de Phillips (60) ao advento dos microscópios eletrônicos comerciais, na década de 50, seguiu-se um período de intensas explorações acerca das estruturas biológicas. Do empenho de muitos pesquisadores em ampliar nossos conhecimentos da ultra-estrutura das células germinativas masculinas dos insetos resultou a farta documentação a respeito da espermiogênese e morfologia do espermatozoide de certas espécies, bem como os numerosos estudos morfológicos comparativos de determinadas organelas das células espermatídicas. Sabe-se, portanto, que a espermiogênese nos insetos é cística (60), que dentro de cada cisto as espermatides diferenciam-se sincronicamente (11) e que essa diferenciação caracteriza-se pela formação do "Nebenkern", ou complexo mitocondrial (fusão das mitocôndrias), condensação do núcleo e alongamento celular, abrangendo ainda a formação da cauda e a eliminação

do citoplasma.

Das inúmeras publicações (3; 19; 60; 96) a respeito das células germinativas masculinas dos insetos temos que seu espermatozóide apresenta em geral um formato muito delgado, sendo constituído por uma cabeça bastante alongada e por uma cauda ou flagelo extremamente comprido. A cabeça é formada por um acrosoma anterior, que se origina do complexo de Golgi, e pelo núcleo. Na base da cabeça, na maioria destes espermatozóides, encontra-se uma estrutura denominada adjunto do centríolo. Esta estrutura, envolve parcialmente a região anterior do filamento axial e apresenta tamanho variável nas diferentes espécies de insetos em que é observada. A cauda do espermatozóide destes animais é constituída em sua porção central pelo filamento axial ou axonema. O filamento axial origina-se do corpúsculo basal (o corpúsculo basal resulta de transformações sofridas pelo único centríolo aparentemente retido pelas células espermáticas dos insetos). Constitui-se, em geral, de um arranjo de $9 + 9 + 2$ microtúbulos (2 microtúbulos centrais rodeados por 9 microtúbulos duplos, que por sua vez são circundados por mais 9 microtúbulos simples). Ladeando o filamento axial existem, usualmente, duas estruturas originadas de transformações das mitocôndrias. Estas estruturas são conhecidas como derivados mitocondriais e ocorrem ao longo da maior parte do comprimento da cauda dos espermatozóides, sendo inexistentes apenas na extremidade final desta última.

Em *Ceratitis capitata*, nosso espécime de experi-

mentação, a espermiogênese apresenta-se conforme o padrão característico descrito para os insetos em geral (60, 96), e a ultra-estrutura de seu espermatozóide corresponde, também, à ultra-estrutura considerada como padrão entre os espermatozóides destes animais (3; 19; 60; 96), observando-se, no entanto, algumas peculiaridades inerentes à ordem e à família a que pertence (4; 11; 12; 56; 70; 77; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 92; 97).

A mosca da fruta do mediterrâneo como também é conhecida *C. capitata*, é uma praga de considerável importância econômica. Seu controle ou erradicação constitui um problema sério para vários países agrícolas. Sabemos, no entanto, que o uso indiscriminado de defensivos químicos em insetos daninhos causa graves inconvenientes ao homem e ao meio ambiente de modo geral. Preocupados com a qualidade da vida em nosso planeta muitos pesquisadores encontram-se empenhados em desenvolver métodos mais específicos de combate às pragas, que sejam economicamente vantajosos e menos agressivos à natureza. Daí, portanto, a necessidade de maiores esclarecimentos a respeito da biologia destes insetos e particularmente da biologia da mosca da fruta do mediterrâneo.

A biologia da reprodução de *Ceratitidis capitata* Weidmann (Diptera-Tephritidae) encontra-se ainda pouco documentada. Descrições da ultra-estrutura de sua espermiogênese não estão disponíveis na literatura científica atual. As publicações existentes (3; 5; 16; 68) versam sobre aspectos citoquímicos e ultra-estruturais de seu

espermatozóide comparativamente aos espermatozóides de outras espécies de insetos. Resultou, daí, a nossa proposta de descrever os aspectos ultra-estruturais que caracterizam a diferenciação celular durante a espermiogênese normal em *C. capitata*.

Não podemos deixar de chamar a atenção, também, para a possibilidade da intensificação do uso da mosca da fruta do mediterrâneo como um modelo biológico, em nosso meio. Desde de que o problema de produção em massa de *C. capitata*, em laboratório ou campo experimental, já se encontra devidamente equacionado em nosso país (74), temos então material farto para pesquisas biológicas em geral. A mosca é de proliferação rápida e abundante o que a torna material de estudo preferencial em investigações que abor-dem os mecanismos envolvidos na reprodução animal.

Se tomarmos como exemplo as drosófilas veremos o quanto os estudos das modificações ultra-estruturais que ocorrem em suas células espermáticas durante o processo de espermiogênese em indivíduos normais (4; 11; 12; 56; 77; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 97), sempre utilizados para comparações em estudos sobre indivíduos mutantes e sobre indivíduos submetidos a condições ambientais alteradas (1; 21; 33; 35; 43; 44; 45; 50; 52; 73; 94; 95), têm contribuído para o conhecimento fundamental da célula e da biologia do desenvolvimento.

Assim ao estudarmos a sequência de eventos morfológicos que caracteriza a espermiogênese normal em *C. capitata*, pretendemos deixar traçada uma linha mestra que pos-

sa, da mesma forma que a espermiogênese normal em *D. melanogaster*, ser empregada em pesquisas comparativas a respeito dos mecanismos que regem a diferenciação celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados insetos adultos de *Ceratitis capitata* Weidmann pertencentes à família Tephritidae, à ordem Diptera, à subordem Cyclorrhapha e à tribo Schizophora, com 5 a 15 dias após a emergência do adulto. As moscas foram gentilmente cedidas pela Dra. Hebe M. L. de Souza do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

Os gametas de *C. capitata*, em diferentes fases de maturação, foram obtidos fazendo-se a dissecação de machos adultos, sob microscópio estereoscópico Zeiss, retirando-se-lhes os testículos. As espermatecas de fêmeas adultas também foram utilizadas para que se pudesse analisar os espermatozoides armazenados no trato genital feminino.

Os tratamentos experimentais empregados no preparo dos testículos e espermatecas para a observação de aspectos ultra-estruturais das diversas fases da espermiogênese em *C. capitata* encontram-se descritos a seguir:

CORTES ULTRA-FINOS

Machos e/ou fêmeas adultos de *C. capitata* foram anestesiados com éter e dissecados em solução de glutaraldeído (Merck) a 1,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH

7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio. Os órgãos dos animais, devido às suas dimensões, isto é, espermatecas com 0,1 mm de diâmetro e testículos com 0,5 mm de comprimento por 0,3 mm de diâmetro, foram utilizados inteiros não sendo necessário fracioná-los para melhor penetração do fixador. O material, testículos e/ou espermatecas, foi removido e fixado, por imersão, em solução de glutaraldeído (Merck) a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, sob agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos, durante 1 a 2 horas, a 4°C (69). As gônadas foram, então, lavadas mediante diversas trocas do mesmo tampão, a 4°C, por um período de 30 minutos a 1 hora. A pós-fixação foi efetuada, por imersão, em solução de tetróxido de ósmio (Fluka) a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, sob agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos durante 1 hora, a 4°C. Após uma rápida lavagem em água destilada gelada os espécimes foram desidratados, gradualmente, em álcool etílico, a 4°C.

Na desidratação gradual procedeu-se da seguinte maneira:

1. desprezou-se cerca de metade do volume de água destilada gelada em que se encontrava o material, em estudo, após pós-fixação e lavagem;

2. adicionou-se álcool etílico 95% a 4°C, gota a gota, com auxílio de uma pipeta Pasteur, durante 15 minutos,

até que se completasse o volume inicial de líquido e se obtivesse uma concentração final do álcool aproximadamente igual a 45%.

3. os itens 1 e 2 foram repetidos, obtendo-se assim uma concentração final do álcool aproximadamente igual a 75%.

4. desprezou-se todo o volume de líquido, em que se encontrava o material em estudo, adicionou-se o álcool 95%, a 4°C e aguardou-se 15 minutos;

5. repetiu-se o item 4 por mais duas vezes;

6. substituiu-se o álcool 95%, a 4°C, por álcool 100%, a 4°C, desprezando-se a totalidade do volume de líquido do primeiro álcool, e aguardou-se 10 minutos, à temperatura ambiente;

7. desprezou-se a totalidade do volume do álcool 100% em que se encontrava o espécime, adicionou-se álcool 100%, à temperatura ambiente, e aguardou-se 10 minutos;

8. repetiu-se por mais uma vez o item 7.

Encontrando-se os espécimes desidratados, procedeu-se à substituição do etanol pelo óxido de propileno. A substituição do etanol pelo óxido de propileno foi efetuada segundo a metodologia abaixo.

1. desprezou-se todo o volume do álcool 100% em que se encontrava o material;

2. adicionou-se etanol 100% e óxido de propileno na

proporção de 1:1 e aguardou-se 5 minutos, à temperatura ambiente;

3. desprezou-se todo o volume de líquido, adicionou-se óxido de propileno e aguardou-se mais 5 minutos, à temperatura ambiente;

4. repetiu-se por mais uma vez o item 3 logo acima.

O material, em estudo, foi a seguir embebido em mistura de óxido de propileno e Epon 1:1, por 12 horas, em frasco aberto, à temperatura ambiente. O material fixado e assim preparado foi, então, incluído em Epon 812 (46), em mistura balanceada para a obtenção da máxima dureza final dos blocos.

Os cortes ultra-finos de aproximadamente 40 a 80 nm de espessura (de cor cinza a levemente dourada, devido à interferência da luz) foram obtidos em ultra-micrótomo LKB, equipado com navalhas de vidro. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 e/ou 400 "mesh" e contrastados primeiramente em solução aquosa de acetato de uranila a 2%, (93) por 20 minutos, à temperatura ambiente, e a seguir em solução de citrato de chumbo a 0,2% em solução 1N de hidróxido de sódio (89), por 2 minutos à temperatura ambiente. A observação e as micrografias eletrônicas do material em estudo foram efetuadas em microscópio eletrônico Zeiss 9 S operado a 60 KV, a aumentos de 1.800 a 60.000 vezes, e portando filme da Fuji (Fuji Electron-Microscopic Film-FG). Na revelação dos filmes utilizou-se o revelador D19B, preparado conforme fórmula fornecida pe-

la Kodak.

As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico Kodabromide, pêsos simples, F₃ ou F₄, da Kodak, com o concurso de um ampliador Fuji (modelo S69) equipado com as lentes originais. Na revelação das cópias fotográficas utilizou-se o revelador Dektol, da Kodak, e na fixação destas, fixador também da Kodak.

No preparo dos testículos de *C. capitata* para a observação em microscópio eletrônico de transmissão, além da metodologia já descrita, foram empregadas algumas variações de técnicas na estocagem, ou fixação, ou pós-fixação, ou desidratação, ou contrastação do material. Estas variações encontram-se descritas a seguir:

VARIAÇÃO A - Dissecção dos machos adultos de *C. capitata*, para a retirada das gônadas, em solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio. Estocagem com concomitante fixação do material em solução de glutaraldeído a 0,25% no mesmo tampão, a 10°C, por períodos de 7 a 15 dias. Após este período de estocagem os testículos dos insetos foram lavados, mediante diversas trocas do tampão em uso, por 30 minutos a 1 hora, a 4°C. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, adicionado de ferricianeto de potássio a 0,05M (54), ou em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a

pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, adicionado de 0,5% de ácido tânico, sob agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos, por 1 hora, a 4°C. Desidratação gradual em álcool etílico a 95%. Observação do material, em microscópio eletrônico de transmissão, com contrastação por acetato de uranila e citrato de chumbo.

A estocagem do material em estudo, em solução fixadora de glutaraldeído a 0,25% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, por períodos de 7 a 15 dias, a 10°C, foi efetuada para que se pudesse observar e analisar a qualidade da preservação dos tecidos quando fixados e estocados por longos períodos de tempo. Isto tendo como propósito o desenvolvimento de uma metodologia em microscopia eletrônica que permita uma maior flexibilidade em pesquisas com insetos sazonais.

A pós-fixação tanto em tetróxido de ósmio adicionado de ferricianeto de potássio como a em tetróxido de ósmio adicionado de ácido tânico visaram a obtenção de um aumento geral de contraste das estruturas celulares e particularmente das membranas.

VARIAÇÃO B - Dissecção dos machos adultos de *C. capitata*, para a retirada das gônadas, em solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio. Fixação, sem estocagem do material, por imersão, em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, adicionado de 2% de ácido tânico (Merck) (53), sob

agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos, por 1 a 2 horas, a 4°C. Lavagem mediante diversas trocas do mesmo tampão, por 30 minutos a 1 hora, a 4°C. Pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, sob agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos, por 1 hora, a 4°C. Desidratação gradual em álcool etílico a 95%. Observação do material, em microscópio eletrônico de transmissão, com contrastação por acetato de uranila e citrato de chumbo.

A fixação do material em estudo, em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, adicionado de 2% de ácido tânico foi efetuada com o propósito de se obter uma melhor visualização dos microtúbulos, bem como de sua sub-estrutura.

VARIAÇÃO C - Dissecção dos machos adultos de *C. capitata*, para a retirada das gônadas, em solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio. Fixação, sem estocagem do material, por imersão, em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, sob agitação (manual) a intervalos de 5 a 10 minutos, por 1 a 2 horas, a 4°C. Lavagem mediante diversas trocas do mesmo tampão, por 30 minutos a 1 hora, a 4°C. Desidratação gradual em álcool etílico 95%, contendo 2% de ácido fosfotúngstico (EPTA), a 4°C, sem se proceder à pós-fixação em tetróxido de ósmio (17). Observação do mate-

rial, em microscópio eletrônico de transmissão, sem e com contrastação por acetato de uranila e citrato de chumbo.

A desidratação do material em estudo, em EPTA, sem prévia pós-fixação em tetróxido de ósmio, e sua observação em microscópio eletrônico de transmissão, antes e após contrastação por uranila e chumbo foi efetuada com o propósito de colher informações adicionais em relação à resultados anteriormente obtidos por Dolder (observações pessoais), usando este mesmo método, em espermatozoides de *Triatoma infestans* (Hemiptera).

CONTRASTAÇÃO NEGATIVA

Fêmeas adultas de *C. capitata* foram anestesiadas com éter e dissecadas em solução Ringer para insetos. As espermatecas foram-lhes removidas e colocadas em pequenas quantidades de solução Ringer para insetos. Para a obtenção de suspensões dos espermatozoides da mosca, as espermatecas, em solução Ringer para insetos, foram mecanicamente rompidas uma a uma com auxílio de pinça e estilete. Estes preparados foram, então, submetidos à fragmentação ultra-sônica, por 1 a 5 minutos, em aparelho de ultra-som Millipore. Pequenas gotas das suspensões, assim obtidas, foram colocadas sobre telas suporte. As telas suporte foram preparadas com filme de colódio (nitrocelulose em solução a 2% em acetato de amila) e recobertas com carbono em evaporador Hitachi (Modelo HUS - 4GB). Da suspensão

de espermatozóides submetidos à fragmentação ultra-sônica colocou-se uma gota sobre cada tela suporte. Após 2 a 5 minutos uma gota de contrastante, solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1% a pH 6,8 - 7,2 ajustado com solução saturada de hidróxido de sódio (34), foi colocada sobre cada tela contendo o material em suspensão. Aguardou-se cerca de 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente e removeu-se o excesso de contrastante com auxílio de um papel de filtro. A preparação foi deixada secar à temperatura ambiente.

Solução aquosa de acetato de uranila a 2% a pH \pm 4,0, também foi utilizada como contrastante nas preparações de material por contrastação negativa, sendo o procedimento idêntico àquele descrito quando da contrastação por ácido fosfotúngstico.

Na observação e micrografias eletrônicas do material contrastado negativamente procedeu-se conforme já anteriormente descrito para os cortes ultra-finos.

Para a caracterização dos vários estádios de diferenciação desde espermátides até espermatozóides, durante a espermiogênese normal de *C. capitata*, utilizaram-se como referência as publicações de Stanley e colaboradores de 1977 (77) e de Szöllösi de 1975 (78).

O agrupamento das micrografias eletrônicas em pranchas foi orientada no sentido de mostrar as transformações nucleares, a formação do axonema durante a espermiogênese, os aspectos iniciais e finais das células espermáticas no cistos, e o espermatozóide na espermateca (em cor

tes ultra-finos e por contrastação negativa), e detalhes da formação do axonema respectivamente.

QUADRO - Tratamentos experimentais utilizados no preparo dos testículos e/ou espermatecas de *Ceratitís capitata* para observação em microscópio eletrônico de transmissão.

Tratamentos experimentais	Dissecção em solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4.	Estocagem por 7 a 15 dias a 10°C em solução de glutaraldeído a 0,25% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4.	Fixação por 1 a 2 horas, a 4°C, em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4.	Pós-fixação por 1 hora a 4°C em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4.	Desidratação gradual em etanol 95%	Contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo	Contrastante negativo
Normal	+	-	+	+	+	+	-
Variação A	+	+	-	Adicionado de 0,05M de ferricianeto de potássio.	+	+	-
				Adicionado de 0,5% de ácido tânico			
Variação B	+	-	Adicionado de 2,0% de ácido tânico	+	+	+	-
Variação C	+	-	-	-	Adicionado de 2,0% de ácido fosfotúngstico.	-	-
						+	
Contrastação Negativa	Dissecção em solução Ringer para insetos	-	-	-	-	-	Solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1%, pH 6,8-7,2. Solução aquosa de acetato de uranila a 2%, pH = 4,0.

RESULTADOS

A espermiogênese em *Ceratitis capitata* é em muitos aspectos similar à espermiogênese de outros insetos (60). As espermatídes desenvolvem-se em cistos dentro de testículos pares, sendo que cada cisto contém cerca de 250 células espermáticas (Fig. 90), as quais evoluem sincronicamente. Em um mesmo testículo são encontrados cistos em diferentes estádios da espermiogênese. As figuras 1, 3, 5, 10, 24, 34, 41, 45, 81 ilustram estes estádios.

Entre as células espermáticas jovens contidas num mesmo cisto podem ser observadas pontes citoplasmáticas estreitas (Figs. 3, 88, 89). Em determinada fase da espermiogênese, na dependência do nível do corte, as células espermáticas pertencentes a um mesmo cisto apresentam-se completamente separadas umas das outras (Figs. 10, 36, 69, 75, 79) ou unidas entre si, em determinadas regiões da cauda, através de extensas massas citoplasmáticas comuns (Figs. 59, 67, 71, 73, 77).

A diferenciação da célula espermática de *C. capitata* caracteriza-se pela formação do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial, formação do flagelo, alongamento celular, condensação do material nuclear e eliminação do citoplasma.

ESTÁDIOS QUE CARACTERIZAM O DESENVOLVIMENTO DAS ESPERMÁTIDES DE *Ceratitidis capitata*

ESTÁDIO 1 - As células neste estágio de desenvolvimento apresentam: núcleo com formato irregular, com áreas de cromatina condensada; numerosas membranas do retículo endoplasmático e grande quantidade de mitocôndrias no citoplasma (Figs. 1 e 2).

ESTÁDIO 2 - Estas células apresentam: núcleo ovóide ou esferóide com áreas de cromatina condensada; mitocôndrias fundidas formando o "Nebenkern" ou complexo mitocondrial; o axonema, em formação, envolto por membranas; numerosas vesículas do complexo de Golgi (Figs. 3 e 4).

ESTÁDIO 3 - Este estágio se caracterizaria pela formação do adjunto do centríolo e pelo aparecimento do grânulo pró-acrosômico nas proximidades das cisternas do complexo de Golgi, em regiões diametralmente opostas em relação ao núcleo da espermátide. Porém neste estudo não se conseguiu observar tal fase do desenvolvimento das espermátides.

ESTÁDIO 4 - As células neste estágio apresentam: núcleo ovóide ou esferóide com áreas de cromatina condensada; adjunto do centríolo; axonema circundado por membrana lisa e dupla e somente com o complexo básico de 9 + 2 microtúbulos; "Nebenkern" em alongamento, dividido em duas massas iguais, uma de cada lado do axonema, e com

porções de citoplasma que adentram os derivados mitocondriais em formação (Figs. de 5 a 9, 54 e 55).

ESTÁDIO 5 - Estas células apresentam: núcleo em alongamento, com cromatina em fase inicial de compactação, ainda com nucléolo e com aparentes poros nucleares confinados a uma área restrita do envoltório nuclear; acrosoma em formação; derivados mitocondriais em alongamento, com início de deposição de material elétron-denso em arranjo paracristalino em seu interior; formação das fibras acessórias no axonema (Figs. 10, 17, 18, 60 e 106).

ESTÁDIO 6 - Estas células apresentam: núcleo em alongamento com concavidades laterais e com cromatina em compactação, na forma de filamentos no interior; membranas adjacentes ao núcleo; numerosos microtúbulos orientados longitudinalmente, no citoplasma; aparecimento das fibras elétron-densas entre os microtúbulos do axonema; início do processo de eliminação de material citoplasmático (Figs. de 23 a 28, 35, 56, 57, 70 e 107).

ESTÁDIO 7 - Estas células apresentam: compactação crescente da cromatina; perda gradual das concavidades nucleares; enrolamento das extremidades laterais das membranas adjacentes; deposição crescente de material em arranjo paracristalino nos derivados mitocondriais; aparecimento de material elétron-denso preenchendo o par central de microtúbulos e as fibras ou microtúbulos acessórios do axonema (Figs. 29, 32, 33 e 73).

ESTÁDIO 8 - Estas células apresentam: núcleo

com cromatina em processo final de compactação, com contorno circular ao corte transversal; membranas adjacentes com as extremidades laterais enroladas para dentro e distantes dos bordos nucleares; microtúbulos em duas camadas concêntricas ao redor do núcleo; certos níveis da região da cauda das espermátides fundidos em extensas massas citoplasmáticas comuns; axonema completo; derivados mitocondriais quase que totalmente preenchidos pelo material em arranjo paracristalino (Figs. de 39 a 44, 71 e 74).

ESTÁDIO 9 - Estas células apresentam: material nuclear compactado; membranas adjacentes e microtúbulos sendo eliminados; fina camada de citoplasma envolvendo o axonema e os derivados mitocondriais (Figs. 45, 79 e 108).

ESTÁDIO 10 - As células nesta fase apresentam: material nuclear compactado; citoplasma praticamente ausente; derivados mitocondriais totalmente preenchidos por material elétron-denso em arranjo paracristalino (Fig. 50).

O "NEBENKERN" OU COMPLEXO MITOCONDRIAL

As numerosas mitocôndrias que anteriormente encontravam-se separadas no citoplasma das células espermáticas jovens (Figs. 1 e 2), fundem-se formando o "Neben-kern" ou complexo mitocondrial (Figs. 3 e 4). Esta estrutura mostra-se como uma rede complexa de corpos mitocondriais interligados sendo grande e única.

O núcleo nestas células é ovóide ou esferóide com áreas dispersas de cromatina condensada.

Um grande complexo de Golgi situa-se próximo ao núcleo (Fig. 4) e nenhum grânulo acrossomal é identificável próximo ao mesmo. Membranas do retículo endoplasmático encontram-se espalhadas pelo citoplasma e ao redor do núcleo (Figs. 3 e 4).

O axonema, ainda incompleto, aparece envolto por membranas, ao lado do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial (Fig. 4).

O ACROSOMA

Uma estrutura eléctron-densa, esférica, situada anteriormente ao núcleo de espermatídes jovens, em oposição ao adjunto do centríolo pôde ser observada nas figuras 16 e 18. Esta estrutura, presumivelmente derivada do complexo de Golgi, como o observado na figura 4, constitui-se no acrosoma. Entretanto o grânulo pró-acrosômico e os estádios intermediários de sua ligação ao núcleo não foram observados. A figura 18 mostra a presença de uma membrana intersticial entre o acrosoma e o núcleo da espermatíde.

O acrosoma, no espermatozóide, apresenta-se circundado por um complexo de membranas (Figs. 42, 48, 49 e 81). Em preparações de espermatozóides obtidos das espermatecas das fêmeas e negativamente contrastadas em PTA, o

acrosoma de *C. capitata* mostrou-se preenchido por material eléctron-denso em arranjo paracristalino, com estriações em períodos de cerca de 80 \AA (Fig. 97), com a extremidade anterior em forma de ampola e a extremidade posterior inserida no topo do núcleo, com cerca de 1.200 \AA de diâmetro e com cerca de $1,5 \text{ \mu m}$ de comprimento (Figs. 93, 94, 95 e 96). As micrografias eletrônicas dos espermatozoides contrastados negativamente também mostram o complexo de membranas que envolve a estrutura.

AS TRANSFORMAÇÕES NUCLEARES

Conforme já descrito, o núcleo da espermátide jovem tem o aspecto de um núcleo interfásico, apresentando áreas de cromatina condensada e nucléolo. É ovóide ou esferóide (Figs. de 1 a 9 e 88).

O alongamento do núcleo e a condensação do material cromatínico nele contido ocorre após a formação do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial e a formação do flagelo, encontrando-se a célula já bastante alongada, na região da cauda, nesta ocasião. Ao condensar-se e alongar-se o núcleo das células espermáticas sofre uma redução aproximada de 10 vezes no seu diâmetro (de mais ou menos $2,5 \text{ \mu m}$ em espermátides, em estágio 1 ou 2, para cerca de $0,25 \text{ \mu m}$ nos espermatozoides). O espermatozoide apresenta o núcleo afilado em sua região anterior, com a cromatina extremamente compactada, e contorno circular em corte

transversal (Figs. de 49 a 53, 81, 91 e 92).

Antecipadamente ao início dos eventos que caracterizam as transformações nucleares, as condensações cromatínicas no núcleo das espermatídes se desfazem com exceção do nucléolo. O núcleo apresenta-se, então, preenchido por material disposto em fibrilas finas, sendo observadas, também, no mesmo, regiões de baixa densidade eletrônica (Figs. de 10 a 13). Aparentes poros nucleares confinados a área restrita do envoltório nuclear são observados em região oposta àquela da inserção do flagelo (Figs. 11, 17 e 18).

O início do alongamento nuclear coincide com o aparecimento, no citoplasma, de membranas adjacentes ao envoltório nuclear. Existem duas membranas por núcleo, as quais se situam em regiões diametralmente opostas deste (Figs. 13, 23 e 26). Concomitante à presença das membranas adjacentes surgem, no citoplasma, microtúbulos orientados longitudinalmente (Figs. 20, 22, 30 e 46). Estes microtúbulos dispõem-se paralelamente ao envoltório nuclear, em fila única e ordenada, nas regiões em que as membranas adjacentes não são encontradas (Figs. 23 e 26). Também nesta fase o nucléolo deixa de ser observado e o material nuclear encontra-se nitidamente diferenciado em duas regiões: uma interna de material cromatínico disposta em fibrilas pouco espessas e uma periférica em que a cromatina condensada forma uma camada fina junto à face interna do envoltório nuclear (Figs. 23 e 26). O núcleo das espermatídes sofre constrição lateral durante o processo de

alongamento. A constrição ocorre nos dois lados diametralmente opostos do núcleo, em que são encontradas as membranas adjacentes, formando depressões côncavas (Figs. 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31).

À medida em que progride o alongamento do núcleo, aumentam de espessura a camada de material cromatínico depositada junto à face interna da membrana nuclear (Figs. de 34 a 38) e as fibras contorcidas, deste mesmo material, que são encontradas na região central da referida organela (Figs. 20, 21, 22, 34, 35). O conteúdo nuclear continua o seu processo crescente de condensação apresentando-se na forma de filamentos espessos e/ou grupos cada vez maiores (Figs. de 29 a 33). As concavidades laterais do núcleo vão-se tornando cada vez menos acentuadas até tornarem-se pouco perceptíveis no contorno nuclear (Figs. 29, 32, 33 e 39). A necessidade de eliminação de excesso de nucleoplasma e de envoltório nuclear determina o aparecimento de uma protuberância na região posterior do núcleo que resulta na formação de um bulbo nuclear contendo material de baixa densidade eletrônica (Figs. 22 e 39).

As membranas adjacentes, durante o amadurecimento das espermátides, afastam-se progressivamente do núcleo (Figs. de 40 a 44), ao mesmo tempo em que as extremidades laterais destas membranas se enrolam para dentro como um pergaminho (Figs. 29, 32, 33, 39). Ocasionalmente, em espermátides próximas da maturidade, as membranas adjacentes podem ser observadas, cada uma delas, separadas ao meio e com cada uma das suas extremidades laterais enrola-

das para dentro (Figs. 41 e 43). O núcleo da célula espermatóica é acompanhado pelas membranas adjacentes desde a sua extremidade anterior (Fig. 42), na qual se insere o acrosoma, até sua extremidade posterior (Figs. 45 e 74) onde se inicia o flagelo.

Os microtúbulos, dependendo da região nuclear, aparecem paralelamente a apenas uma das faces do envoltório nuclear delimitadas pelas membranas adjacentes (Figs. 32 e 33) e não são visíveis no citoplasma da região que margeia o bulbo nuclear (Fig. 39).

O material cromatínico na espermatóide em fase final de maturação encontra-se bastante compactado (Figs. de 39 a 46), porém sua natureza fibrilar ainda é evidente (Fig. 44). Este material atinge no espermatozóide o seu grau máximo de compactação apresentando-se como uma massa homogênea onde nenhuma sub-estrutura foi observada (Figs. de 47 a 53).

Nas espermatóides em estágio terminal de desenvolvimento, nas quais as membranas adjacentes já se afastaram das bordas nucleares, microtúbulos em grande quantidade, em fila única ou dupla, circundam totalmente o núcleo (Figs. de 40 a 44). Também nesta ocasião pode-se observar um halo claro de citoplasma pouco eletrônico-denso entre o núcleo e os microtúbulos que o circundam (Figs. 40, 42, 43 e 44).

As membranas adjacentes e os microtúbulos que circundam o núcleo não persistem no espermatozóide, sendo eliminados juntamente com o citoplasma desta região celu-

lar (Fig. 45).

O ADJUNTO DO CENTRÍOLO

Logo nas primeiras fases da espermiogênese em *C. capitata* observa-se nas espermátides um corpo electrónico de aspecto granular e com áreas electrónico-lúcidas justaposto à região posterior do núcleo, onde se insere o flagelo (Figs. 10, 12, 18, 19). Este corpo, denominado adjunto do centríolo, circunda a região inicial do axonema (Fig. 12) e estende-se até um pouco além do início dos derivados mitocondriais (Figs. 13, 15 e 24). Nas espermátides jovens, microtúbulos longitudinalmente orientados aparecem associados a esta estrutura (Figs. 13, 24, 29 e 39). Na região de contato entre o núcleo e o adjunto do centríolo, o envoltório nuclear apresenta-se descontínuo e modificado pela deposição de uma camada fina de material electrónico denso (Fig. 12).

O adjunto do centríolo decresce durante a espermiogênese, passando a ser observado associado ao axonema e aos derivados mitocondriais, situando-se entre os últimos (Figs. 31, 39, 45, 76, 78). Permanece no espermatozóide, na região final da cabeça e inicial da cauda, como uma estrutura bastante compacta, electrónico-densa, localizada entre os derivados mitocondriais (Figs. 51, 53, 81, 86 e 92).

O COMPLEXO MULTIVESICULAR

Um complexo multivesicular foi observado no citoplasma de espermátides jovens de *C. capitata*. Tal estrutura consiste de vesículas individuais com conteúdo elétron-lúcido, agrupadas, embebidas em material granular fino. O conjunto todo aparentemente não apresenta envoltório membranoso e foi localizado ao lado do núcleo nas proximidades da região em que se insere o axonema (Figs. 12 e 27). Porém, nem a origem, nem o destino deste material puderam ser acompanhados durante o desenrolar da espermiogênese.

O AXONEMA

A - O CORPÚSCULO BASAL

Em *C. capitata*, como na maioria dos insetos, as espermátides retêm aparentemente um centríolo só, que se modifica no corpúsculo basal do flagelo. O arranjo típico de nove grupos de microtúbulos triplos, ainda pôde ser observado na região de inserção do axonema no núcleo, em espermátides em fase adiantada de maturação (Fig. 68). A figura 12 mostra, em corte longitudinal de uma espermátide jovem, o corpúsculo basal do flagelo envolto pelo adjunto do centríolo. Em espermátides em fase terminal de diferenciação o par central de microtúbulos parece dispor-se ao longo de todo corpúsculo basal (Fig. 45) e

estar ausente no ponto de inserção deste no núcleo. O ponto de inserção do corpúsculo basal no núcleo, da espermátide, apresenta-se preenchido por material de baixa densidade eletrônica (Figs. 46 e 50).

B - A FORMAÇÃO DO AXONEMA

O axonema das células espermáticas de *C. capitata*, como na maioria dos insetos, consiste de dois microtúbulos centrais, nove microtúbulos duplos e nove microtúbulos acessórios, segundo o padrão fundamental $9 + 9 + 2$ (Fig. 70). No axonema do espermatozóide deste inseto, como em qualquer outro cílio ou flagelo, um membro de cada um dos nove microtúbulos duplo é ligeiramente menor que o outro. Este membro, denominado subfibra A, tem dois pequenos braços voltados para o membro maior (subfibra B) da dupla adjacente (Figs. 29 e 70). Outra característica frequentemente observada no axonema dos espermatozóides dos insetos e também em *C. capitata* são os depósitos de material elétron-denso no interior do par central de microtúbulos e no interior das nove fibras acessórias (Figs. 80, 87 e 108) e fibras elétron-densas que surgem entre o par central de microtúbulos e as nove duplas de microtúbulos que o circundam, bem como entre as nove fibras acessórias (Fig. 52). O axonema do espermatozóide de *C. capitata* ainda apresenta um bastonete, de alta densidade eletrônica, no centro do par central de microtúbulos e no centro das fibras acessórias (Figs. 79 e 108), e estende-se desde a região posterior do núcleo até a extremidade final da

cauda do espermatozóide (Fig. 84), onde ocorre o término e a desorganização de alguns de seus elementos tubulares (Figs. 84 e 85).

Na espermátide bastante jovem o axonema em formação, rodeado por membranas, aparece no citoplasma ao lado do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial, abaixo do núcleo (Fig. 4). No estágio seguinte o axonema, constituído apenas pelo par central e pelas nove duplas periféricas de microtúbulos, permanece circundado por uma membrana lisa e dupla, e apresenta-se ladeado por duas massas iguais resultantes da divisão do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial (Figs. 54 e 59). O axonema na extremidade da cauda da espermátide em alongamento constitui-se, apenas, do par central e das duplas periféricas de microtúbulos, estando ausentes, aí, os derivados mitocondriais e as fibras ou microtúbulos acessórios (Figs. 9 e 58).

As fibras ou microtúbulos acessórios do axonema são formadas a partir de projeções da subfibra B das duplas periféricas de microtúbulos (Figs. 60 e 106), fato que coincide com o aparecimento das fibras electrón-densas entre o par central e as duplas periféricas de microtúbulos (Figs. 60, 62 e 106). Com o amadurecimento da espermátide a membrana dupla que envolvia o axonema aparentemente se desintegra (Figs. 56 e 57), ao mesmo tempo em que surgem no citoplasma da espermátide, membranas lisas e duplas que envolvem quase por completo o conjunto formado pelos derivados mitocondriais e o axonema (Figs. 56 e 57). Dobras ou bolhas nas bordas das células, provavelmente

decorrentes da eliminação de material citoplasmático e de membranas, também foram observadas neste interim (Figs. 56 e 57). O passo subsequente corresponde ao aparecimento das fibras eléctron-densas entre as fibras acessórias (Figs. 70 e 107).

Nas demais eletromicrografias obtidas dos estádios seguintes do desenvolvimento das espermatídes de *C. capitata* o axonema já apresenta-se completamente maduro e, portanto, com todos os seus componentes: o par central de microtúbulos preenchido por material eléctron-denso e contendo um bastonete, central, de alta densidade eletrônica; fibras e depósito de material eléctron-denso entre o par central e as duplas periféricas de microtúbulos; duplas periféricas formadas pelas subfibras A e B; fibras acessórias preenchidas por material eléctron-denso e contendo um bastonete, central, de alta densidade eletrônica; e fibras eléctron-densas entre as fibras acessórias (Figs. 59, 63, 65, 66, 67, de 71 a 79 e 108).

Dependendo da altura da cauda em que as espermatídes foram cortadas, podem-se observar as amplas massas citoplasmáticas comuns existentes entre as espermatídes de um mesmo cisto (Figs. 59, 67, 71, 73). Estas espermatídes apresentam o axonema maduro, em alguns casos ainda circundado por membranas (Fig. 59), e citoplasma abundante, rico em ribosomas (Figs. 59, 67, 71, 73) e com vesículas contendo material fibrilar (Figs. 71 e 74).

Em cortes de cistos na região da cauda de células espermatícas jovens pode-se observar a existência de

uma ligação entre o axonema e os derivados mitocondriais (Figs. 69 e 72), a qual não foi detectada em cortes correspondentes de células espermáticas maduras. Espessamentos da membrana plasmática também foram notados na região de contato entre duas células vizinhas (Figs. 72 e 74).

Nas espermátides em fase final de maturação o axonema mantém-se inalterado enquanto completam-se as transformações nos derivados mitocondriais e ocorre a eliminação do material citoplasmático (Figs. 45, 50 e 79).

No espermatozóide o axonema conserva a organização do axonema maduro, já descrita em parágrafo precedente (Figs. de 51 a 53, de 80 a 83, 86 e 87).

OS DERIVADOS MITOCONDRIAIS

Como já mencionado anteriormente, as mitocôndrias existentes no citoplasma das espermátides jovens, fundem-se formando o "Nebenkern" ou complexo mitocondrial (Figs. de 1 a 4). Este complexo divide-se em duas massas iguais que começam a se alongar concomitantemente ao desenvolvimento do axonema, e dão origem aos dois derivados mitocondriais, que se dispõem um de cada lado do axonema (Figs. de 5 a 8, 54 e 55). Ambos os derivados mitocondriais, de idênticas proporções, estendem-se desde a extremidade posterior do núcleo (Figs. 10, 12, 18 e 81) até às proximidades da extremidade final da cauda do espermatozóide do inseto (Figs. 84 e 85). Um dos dois derivados

mitocondriais, alonga-se um pouco mais que o outro em direção à região posterior do núcleo, onde se insere o flagelo e se justapõe o adjunto do centríolo (Figs. 45, 50, 51, 53 e 81).

Num dos estádios iniciais do desenvolvimento das espermatídes porções de citoplasma adentram os derivados mitocondriais em alongamento (Figs. de 5 a 9, 54 e 55). Nesta ocasião os derivados mitocondriais aparecem delimitados por membrana lisa e dupla, sendo que as porções de citoplasma que os adentram encontram-se limitadas a esta membrana (Fig. 54). No citoplasma destas espermatídes existem extensas membranas do retículo endoplasmático que envolvem os derivados mitocondriais e o axonema (Fig. 54), numerosas cisternas do complexo de Golgi, e também começam a surgir microtúbulos orientados longitudinalmente (Fig. 55).

Durante o alongamento das células os derivados mitocondriais, pareados e mantendo sempre proporções idênticas, diminuem consideravelmente de diâmetro e perdem gradualmente as cristas mitocondriais (Figs. 61, 66, 67). Também nesta ocasião começam a se desintegrar as membranas ao redor do axonema, embora extensas membranas lisas persistam no citoplasma (Figs. 56, 57, 78).

Uma camada simples de microtúbulos, surge ao redor e entre os derivados mitocondriais (Figs. 14, 29, 60, 61, 62, 70, 72) das espermatídes. No citoplasma da região inicial da cauda destas células observa-se também uma grande quantidade de tais microtúbulos (Fig. 74). No

entanto nenhum destes microtúbulos permanece no espermatozóide (Figs. 51, 52, 80, 81, 82).

Concomitantemente aos eventos descritos acima se dá o aparecimento de formações cristalóides densas no interior dos derivados mitocondriais (Figs. 60 e 62). Estas formações correspondem ao arranjo hexagonal de numerosos bastões ao longo da face interna da membrana dos derivados mitocondriais adjacente ao axonema (Fig. 76). O material elétron-denso em arranjo paracristalino continua a se acumular até preencher completamente os derivados mitocondriais (Figs. de 50 a 53, 70, 73, 75, 77 e de 79 a 83). Em cortes longitudinais os bastões apresentam uma conformação ondulada (Figs. 63, 64) e com o amadurecimento das espermátides estes bastões vão-se aproximando cada vez mais. No espermatozóide o material elétron-denso atinge seu grau máximo de compactação conservando no entanto, seu arranjo hexagonal original (Fig. 87). Em preparações de espermatozóides contrastadas negativamente em PTA, pode-se observar que os cristalóides mantêm seu complexo padrão de organização e apresentam uma periodicidade de cerca de 110 Å em seu eixo transversal e de 260 Å em seu eixo longitudinal (Figs. 103 e 105).

As membranas interna e externa dos derivados mitocondriais mantêm-se intactas no espermatozóide (Figs. 52 e 81) porém não existem indicações de que as cristas persistam.

Os derivados mitocondriais que apresentavam contorno esférico na espermátide em fase adiantada de matura-

ção (Fig. 70), no espermatozóide apresentam-se côncavos na face adjacente ao axonema, planos na face em que correm paralelos, e convexos na face externa, adjacente à membrana plasmática (Figs. 52, 80 e 82).

A MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática do espermatozóide de *Ceratitis capitata* apresenta a estrutura de uma unidade de membrana, mostra-se, portanto, trilaminar e é assimétrica. A camada eléctron-densa externa apresenta-se mais espessa que a camada eléctron-densa mais interna (Fig. 109). Nenhum recobrimento de material regularmente arranjado foi detectado na superfície externa desta membrana, em qualquer das etapas que caracterizam o desenvolvimento normal das espermátides deste inseto.

O ESPERMATOZÓIDE NA ESPERMATECA

O manuseio das espermatetas ofereceu alguns problemas. Frequentemente durante a "toilette" dos blocos ou mesmo no micrótomo a cutícula da espermateca destacava-se do Epon. Em diversos cortes observados, as espermatetas apresentavam conteúdo esparso e pobremente preservado. Boa preservação do material contido nas espermatecas só foi obtida quando os espermatozóides encontravam-se agru-

pados junto à cutícula (Fig. 91).

As micrografias eletrônicas dos espermatozoides de *C. capitata* no trato genital feminino, por ocasião da estocagem destes nas espermatecas, aparentemente não evidenciaram diferenças morfológicas de sua estrutura básica em relação às observações feitas de espermatozoides ainda no trato genital masculino, mais especificamente nos testículos (Figs. 91 e 92).

Preparações de espermatozoides obtidos a partir de espermatecas, contrastadas negativamente em PTA, mostraram serem estes filiformes com um comprimento total de cerca de 150 μm , medida esta tomada do único espécime não fragmentado pelo processo de fragmentação ultra-sônica (Fig. 93). Cada espermatozoide é constituído por uma cabeça e uma cauda (ou flagelo) extremamente longas. A cabeça contém o acrosoma e o núcleo (Figs. de 94 a 97). O acrosoma insere-se na extremidade anterior do núcleo, tem cerca de 1,5 μm de comprimento, apresenta forma de ampola, contém em seu interior material elétron-denso em arranjo periódico e acha-se envolto por um complexo de membranas (Figs. 96 e 97). O núcleo é uma estrutura extremamente elétron-densa (Fig. 98) e em sua extremidade posterior insere-se o axonema (Figs. 99 e 101). A cauda ou flagelo do espermatozoide é formada pelo axonema e pelos dois derivados mitocondriais (Figs. 102 e 104), sendo que em sua extremidade final apenas o axonema incompleto e desorganizado persiste (Figs. de 93 a 95). Na figura 100 podem-se observar os microtúbulos centrais, as duplas periféricas

de microtúbulos, as fibras acessórias e mais o material eléctron-denso que constituem o axonema. As figuras 103 e 105, fragmentos dos derivados mitocondriais, mostram o material eléctron-denso em arranjo paracristalino, o qual preenche totalmente tais estruturas.

Preparações deste mesmo material, espermatozói-des contidos nas espermatecas das fêmeas de *C. capitata*, contrastadas negativamente em solução aquosa de acetato de uranila a 2% a pH 4,0 não apresentaram resultado satisfatório. Como não se procedeu ao acerto do pH da solução de uranila utilizada, atribuímos à alta acidez desta solução a baixa qualidade apresentada por nossos preparados. Portanto, as micrografias eletrônicas obtidas do material por este tratamento não foram incluídas no nosso estudo.

VARIAÇÕES METODOLÓGICAS

VARIAÇÃO A - ESTOCAGEM DO MATERIAL PARA ESTUDO, EM GLUTARALDEIDO A 0,25%, POR 7 A 15 DIAS, A 10°C E PÓS-FIXAÇÃO, DO MESMO, EM MISTURA DE TETRÓXIDO DE ÓSMIO E FERRICIANETO DE POTÁSSIO, OU EM MISTURA DE TETRÓXIDO DE ÓSMIO E ÁCIDO TÂNICO.

A estocagem, com concomitante fixação, de testículos, de machos de *Ceratitís capitata*, em solução de glutaraldeido a 0,25% em tampão fosfato Sorensen 0,1M, a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio.

cio, por períodos de 7 a 15 dias, a 10°C, mostrou não ter influência na qualidade da preservação das estruturas internas das células espermáticas, a qual se apresentou sempre bastante satisfatório.

A pós-fixação do material em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico, ou em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio preserva bem as estruturas internas das células espermáticas e evidencia particularmente bem membranas (Figs. de 12 a 22, 26, 27, 35, 46, 73 e 81, e de 1 a 4, 54, 56 e 57).

VARIAÇÃO B - FIXAÇÃO EM MISTURA DE GLUTARALDEIDO E ÁCIDO TÂNICO.

A fixação, do material em estudo, em solução de glutaraldeido a 3% em tampão fosfato Sorensen 0,1M a pH 7,4, contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, adicionado de 2% de ácido tânico, com pós-fixação em tetróxido de ósmio, não mostrou resultados satisfatórios. Os testículos ficaram rijos e quebradiços, o que dificultou e prejudicou a obtenção de bons cortes. Quando da observação, após a contrastação dos cortes com uranila e chumbo, constatou-se também que o material não apresentava uma boa preservação das estruturas internas das células espermáticas. Porém as figuras 68 e 69 foram de grande valia para nosso estudo.

VARIAÇÃO C - DESIDRATAÇÃO EM ETANOL 95% CONTENDO 2% DE
PTA.

Em cortes de material submetido à desidratação em álcool contendo 2% de PTA e não contrastado com uranila e chumbo, detectou-se diferenças de densidade eletrônica entre os núcleos das células espermáticas em diferentes fases de maturação. Este mesmo material quando contrastado com uranila e chumbo e novamente observado, não apresentou outras diferenças de densidade eletrônica do núcleo das células espermáticas, que não aquelas devidas à compactação cromatínica inerente à espermiogênese.

Os núcleos das células espermáticas jovens provenientes de material desidratado em álcool contendo 2% de PTA, e não contrastado com uranila e chumbo, apresentam densidade eletrônica semelhante à dos núcleos das células somáticas quando tratados pelo mesmo processo (Figs. de 7 a 9). Os núcleos, de espermátides em alongamento e em processo de compactação de seu material cromatínico, mostram-se elétron-densos apenas em sua região central e em algumas zonas próximas à face interna do envoltório nuclear (Fig. 36). Os núcleos dos espermatozóides tratados por EPTA apresentam-se elétron-lúcidos (Figs. 47, 53 e 86). Já os núcleos das células somáticas da parede do cisto apresentam densidade eletrônica normal, tendo inclusive o nucléolo bem diferenciado (Fig. 47). Por este mesmo método de preparação o par central de microtúbulos e as fibras acessórias do axonema não apresentam conteúdo eléc-

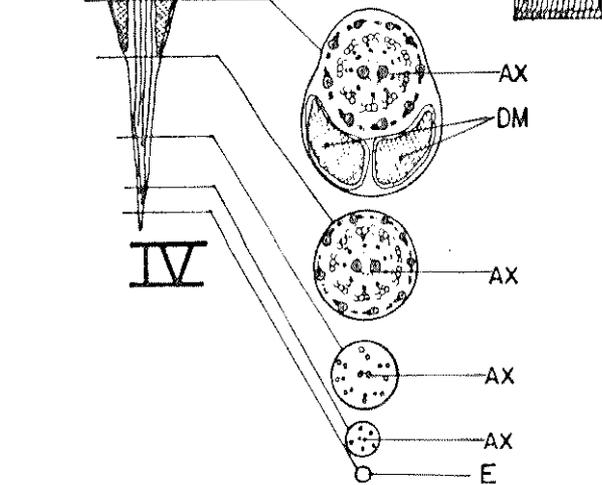
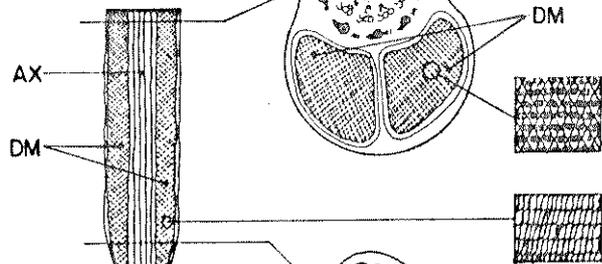
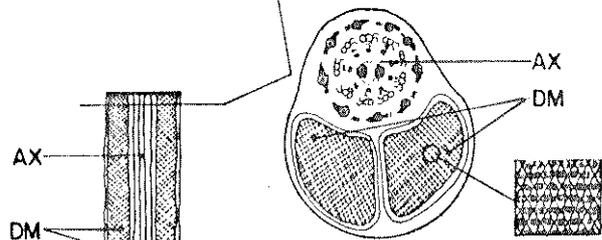
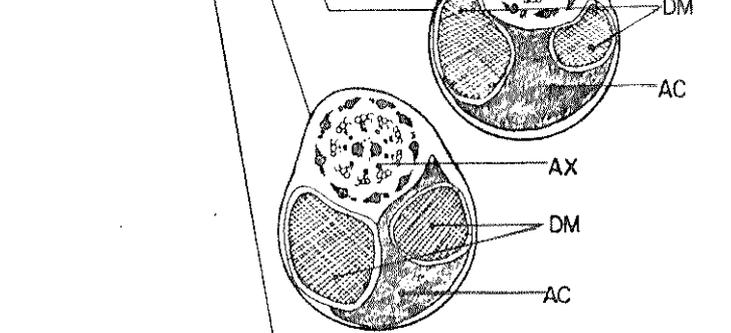
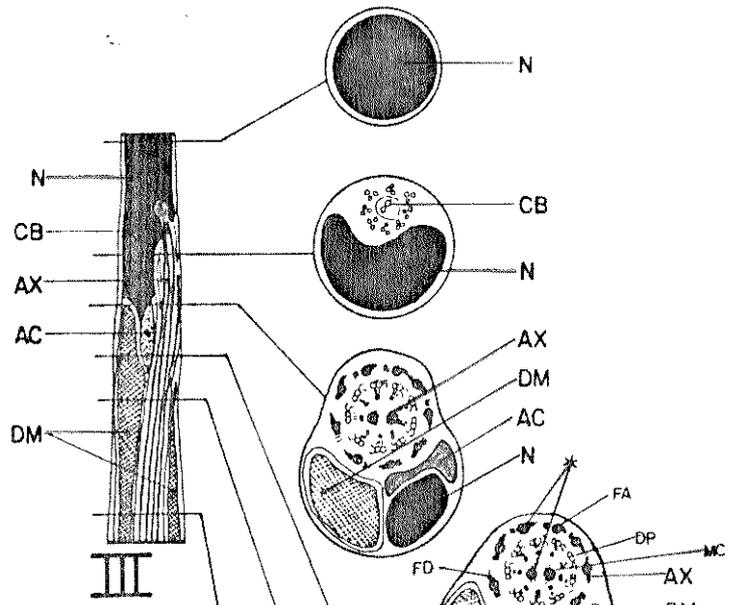
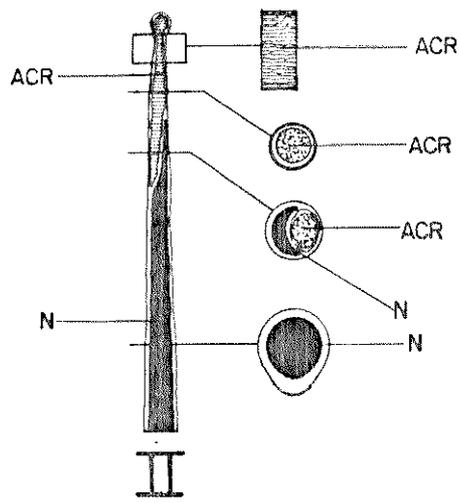
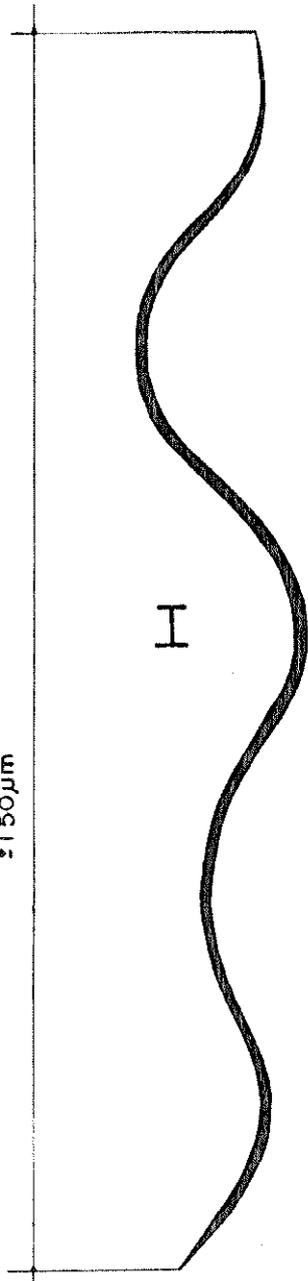
tron-denso, enquanto que os derivados mitocondriais apresentam alta densidade eletrônica, e a natureza hexagonal do arranjo do material que os preenche pode ser observada (Fig. 87). Diferenças de densidade eletrônica também foram notadas na região dos derivados mitocondriais onde aparecem as formações cristalóides densas, dependendo da fase do desenvolvimento da espermátide (Figs. 75 e 77).

Os núcleos das células espermáticas jovens, de material desidratado em álcool contendo 2% de PTA (EPTA) e contrastado com uranila e chumbo, não apresentam diferenças significativas de densidade eletrônica daqueles que não haviam recebido uranila e chumbo (Figs. 5 e 6). Já os núcleos das espermátides em alongamento e em processo de compactação de seu material cromatínico, tratados por EPTA, quando contrastados com uranila e chumbo voltam a apresentar a densidade eletrônica característica desta fase de seu desenvolvimento. Sendo as zonas de maior densidade eletrônica detectadas anteriormente, quando do tratamento por EPTA, sem contrastação por uranila e chumbo, correspondentes às regiões em que o material cromatínico encontra-se menos compactado (Figs. 36, 37 e 38). Os núcleos dos espermatozoides que, em ausência de uranila e chumbo, apresentavam-se elétron-lúcidos, quando do uso destes mostraram elevada densidade eletrônica (Fig. 49). A observação das figuras 36 e 37 mostra que não houve diferenças significativas na densidade eletrônica apresentada pelos flagelos quando do uso ou não da contrastação por uranila e chumbo.

Esquema mostrando um espermatozóide de *Ceratitis capitata* e a ultra-estrutura das diferentes partes de que é constituído. I = espermatozóide; II = região inicial da cabeça do espermatozóide; III = região compreendida entre o final da cabeça e o início da cauda do espermatozóide; IV = região final da cauda do espermatozóide; ACR = acrosoma; N = núcleo; CB = corpúsculo basal; DM = derivado mitocondrial; AC = adjunto do centríolo; AX = axonema; MC = par de microtúbulos centrais; DP = duplas periféricas de microtúbulos; FA = fibras acessórias; * = material electrónico denso depositado no interior dos microtúbulos centrais e das fibras acessórias; FD = fibras electrónico-densas entre os microtúbulos centrais e as duplas periféricas de microtúbulos, e entre as fibras acessórias; E = extremidade final da cauda do espermatozóide.

Na complementação de nossas observações para a elaboração do esquema da ultra-estrutura do corpúsculo basal, do axonema e da extremidade final da cauda do espermatozóide de *C. capitata* utilizamos as publicações de Warner (91, 92) sobre *Sarcophaga bullata* e também as de Perotti (56) e de Tokuyasu (86) sobre *D. melanogaster*.

≈ 150μm



DISCUSSÃO

A espermiogênese em *Ceratitis capitata* segue uma sequência de eventos morfológicos semelhante àquela observada para a maioria dos insetos (60) e particularmente semelhante às descritas por Schrankel e Schwalm (70) para *Coelopa frigida*, por Warner (92) para *Sarcophaga bullata* e por Baccetti e Bairati (4; 12) em *Dacus oleae*.

Nos cistos, nos testículos, de *Ceratitis capitata* encontramos cerca de 250 células espermáticas. A quantidade teoricamente esperada seria de 256 células espermáticas por cisto, ou seja 2^n sendo $n = 8$ (60). Kiefer (43) e Anderson (1) relatam que em *D. melanogaster* frequentemente o número de espermatozoides observados por cisto é inferior àquele teoricamente esperado. O número de células espermáticas, teoricamente esperado, por cisto em *D. melanogaster* é de 64 (22) porém segundo Kiefer (43) somente cerca de 20% dos cistos maduros apresentam a quantidade teoricamente esperada de espermatozoides. Cremos que a diferença entre o número de células espermáticas teoricamente esperado por cisto e o número destas mesmas células efetivamente observado nos cistos de *C. capitata*, bem como em *Drosophila*, deva-se à eliminação de células possivelmente inviáveis devido a alterações morfofuncionais.

Segundo Virkki (90), os dados do parágrafo acima, número de células espermáticas por cisto, são indicativos da posição filogenética ocupada pelo inseto dentro do gru-

po a que pertence. Estudos deste autor levaram-no a concluir que as ordens mais primitivas de insetos possuem um número maior de células espermáticas por cisto do que as ordens mais modernas, e que dentro de uma mesma ordem, os grupos mais modernos ou mais especializados tendem a possuir menos espermatozóides por cisto. Virkki (90) sugere também que o número reduzido de espermatozóides por cisto pode indicar uma menor produção global de espermatozóides, o que provavelmente teria um valor adaptativo na limitação da variabilidade genética. De acordo com este estudo *C. capitata* e *Dacus oleae* (4) (Diptera, Tephritidae), ambos com 256 espermatozóides por cisto, representam um grupo menos especializado relativamente à *Sarcophaga bullata* e à *Drosophila* sp, as quais apresentam respectivamente 128 (92) e 32 ou 64 ou 128 (22; 52) células espermáticas por cisto. Assim como *Ceratitis capitata* e *Dacus oleae*, *Sarcophaga bullata* e *Drosophila* sp. pertencem à ordem Diptera, à subordem Cyclorrhapha e à tribo Schizophora.

Muitos investigadores (4; 35; 52; 80) tem relatado que nos insetos as espermátides jovens apresentam-se amplamente separadas ou encontram-se ligadas, como também por nós observado em *C. capitata*, por pontes finas de citoplasma. Estas pontes resultam de citocineses incompletas durante as divisões goniais e meióticas das células germinativas. O porquê da retenção das comunicações citoplasmáticas entre as células espermáticas dos insetos tem sido uma preocupação constante entre os estudiosos da espermiogênese. Diversas funções tem sido atribuídas à permanência destas intercomunicações celulares. Fawcett, Ito e

Stutterback (25) postularam que tais conexões poderiam facilitar a difusão de uma substância que exerceria o controle da diferenciação sincrônica. Uma outra interpretação (75) enfatiza a "igualdade de oportunidades fisiológicas" em grandes grupos de células que algumas vezes encontram-se isoladas de seus suprimentos sanguíneos. Uma idéia posterior (77) propõe que a morfologia geral das células dos cistos e a retenção das pontes citoplasmáticas poderiam ser, ambas, mecanismos para distribuição equitativa dos nutrientes que chegam, e eliminação do acúmulo de produtos residuais. Ainda uma possibilidade adicional (77) aplicável à diferenciação da célula germinativa, seria que as intercomunicações citoplasmáticas serviriam para uma distribuição mais uniforme das moléculas de informação sintetizadas durante a prófase da meiose.

As espermátides de *C. capitata* a certa altura do processo de diferenciação, como também as espermátides de *D. melanogaster* observadas por Kieffer (43), Stanley e colaboradores (77), Tokuyasu, Peacock e Hardy (87), aparecem fundidas na região da cauda em um extenso sincício, separando-se novamente nas últimas fases da maturação. Para Stanley e colaboradores (77) as amplas fusões de massas citoplasmáticas anteriormente separadas dão a impressão de ocorrerem ao longo do comprimento de cada cisto, e as células individuais de separarem-se novamente em estádios posteriores. Estes mesmos autores observaram em numerosos cortes ao longo do comprimento das espermátides que em qualquer grupo de espermátides iguais, alguns níveis apre-

sentam uma separação completa em células individuais enquanto outros níveis, na altura da cauda, encontram-se fundidos em amplas massas citoplasmáticas comuns. Stanley e colaboradores (77) acreditam que tais configurações sejam resultantes de fixação inadequada e da compressão ou estiramento dos testículos durante a manipulação dos tecidos. Já Tokuyasu, Peacock e Hardy (87) trabalhando com *Drosophila melanogaster*, relatam o aparecimento de extensas pontes citoplasmáticas entre as espermátides de um mesmo cisto, na altura da cauda das mesmas, no período imediatamente anterior à fase de individualização destas células. Segundo estes autores as pontes não são uniformemente distribuídas ao longo do enorme comprimento da cauda, mas todas as espermátides encontram-se provavelmente interconectadas em um nível ou em outro. Entendem ainda que tais pontes são variáveis tanto em comprimento como em largura e que na região da cabeça, as conexões raramente são observadas. Da Cruz-Landim (23) em estudo realizado sobre a formação de membranas durante a espermatogênese de *Conocephalus saltator* (Orthoptera), também relata a presença de pontes citoplasmáticas mais largas do que as usualmente observadas entre espermátides que pertencem a um mesmo cisto. Segundo observações pessoais do mesmo autor estas pontes citoplasmáticas mais largas ou as amplas massas citoplasmáticas comuns observadas entre as espermátides de um mesmo cisto, seriam as mesmas pontes estreitas do início da espermiogênese que se tornariam mais amplas devido ao processo geral de alongamento das espermátides.

As extensas pontes citoplasmáticas que surgem

interligando espermatídes de um mesmo cisto em *C. capitata* tem comportamento semelhante ao descrito por Tokuyasu, Peacock e Hardy (87) em *D. melanogaster*. Observamos também em *C. capitata* que o aparecimento de tais ligações, como em *D. melanogaster* (87) é sempre anterior à fase de individualização das espermatídes. Com base nestes dados e de acordo com os autores supra citados, cremos que o aparecimento de tais pontes seja característico de uma fase específica da espermiogênese nestes insetos, e discordamos do postulado por Stanley e colaboradores (77) que as referidas pontes possam ser artefato de técnica.

ESTÁDIOS QUE CARACTERIZAM A ESPERMIOGÊNESE
NORMAL EM *CERATITIS CAPITATA*

O desenvolvimento sincrônico de espermatídes isôgenas e a orientação paralela das células dentro dos cistos são observados mesmo nos estádios mais avançados da espermiogênese nos insetos. Tais fenômenos permitem o estabelecimento de uma sequência bastante precisa dos eventos que ocorrem durante o processo de diferenciação da célula espermatíca. Neste estudo, nos propusemos a estabelecer, para *C. capitata*, a correlação do desenvolvimento das organelas com as várias fases de sua espermiogênese. Estudos semelhantes foram desenvolvidos por Stanley e colaboradores (77) para *Drosophila melanogaster*, e por Szöllösi (78) para *Locusta migratória*, com o objetivo de traçar uma li-

nha mestra para orientação de investigações futuras e que se constituísse num instrumento auxiliar no entendimento das anormalidades que podem ocorrer durante a espermiogênese. Proposta esta que também fizemos nossa e, a despeito de ser este um sistema dinâmico, apontamos na espermiogênese de *C. capitata* dez estádios característicos. O terceiro destes estádios, devido talvez à curta duração temporal dos eventos que o caracterizam, não foi documentado e encontra-se descrito fundamentado nas observações dos estádios que o antecederam e o procederam, e nas observações de Stanley e colaboradores (77) e Szöllösi (78) para o estádio correspondente. Junto à caracterização destas fases, a morfologia das organelas individuais foi estudada e suas transformações progressivas também foram acompanhadas.

O ACROSOMA

Recentes revisões abordando o processo de diferenciação das células espermáticas (3; 60; 96) apontam o acrosoma dos insetos, qual o dos outros animais, como um produto do complexo de Golgi. Na maioria das espécies de insetos nas quais a formação do acrosoma foi documentada, pode-se observar inicialmente o aparecimento de um corpo esférico, denominado grânulo pró-acrosômico, junto à face côncava do complexo de Golgi. Este grânulo situa-se entre a vesícula mais interna do complexo de Golgi e o núcleo da

espermátide jovem, e passa por modificações graduais até atingir sua forma definitiva no final da espermiogênese.

Em *C. capitata* os primeiros momentos da formação do acrosoma não foram por nós documentados. Supomos que tal fato deva-se à rapidez com que este evento se processa. A organela em questão só foi por nós observada quando já no formato de um grânulo denso situado anteriormente ao núcleo das espermátides em alongação. Nestas espermátides uma membrana intersticial, da qual não dispomos de referências de que tenha sido anteriormente observada nos dípteros, percorre o espaço existente entre o acrosoma e o núcleo. Estrutura semelhante foi detectada por Kaye (37) em *Acheta domesticus*, por Szöllösi (78) em *Locusta migratoria*, por Baccetti e colaboradores (8) em *Bacillus rossius*. McMaster-Kaye e Kaye (49) sugerem que a membrana intersticial seja responsável pelo posicionamento do grânulo proacrosomal e pela sua união ao núcleo nas fases iniciais da espermiogênese.

O acrosoma do espermatozóide de *C. capitata* é pequeno e ocupa uma posição lateral em relação à extremidade anterior do núcleo, o que parece ser uma característica comum entre os dípteros (3; 56; 92). Sua organização ultra-estrutural mostra detalhes e períodos similares àqueles só previamente observados nos dípteros por Warner (92) no acrosoma do espermatozóide de *Sarcophaga bullata*.

Acredita-se que o acrosoma dos espermatozóides dos animais esteja envolvido na penetração destes através da membrana do óvulo e sabe-se que o mesmo contém enzimas

hidrolíticas. Phillips (61) sugere que estas enzimas poderiam se encontrar especificamente distribuídas, em arranjos paracristalinos, nas diversas regiões do acrosoma. Esta sugestão nos leva a traçar um paralelo entre o material em arranjo paracristalino observado no interior do acrosoma de *Ceratitis capitata* e as enzimas hidrolíticas referidas por Phillips (61). O arranjo paracristalino por nós observado no interior do acrosoma de *C. capitata* é bastante uniforme, daí nossa suposição de que o conteúdo enzimático desta organela tenha uma distribuição homogênea ao longo de seu comprimento. Diferentemente do observado por Kaye (37) em Orthoptera e suposto por Perotti (56) para *Drosophila melanogaster*.

AS TRANSFORMAÇÕES NUCLEARES

A - O ALONGAMENTO DO NÚCLEO E A CONDENSAÇÃO DA CROMATINA

O formato do núcleo dos espermatozoides varia amplamente entre os animais e parece ser uma característica de determinadas ordens, famílias ou mesmo de espécies individuais. São numerosos os estudos referentes às transformações que ocorrem nos núcleos das células sexuais masculinas e sobre os possíveis mecanismos que concorram para as mesmas durante a espermiogênese. Em *Ceratitis capitata* pôde-se observar que o núcleo das espermátides jovens apresenta um formato esférico a ovóide com conteúdo cromatínico semelhante em aparência à cromatina do núcleo das células somáticas. Durante o processo de alongamento esta

52261Bc

cromatina sofre intenso processo de reorganização resultando em uma massa altamente compacta contida em um núcleo extremamente alongado característico da maioria das espécies de insetos (3; 60). Neste inseto, em espermatídes jovens cujos núcleos apresentam-se ovóides, aparentes poros nucleares formam um arranjo específico em uma área determinada do envoltório nuclear. Poros nucleares em arranjo similar foram observados por Stanley (76) no peixe teleosteo *Oligocottus maculosus*. Acúmulo de poros nucleares em região determinada do envoltório nuclear foi também documentado por Terakado (81) em espermatídes jovens de *Physa acuta*, um caramujo pulmonado. O possível significado funcional de tal arranjo não se encontra, ainda, esclarecido.

Em *C. capitata* surgem no citoplasma que circunda o núcleo da espermatíde, no início do período de alongamento deste, numerosos microtúbulos e duas membranas adjacentes ao envoltório nuclear em locais onde posteriormente se formam concavidades. Diversas teorias tem sido formuladas na tentativa de esclarecer os possíveis mecanismos implicados nas transformações que determinam as características finais do núcleo dos espermatozóides. Kessel postula (39; 40; 41) que os microtúbulos poderiam ser responsáveis pelo alongamento e formato do núcleo das células espermáticas. Fawcett, Anderson e Phillips (24) acreditam no entanto que a forma do núcleo poderia ser determinada por um padrão específico de agregação do DNA e proteína, geneticamente controlado, durante a condensação da cromatina.

Diferentes publicações ora corroboram uma, ora outra das hipóteses acima, ou até mesmo a ambas (29; 33; 42; 73; 94; 95). Mais recentemente Brick, Lifschitz e Friedländer (21) propuseram que a distribuição dos diferentes componentes celulares que parecem estar envolvidos no alongamento e formato do núcleo das células espermáticas seria dependente do envelope nuclear. Estes autores fundamentaram-se nas teorias de Tilney (82), e Franke e Sheer (28) que acreditam ser o envoltório nuclear um mosaico de áreas contendo diferentes informações posicionais.

Compartilhando o pensamento de Tokuyasu (84) nós julgamos que nenhum dos mecanismos abordados aqui poderia por si só, responder pelas complexas transformações que levam à estrutura final do núcleo dos espermatozoides. Cremos também que a interação entre o padrão de agregação da cromatina, os microtúbulos, a membrana nuclear e outros elementos citoplasmáticos, os quais serão discutidos a seguir, tenha importante papel nas transformações sofridas pelo núcleo das células espermáticas.

B - AS MEMBRANAS ADJACENTES

Nós relatamos aqui a presença de duas membranas adjacentes ao envoltório nuclear em espermátides de *Ceratitis capitata*. Estruturas similares foram relatadas em espermátides de *Sarcophaga* (92), *Leptogaster* (24), *Mallophagus* (77), *Drosophila* (77, 84) e *Coelopa* (70). Estas membranas são eliminadas juntamente com o citoplasma que

circunda o núcleo quando as espermátides aproximam-se da maturidade, não permanecendo portanto nos espermatozóides. Warner (92) estabelece que as membranas adjacentes ao núcleo apresentam a estrutura de uma unidade de membrana e originam-se do envoltório nuclear. Nenhum dos relatos posteriores de estruturas similares em espermátides de outras espécies de insetos, tampouco o nosso, corroboram a hipótese de origem de Warner (92). Já a estrutura de uma unidade de membrana foi observada em espermátides de *Coelelopa* (70), porém não nas espermátides de *Drosophila* (77; 84). A origem bem como a natureza das membranas em questão permanecem ainda desconhecidas.

Tokuyasu (84) acredita que as membranas adjacentes ao núcleo nas espermátides de alguns insetos tenham grande importância na distribuição dos microtúbulos e consequentemente nos mecanismos de condensação nuclear. Para Schrankel e Schwalm (70) as membranas conferem rigidez à cabeça da espermátide em alongamento. Ainda segundo estes mesmos autores o fato destas membranas não se deformarem mesmo com o aumento do denso empacotamento das espermátides no cisto, demonstra a grande estabilidade das mesmas.

C - AS CONCAVIDADES NUCLEARES

Em *Ceratitis capitata*, como já citado neste texto, uma das características das transformações nucleares são as concavidades que se desenvolvem durante o período de alongamento do núcleo e atingem o seu grau máximo no período

do inicial da condensação cromatínica. Tais concavidades desaparecem gradualmente e aparentemente não deixam sinais perceptíveis no formato final do núcleo do espermatozói-
de. Segundo Tokuyasu (84) é possível que a distribuição da cromatina no núcleo maduro seja determinada anteriormente à aquisição da grande rigidez pela cromatina, durante o processo final de agregação. Julga ainda que a formação das concavidades, as quais são mais profundas ao nível médio do núcleo, tornando-se mais suaves em ambas as extremidades, teriam um papel importante na definição da distribuição da cromatina. Nossas observações a respeito do processo de condensação da cromatina durante a espermiogênese em *C. capitata* nos conduzem à aceitação da hipótese do autor supra citado.

O ADJUNTO DO CENTRÍOLO

Em *Ceratitis capitata*, como tem sido descrito, analisado ou mencionado em muitas outras espécies de insetos (3; 60) observa-se justaposta à extremidade caudal do núcleo das espermátides e circundando a porção inicial do flagelo, uma estrutura de aspecto granular e com áreas eléctron-lúcidas. Tal estrutura, denominada adjunto do centríolo, apresenta-se bastante volumosa nas espermátides, diminui consideravelmente durante a espermiogênese, e permanece como um corpo relativamente pequeno, compacto e de alta densidade eletrônica nos espermatozóides. Comportamento semelhante a este foi descrito por Breland e

colaboradores (20) em diversas espécies de insetos, enquanto que em *Sciara* (58; 59), em algumas espécies de Lepidoptera e em alguns Tricoptera (60), e em pelo menos uma espécie de Coleoptera (29) o adjunto do centríolo desaparece completamente durante a espermiogênese.

Em espermátides de *C. capitata* o envoltório nuclear apresenta-se modificado por depósitos de material eléctron-denso na região de contato entre o adjunto do centríolo e o núcleo. Alterações semelhantes são relatadas por Yasuzumi e colaboradores (98) em espermátides de *Acrida lata*. No inseto por nós estudado o envoltório nuclear apresenta-se descontínuo na região supra citada. Warner (92) e também Schrankel e Schwalm (70) observaram descontinuidades no invólucro nuclear, na região em que se justapõe o adjunto do centríolo, em espermátides de *Sarcophaga bullata* e *Coelopa frigida* respectivamente. Schrankel e Schwalm (70) postulam que tais descontinuidades facilitariam a passagem de material entre o núcleo e o adjunto do centríolo. Entendem ainda que este material poderia originar-se das proteínas somáticas complexadas ao DNA, as quais são total ou parcialmente substituídas por proteínas específicas das células espermáticas no decorrer da espermiogênese, ou ainda de partes do genoma que tenham sido amplificadas nos espermatócitos, tais como as regiões nucleolares, e que também sairiam do núcleo durante o processo de maturação destas células (70).

Taffarele e Esponda (79) trabalhando com algumas espécies de Orthoptera, estudaram detalhadamente a nature-

za química do adjunto do centríolo, empregando diferentes técnicas citoquímicas de coloração para microscopia eletrônica, combinadas com algumas digestões enzimáticas. Os resultados obtidos por estes autores mostram que o adjunto do centríolo é composto principalmente por ribonucleoproteínas e proteínas. Apontaram, também, que histonas ricas em arginina e lisina, bem como um determinado tipo de proteína similar àquela que aparece no nucléolo parecem estar presentes no material que forma a estrutura em questão.

O adjunto do centríolo sofre mudanças na sua organização estrutural durante o processo de maturação das espermátides de *C. capitata*, e estas transformações tem semelhança com o observado por Yasuzumi e colaboradores (98) em espermátides de *Acrida lata*. Estes autores propuseram que tais modificações seriam decorrentes de um possível papel nutritivo exercido pelo material constituinte do adjunto do centríolo junto ao axonema, durante o desenvolvimento deste último.

A função do adjunto do centríolo, no entanto, não é bastante clara. Muitos autores tem apresentado diferentes proposições para o papel desempenhado por esta estrutura que no espermatozóide dos insetos acha-se localizada em posição correspondente à peça intermediária dos espermatozóides dos mamíferos. Gatenby (30) e Gatenby e Tahmisian (31) são favoráveis a uma função de ancoragem para o adjunto do centríolo, no sentido de fixar o flagelo ao núcleo do espermatozóide. Opinião esta partilhada por Breland e

colaboradores (20) e Fawcett e Phillips (26). Já Baccetti (3) acredita que se o segmento inicial do axonema dos espermatozoides dos insetos encontra-se alojado dentro do adjunto do centríolo e, sendo este segmento aparentemente o responsável pelo início do movimento do filamento axial (8), uma função mecânica para o adjunto do centríolo seja a mais provável.

Nós somos favoráveis à hipótese de Schrankel e Schwalm (70) quanto a origem do adjunto do centríolo nos espermatozoides dos insetos. Já a função mecânica postulada para esta estrutura por alguns autores (3; 20; 26; 30; 31) não nos parece ser a mais correta, uma vez que, apesar do adjunto do centríolo ser uma estrutura aparentemente comum às espermátides dos insetos, não é uma constante nos espermatozoides destes animais (60). Resta no entanto a possibilidade de que a função mecânica seja exercida pela estrutura em questão somente nas fases iniciais da espermiogênese.

O COMPLEXO MULTIVESICULAR

Uma estrutura multivesicular, não documentada anteriormente nas numerosas publicações existentes sobre a espermiogênese nos insetos, foi por nós observada no citoplasma de espermátides jovens de *Ceratitis capitata*. Perrotti (57) menciona a presença de estrutura semelhante no citoplasma do gameta feminino de *Drosophila* momentos após

a fertilização do mesmo. Tal estrutura, da qual também não se dispunha de relatos anteriores, aparece associada aos derivados mitocondriais após dissociação dos elementos que compõem a cauda do espermatozóide quando os derivados tornam-se livres de sua membrana limitante. Perotti (57) sugere que o complexo multivesicular possa conter agentes líticos, uma vez que à fusão do mesmo com o derivado mitocondrial segue-se o desarranjo e a desagregação gradual dos componentes e a fragmentação final da estrutura. Nós somos conduzidos a supor que o complexo multivesicular por nós relatado nas espermátides jovens de *C. capitata* também possa ser um reservatório de agentes líticos, uma vez que o mesmo só foi observado em espermátides jovens, em fase que precede às extensas modificações citoplasmáticas sofridas por estas células. Tal estrutura poderia conter os agentes necessários aos processos de segregação do citoplasma e individualização das células espermáticas.

O AXONEMA

A - O CORPÚSCULO BASAL

Para Phillips (60) o corpúsculo basal do axonema das espermátides maduras de algumas espécies de insetos carece da organização típica de microtúbulos triplos. Isto deve-se, segundo este autor, à falta da placa basal que na maioria dos cílios e flagelos separa o corpúsculo basal do

axonema móvel. Observações em *Drosophila* (45), *Sarcophaga* (92), *Bacillus* (8) e em *Ceratitidis* mostram que a região mais inicial do axonema de espermátides em desenvolvimento retém o grupamento normal de microtúbulos triplos. Da mesma forma que em espermátides maduras de *Drosophila* (56), *Sarcophaga* (92) e *Bacillus* (8), em *C. capitata* o par central de microtúbulos parece estender-se ao longo de todo o corpúsculo basal. Tal arranjo estrutural é atribuído, também, por Warner (92) à ausência da placa basal.

B - A FORMAÇÃO DO AXONEMA

No axonema dos espermatozoides de *C. capitata* o padrão de organização dos microtúbulos corresponde ao arranjo clássico de dois microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios, observado para a grande maioria dos espermatozoides dos insetos (3; 71). A sequência temporal de formação do axonema neste inseto não difere daquela relatada em numerosos estudos anteriores referentes à célula germinativa masculina de diferentes espécies de insetos (3; 45; 56; 60; 71; 77; 78; 87; 92).

O axonema na extremidade de crescimento da cauda, em espermátides jovens de *C. capitata*, a níveis nos quais os derivados mitocondriais ainda não se lhe associaram, apresenta-se com a estrutura básica de dois microtúbulos centrais mais as nove duplas de microtúbulos periféricos. Esta observação encontra correspondência nos relatos de

Tokuyasu (86), o qual descreve também o aparecimento de uma membrana que envolve o axonema assim constituído quando da associação do mesmo com os derivados mitocondriais em formação. Ainda segundo o mesmo autor esta membrana teria por finalidade manter a integridade do axonema em formação e só desapareceria durante o processo de individualização das espermátides. Fenômenos correlatos a estes foram por nós observados durante a espermiogênese em *C. capitata*.

Stanley e colaboradores (77), postulam que a estrutura básica do axonema desenvolve-se como uma unidade, enquanto que as estruturas acessórias (fibras acessórias, fibras densas, etc.) teriam um gradiente de desenvolvimento, e que possivelmente o axonema básico e suas estruturas acessórias desenvolvem-se segundo dois eixos distintos, o primeiro extendendo seu comprimento como uma unidade no eixo próximo-distal e o último desenvolvendo-se ao longo de um eixo transversal. Nossas observações em *C. capitata*, as observações de Tokuyasu (86), as observações de Szöllösi (78), referentes à formação das fibras ou microtúbulos acessórios e aparecimento do material electrónico e fibras electrónicas parecem confirmar a hipótese de Stanley e colaboradores (77).

Conforme relato de Tokuyasu (86), no período que precede a individualização das espermátides, pode-se observar que o espaço entre a membrana que envolve o axonema e a membrana externa dos derivados mitocondriais apresenta-se mais electrónico do que a matriz citoplasmática ge-

ral. Relata também que tal material ou materiais eléctron-densos possam ser responsáveis pela associação observada entre a membrana que envolve o axonema e os derivados mitocondriais. Dolder (observações pessoais) trabalhando com *Triatoma infestans* (Hemiptera) também detectou ligações densas entre o axonema e os derivados mitocondriais, em fragmentos da cauda de espermatozóides, deste inseto, submetidos a fragmentação ultra-sônica e contrastados negativamente em PTA. Ligações eléctron-densas, entre o axonema e os derivados mitocondriais, as quais sugerimos serem análogas às documentadas por Tokuyasu (86) em *Drosophila melanogaster* e por Dolder em *Triatoma infestans*, são observadas em espermátides de *C. capitata* tanto no período que antecede como no que procede à individualização destas células. Compartilhando das proposições dos autores supra citados acreditamos que as ligações eléctron-densas, por nós observadas nas espermátides de *C. capitata*, possam estar relacionadas com a manutenção da associação entre o axonema e os derivados mitocondriais nestas células.

OS DERIVADOS MITOCONDRIAIS

A formação do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial, sua divisão em duas partes iguais, sua transformação em dois longos e densos derivados em *C. capitata* são similares ao processo encontrado em outros insetos e previamente descrito e sumarizado em extensas revisões, de diversos autores, por Baccetti (3) e Phillips (60). No

início do processo de reorganização das mitocôndrias o perfil típico desta organela, com a membrana dupla e suas cristas internas, ainda pode ser observado. Massas de citoplasma adentram os derivados mitocondriais à medida em que estes se alongam. Em *C. capitata* e *Dacus oleae* Gmel (4; 12) (Diptera-Tephritidae), à semelhança de outras famílias de dípteros como Culicidae, Simuliidae (60) e Sarcophagidae (92), os derivados mitocondriais observados no espermatozóide são dois e aparentemente de dimensões idênticas. Em outras famílias da mesma ordem, tais como Drosophilidae, Syrphidae, Sepsidae e Muscidae (60), os derivados mitocondriais encontrados no espermatozóide são também em número de dois, porém de dimensões diferentes. Somente um derivado pode também ser encontrado no espermatozóide dos dípteros, como nas famílias Psychodidae (9), Sciaridae, Mycetophilidae e Ptychopteridae (60). Neste caso as mitocôndrias, na espermátide jovem, fundem-se formando o "Nebenkern" ou complexo mitocondrial que não se separa posteriormente e evolui diretamente para um só derivado mitocondrial.

Dois importantes fenômenos ocorrem durante o processo de reorganização e diferenciação pelo qual passam os derivados mitocondriais dos espermatozóides dos insetos, as cristas mitocondriais se orientam transversalmente formando uma série de pequenas lamelas regularmente espaçadas e orientadas perpendicularmente ao grande eixo do derivado, e dentro da matriz mitocondrial surgem massas de material em bastonetes regulares e em arranjo paracristalino (3; 60). O material em arranjo paracristalino é de natu-

reza protéica (10) e sua organização tridimensional além de ser constante para espécies de diferentes ordens (3; 68) apresenta vários níveis de complexidade. Em *C. capitata* o componente em arranjo paracristalino do derivado mitocondrial atinge o máximo de complexidade estrutural e corresponde ao elaborado padrão também já documentado em outras espécies de dípteros (50; 51; 56; 59; 92). No espermatozóide de *C. capitata* nenhuma crista é observada e o material em arranjo paracristalino preenche totalmente os derivados mitocondriais, dados estes que confirmam observações anteriores sobre este mesmo inseto (3; 68). As séries de linhas paralelas de material obliquamente orientadas segundo o longo eixo dos derivados mitocondriais apresentam nos espermatozóides de *C. capitata* uma periodicidade de cerca de 260 Å. Periodicidade semelhante foi observada por Meyer (50), Perotti (56) e Warner (92) em espermatozóides de *Drosophila melanogaster* (50, 56), de *D. hydei* (50) e de *Sarcophaga bullata* (92). Tais dados sugerem que tal periodicidade possa ser uma característica do material em arranjo paracristalino dos derivados mitocondriais dos espermatozóides dos dípteros. Segundo Baccetti e colaboradores (7) tal material não surge espontaneamente dentro dos derivados mitocondriais. Estes autores relatam que nas últimas fases da espermiogênese, cisternas do complexo de Golgi entram em contacto com a parede dos derivados mitocondriais, daí se iniciando o aparecimento gradual de deposição de material regularmente arranjado, no interior dos derivados. Em *C. capitata* o material em arranjo paracristalino surge no interior dos deri-

vados mitocondriais de espermátides em alongamento, e procede o envolvimento dos derivados e axonema, em formação, por extensas membranas lisas.

Num estudo comparativo de derivados mitocondriais de espermatozóides de diferentes espécies de insetos, Rosati, Selmi e Mazzini (68) trabalharam com espermatozóides de *C. capitata*. Segundo estes autores os derivados mitocondriais dos espermatozóides de *C. capitata* seriam desprovidos de membrana limitante. Nossas observações do espermatozóide do mesmo inseto contrariam estas observações e estão de acordo com as observações de Perotti (57) de derivados mitocondriais dos espermatozóides de *Drosophila*. Supomos que os resultados obtidos por Rosati, Selmi e Mazzini (68) devam-se a artefatos de técnica. Os derivados mitocondriais dos espermatozóides de *C. capitata* tem o mesmo padrão de cristalização dos derivados mitocondriais dos espermatozóides de *Drosophila*, e à semelhança dos segundos (57) apresentam-se limitados por membrana lisa e dupla.

Diversas funções tem sido descritas para o material protéico em arranjo paracristalino que se deposita no interior dos derivados mitocondriais das células espermáticas dos insetos durante o seu processo de maturação. Esta deposição seria resultante da reorganização das proteínas das cristas mitocondriais, segundo Bairati e Perotti (13). André (2) atribui um papel enzimático para tal material. Meyer (50) e subsequentemente Phillips (62) propuseram um papel mecânico para este mesmo material. Perotti (57)

acredita que após a fertilização o material em arranjo paracristalino no interior dos derivados mitocondriais da cauda dos espermatozoides dos insetos constitua uma reserva protéica a ser utilizada pelo embrião. Já para Tokuyasu (83) a forma e a natureza dos derivados mitocondriais das caudas dos espermatozoides dos insetos estariam relacionados com o padrão de movimento da cauda dos mesmos, teoria esta partilhada por Rosati, Selmi e Mazzini (68). Certamente Tokuyasu (83) e Rosati, Selmi e Mazzini (68) tem razão em suas afirmações, todavia não podemos deixar de lado a hipótese de Perotti (56) a qual nos parece plenamente viável no que concerne à fertilização dos ovos dos insetos.

A MEMBRANA PLASMÁTICA

Segundo Baccetti (3), Phillips (60) e Yasuzumi (96) na literatura da morfologia ultra-estrutural dos espermatozoides, um grande número de publicações sugere a presença de uma membrana plasmática assimétrica. Refere-se também que a maioria destas células encontra-se envolvida por uma camada de polissacarídeos a qual foi denominada de glicocálice por Bennett (15). A membrana plasmática que envolve os gametas masculinos dos insetos apresenta-se particularmente assimétrica e conforme a descrição de Baccetti, Bigliardi e Rosati (6) constitui-se de uma membrana trilaminar ou de uma unidade de membrana típica recoberta por glicoproteínas, e que pode ocorrer em três

padrões estruturais diferentes. Segundo estes autores, tais padrões exibem uma complexidade estrutural progressiva sendo o mais simples deles o característico dos espermatozoides das moscas das frutas (*Ceratitis* e *Drosophila*). A membrana plasmática dos espermatozoides dos referidos insetos apresenta um recobrimento fino e aparentemente amorfo. Em nossas investigações sobre a espermiogênese em *Ceratitis capitata* pudemos constatar que o padrão estrutural apresentado pela membrana plasmática das células espermáticas deste inseto nas diversas etapas de sua maturação corresponde sempre àquele descrito como característico dos espermatozoides das moscas das frutas (6; 56).

O ESPERMATOZÓIDE NA ESPERMATECA

As modificações ultra-estruturais sofridas pela célula espermática no trato genital feminino encontram-se descritas somente para algumas espécies de insetos. O estudo dos espermatozoides nas espermatecas é particularmente dificultado pela presença, nestas, da cutícula. Segundo Makielski (47) a cutícula representa uma barreira para a fixação e penetração dos meios de embebição. O autor supra citado relata que preservações satisfatórias do material só foram obtidas de espermatecas fixadas horas após a inseminação, quando os espermatozoides anteriormente distribuídos ao acaso no interior da espermateca, agrupam-se junto à cutícula. Intercorrências semelhantes às relata-

das por Makielski (47), também surgiram por ocasião da manipulação das espermatecas de *C. capitata*. Perotti (57) deparou-se com o mesmo tipo de dificuldades ao trabalhar com espermatozoides de *Drosophila* quando estes se encontravam no trato genital feminino.

As publicações referentes às modificações ultra-estruturais sofridas pelos espermatozoides dos insetos estocados nas espermatecas das fêmeas, relatam que em Orthoptera (64) e em Lepidoptera (65; 66; 67) estas mudanças ocorrem principalmente ao nível da membrana plasmática das células em questão. De acordo com Renieri e Talburi (64) as alterações ultra-estruturais observadas relacionam-se com o preparo para a fertilização e seriam análogas ao processo de capacitação dos espermatozoides dos mamíferos. Outros estudos relatam alterações ultra-estruturais nos derivados mitocondriais, no axonema (47; 59) e no acrosoma (36) de espermatozoides contidos em espermatecas das fêmeas de diferentes espécies de insetos. Nossas observações sobre espermatozoides de *C. capitata* contidos nas espermatecas, espécimes corados positiva e/ou negativamente, aparentemente não apontaram a ocorrência de nenhuma alteração na ultra-estrutura dos mesmos, em relação à morfologia apresentada pelos espermatozoides deste inseto quando no trato genital masculino. Perotti (56) também não detectou alterações ultra-estruturais nos espermatozoides de *Drosophila melanogaster* por ocasião da estocagem dos mesmos no trato genital feminino, nem mesmo a nível da membrana plasmática.

VARIAÇÕES METODOLÓGICAS

VARIAÇÃO C - DESIDRATAÇÃO EM ETANOL 95% CONTENDO 2% DE PTA

De acordo com vários autores, o PTA dissolvido em solventes orgânicos reage preferencialmente com proteínas ricas em amino ácidos básicos (18; 55; 63; 72). O fato dos núcleos dos espermatozoides de *Ceratitidis capitata* não apresentarem densidade eletrônica quando submetidos a desidratação em etanol contendo PTA sem prévia pós-fixação em tetróxido de ósmio e sem contrastação por uranila e chumbo não pode, portanto, ser elucidado pelo mecanismo de reação supra citado. Sabe-se que durante a espermiogênese a cromatina desenvolve uma estrutura e uma composição de proteínas não usuais (38). Os primeiros estudos neste campo estabeleceram que os núcleos dos espermatozoides de algumas espécies de animais perdem completamente as proteínas histônicas, as quais são substituídas por protaminas. Estudos mais recentes mostram que muitas proteínas básicas não usuais, algumas delas protaminas e outras histonas, podem aparecer durante a diferenciação de um espermatozoide. McMaster-Kaye e Kaye (48) mostram que as fibras cromatínicas de espermátides finais de *Acheta domesticus* (Orthoptera) perdem a estrutura nucleossomal e que a compactação apresentada pelo material nuclear não pode ser devida a agregação de fibras do tipo somático. Tal dado nos levou a pensar que esta nova estrutura da fibra cromatínica poderia comprometer os resíduos dos aminoácidos bá-

sicos, aos quais o EPTA ligar-se-ia preferencialmente. Um modelo para a estrutura da cromatina no núcleo dos espermatozoides, com interações específicas entre as argininas na protamina, foi recentemente descrito por Balhorn (14) para os mamíferos. Este modelo da fibra cromatínica, em que os resíduos dos aminoácidos básicos encontram-se comprometidos, poderia explicar o fato dos núcleos dos espermatozoides de *C. capitata* apresentarem-se elétron-lúcidos quando submetidos ao tratamento por EPTA. Reforçando esta hipótese temos os núcleos de espermátides em alongamento e em processo de compactação do material cromatínico que se apresentam elétron-lúcidos nas regiões em que a fibra cromatínica já se encontra bastante compactada, e elétron-densos nas regiões em que o material ainda retém sua estrutura fibrilar. Tal dado pode ser verificado quando da contrastação deste mesmo material, por uranila e chumbo e de sua reobservação ao microscópio eletrônico. Também corroborando os dados acima temos os núcleos das células da parede dos cistos, de material submetido ao tratamento por EPTA e não contrastado com uranila e chumbo. Nestes o material cromatínico apresenta o padrão de densidade eletrônica normalmente observado para as células somáticas submetidas ao tratamento convencional de fixação, pós-fixação e desidratação. Também a contrastação destas células com uranila e chumbo não oferece outras diferenças significativas que não um pequeno aumento geral na densidade eletrônica que apresentam.

No axonema dos espermatozoides de *C. capitata* submetidos à desidratação por EPTA sem prévia pós-fixação por

tetróxido de ósmio, tendo ou não sido submetido à contra-
tação por uranila e chumbo, a luz dos microtúbulos cen-
trais e das fibras periféricas apresenta-se sempre eléc-
tron-lúcida. Observamos, ainda, que por este método de
preparação as duplas periféricas de microtúbulos do axone-
ma no nosso espécime de estudo aparentemente não são pre-
servadas.

Gordon e Bensch (32), também, relatam que em esper-
matozoides de cobaia tratados por glutaraldeído e EPTA, sem
pós-fixação por tetróxido de ósmio e não contrastados por
uranila e chumbo, as duplas periféricas de microtúbulos do
axonema aparentemente não são preservadas. Quando estes
mesmos autores tratam os espermatozoides de cobaia com te-
tróxido de ósmio antes do EPTA, as duplas periféricas são
preservadas. Gordon e Bensch (32) concluíram que estes
seus dados corroboram evidências anteriores de que os mi-
crotúbulos centrais e as duplas periféricas de microtúbu-
los do axonema diferem tanto em propriedades químicas como
em componentes estruturais. Nossas observações nos esper-
matozoides de *C. capitata* parecem estar em consonância com
conclusões dos autores supra citados.

Em *Ceratitis capitata* os microtúbulos centrais e
as fibras acessórias, do axonema, apresentam conteúdo
elétron-denso e um bastonete central de alta densidade
eletrônica, quando submetidos à fixação por glutaraldeído
seguida por tetróxido de ósmio. O tratamento por gluta-
raldeído e EPTA, como já referido preserva os microtúbu-
los centrais e as fibras acessórias do axonema do

espermatozóide de *C. capitata*, mas aparentemente não preserva seu conteúdo eléctron-denso e nem o bastonete central. A alteração de imagem dos referidos túbulos cuja luz ora mostra-se eléctron-densa e ora eléctron-lúcida, na dependência do processo de fixação empregado, sugere uma possível semelhança bioquímica entre o conteúdo dos mesmos. Já a preservação de ambos, microtúbulos centrais e fibras acessórias, independentemente do processo de fixação empregado leva-nos a supor terem estes os mesmos componentes estruturais. Semelhanças bioquímicas entre o conteúdo eléctron-denso do par central de microtúbulos e das nove fibras acessórias no espermatozóide de *C. capitata* já foram determinadas, em estudo anterior, por Bigliardi e colaboradores (16).

O bastonete, como o por nós observado, no centro dos microtúbulos centrais e no centro das fibras acessórias no axonema dos espermatozóides de *C. capitata*, é considerado por Phillips (62) um túbulo simples, e constituiu-se segundo este mesmo autor numa característica dos espermatozóides de dípteros altamente evoluídos. Shay e colaboradores (71), também, relataram em espermatozóides de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) a presença de um túbulo simples no centro das fibras acessórias. Os referidos autores demonstraram ser este túbulo correspondente estruturalmente à uma das subunidades das que formam as fibras acessórias do axonema. Supomos, no entanto, que o bastonete encontrado no centro dos microtúbulos centrais e no centro das fibras acessórias do axonema dos espermatozóides de *C. capitata* e de outros dípteros, não correspon

de à uma das subunidades das referidas por Shay e colaboradores (71). Parece-nos que se tal bastonete correspondesse à uma das subunidades que formam os referidos microtúbulos, teria sido preservado juntamente a estes quando do tratamento por glutaraldeído e EPTA, sem prévia pós-fixação por tetróxido de ósmio. Fato que como já vimos não ocorre no axonema dos espermatozoides de *C. capitata*.

Os derivados mitocondriais das células espermáticas de *C. capitata* submetidas ao tratamento por glutaraldeído seguido por EPTA, sem pós-fixação por tetróxido de ósmio, não apresentam diferenças significativas quando da contrastação ou não por uranila e chumbo. As diferenças de densidade eletrônica observadas nestas estruturas na dependência da fase do desenvolvimento das espermátides devem-se, talvez, a artefatos de técnica. Seria necessário, no entanto, que tivéssemos estudado mais detalhadamente e empregado outras diferentes técnicas (de fixação e citoquímicas) no preparo do material em questão, para que pudessemos chegar a uma resposta mais conclusiva com respeito ao fato observado.

RESUMO

Espermátides em diferentes fases de maturação e espermatozóide de *Ceratitis capitata*, provenientes dos testículos dos machos ou das espermatecas das fêmeas deste inseto, foram preparados segundo as técnicas usuais em microscopia eletrônica, contrastada positiva e negativamente e observados em microscópio eletrônico de transmissão. Algumas variações técnicas como a estocagem do material, sem prévia fixação, por 7 a 15 dias, a 10°C, em glutaraldeído a 0,25%; fixação em glutaraldeído a 3% adicionado de 2% de ácido tânico; pós-fixação em mistura de tetróxido de ósmio adicionado de 0,05M de ferricianeto de potássio ou de 0,5% de ácido tânico; desidratação em etanol 95% contendo 2% de ácido fosfotúngstico (EPTA) sem e com contrastação por uranila e chumbo, também foram empregadas no preparo dos espécimes em estudo.

As observações da espermiogênese em *C. capitata* mostraram que esta, como nos insetos em geral, caracteriza-se pela formação do "Nebenkern" ou complexo mitocondrial, formação do flagelo, alongamento celular, condensação do material nuclear e eliminação do citoplasma. As espermátides em fase inicial de diferenciação apresentam núcleo e cromatina com aspecto similar ao das células somáticas e grande quantidade de mitocôndrias no citoplasma. Estas mitocôndrias fundem-se, a seguir, formando o "Nebenkern". O axonema do flagelo de *C. capitata* origina-se do

único centríolo observado na espermatíde e constitui-se inicialmente do arranjo clássico de dois microtúbulos centrais e nove duplas de microtúbulos periféricos aos quais se somam, posteriormente, nove microtúbulos ou fibras acessórias, fibras e materiais electrónico-densos. O "Nebenkern" divide-se em duas massas iguais que se dispõem uma de cada lado do axonema e transformam-se nos derivados mitocondriais. O núcleo das espermatídes de *C. capitata*, inicialmente ovóide ou esferóide, alonga-se. O núcleo em alongamento apresenta concavidades laterais, membranas adjacentes e cromatina em compactação disposta em grumos e filamentos. Numerosos microtúbulos, longitudinalmente orientados no citoplasma, são encontrados ao redor do núcleo e ao redor dos derivados mitocondriais das espermatídes. Justaposto à extremidade caudal do núcleo, envolvendo o corpúsculo basal do axonema, em espermatídes jovens de *C. capitata*, observa-se o adjunto do centríolo, uma estrutura volumosa, de aspecto granular e com áreas electrónico-lúcidas. Os derivados mitocondriais que ladeiam o axonema são gradualmente preenchidos por material electrónico em arranjo paracristalino. As espermatídes de *C. capitata* durante o processo de diferenciação aparecem fundidas a certos níveis da região da cauda formando um extenso sincício, separando-se novamente nas últimas fases da espermiogênese. Durante o processo de maturação das células espermatícas as membranas adjacentes, os microtúbulos citoplasmáticos e grande parte do citoplasma celular são eliminados.

Os espermatozoides de *Ceratitis capitata* apresentam acrosoma lateralmente colocado em relação ao núcleo e preenchido por material regularmente arranjado; núcleo alongado com material cromatínico extremamente compactado; adjunto do centríolo compacto, de pequena dimensão, situado entre os derivados mitocondriais, na região inicial da cauda; axonema com 9 + 9 + 2 microtúbulos e fibras e materiais electrón-densos; derivados mitocondriais totalmente preenchidos pelo material electrón-denso em arranjo paracrystalino, ladeando o axonema e extendendo-se ao longo de toda a cauda; extremidade final da cauda formada somente por elementos do axonema.

Espermatozoides de *Ceratitis capitata* tratados por EPTA e não contrastados por uranila e chumbo apresentam núcleo electrón-lúcido. Os mesmos espécimes quando contrastados com uranila e chumbo apresentam núcleo electrón-denso. A estrutura da cromatina, específica da espermiogênese parece estar associada a esta ausência de resposta do material nuclear ao EPTA.

SUMMARY

Spermatids in various stages of maturation and spermatozoa of *Ceratitidis capitata*, were obtained from the testis of males and the spermathecae of females. Routinely prepared for transmission electron microscopy, they were positively and negatively stained. A few variations of the basic techniques were also employed, namely:

Maintaining spermatozoa without previous fixation in a solution of 0,25% glutaraldehyde for 7 to 14 days, at 10°C; fixation in 3% glutaraldehyde to which 2% tannic acid was added; post-fixation in a mixture of 1% osmium tetroxide to which either 0,05M potassium ferricyanide or 0,5% tannic acid was added; dehydration in 95% ethanol, containing 2% phosphotungstic acid (EPTA), with or without staining of the sections.

The observations on the spermatogenesis of *C. capitata* are quite similar to the description of this process for insects in general. It may be defined by the following steps: Formation of the "Nebenkern", development of the flagellum, cellular elongation, nuclear condensation, and elimination of the excess cytoplasm. Spermatids initiating their differentiation have a nucleus and chromatin very similar to somatic cells, as well as a large number of mitochondria dispersed in the cytoplasm. In the next step, these mitochondria fuse to form the "Nebenkern". The flagellum originates from the single centriole observed in spermatids.

Initially consisting of a typical arrangement of two central microtubules surrounded by nine doublet microtubules, the axoneme later acquires nine accessory microtubules or fibers, and interconnecting electron-dense fibers and deposits. The "Nebenkern" divides into two equal masses which are located on either side of the axoneme, and are eventually transformed into two mitochondrial derivatives. The nucleus of the spermatids, initially ovoid or spheroid, is progressively elongated. Accompanying this elongation, lateral canals indent the length of the nucleus, lined by adjacent membranes, while the chromatin is rearranged in clumps and filaments. Numerous microtubules, longitudinally directed in the cytoplasm, are found encircling the nucleus and the mitochondrial derivatives. The centriole adjunct may be observed pressed against the extremity of the nucleus and enfolding the centriole. In the young spermatid, it is voluminous with a granular texture and penetrated by electron-lucent areas. The mitochondrial derivatives are gradually filled with electron dense-material which obeys a paracrystalline arrangement. The spermatids fuse their cytoplasm in the caudal region at a certain stage of their development, forming a large sincicium. They separate again in the last stages of their development. During maturation the spermatids shed various elements, such as the adjacent membranes, the cytoplasmic microtubules and the greater part of their cytoplasm.

The spermatozoa of *Ceratitis capitata* have an acrossome laterally located in relation to the nucleus, containing regularly arranged, electron-dense material. The nucleus is extremely elongated, with very densely packed chromatin. The

centriolar adjunct is compact and found between the mitochondrial derivatives at the insertion of the tail. The axoneme has attained the 9 + 9 + 2 microtubule arrangement, interconnected by electron-dense fibers and deposits. It is accompanied laterally by the mitochondrial derivatives, completely filled by electron-dense material in a paracrystalline arrangement and extending almost to the tip of the sperm tail. At the tip of the flagellum, only the axonemal elements remain.

Spermatozoa of *Ceratitidis capitata* dehydrated with EPTA and observed without staining have electron-lucent nuclei, while the nuclei of the same sections, after staining with uranyl acetate and lead citrate, appear very electron-dense. The lack of nuclear staining with EPTA has been related to the chromatin structure which is peculiar to spermatozoa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ANDERSON, W.A. Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster*: the effect of elevated temperature on spermiogenesis. *Molec. Gen. Genet.*, 99:257-73, 1967.
02. ANDRÉ, J. Contribution à la connaissance du condriome; étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastruct. Res.*, 6 (Suppl 3):1-185, 1962.
03. BACCETTI, B. Insect sperm cells. *Adv. Insect. Physiol.*, 9:315-97, 1972.
04. BACCETTI, B. & BAIRATI Jr., A. Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in *Dacus oleae* Gmel. ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera). *Redia*, 49:1-29, 1964.
05. BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E.; BURRINI, A.G. & ROSATI, F. Histochemical observations on the insect sperm cell by electron microscope. *J. Ultrastruct. Res.*, 37:248-9, 1971.
06. BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E. & ROSATI, F. The spermatozoon of arthropoda; XIII the cell surface. *J. Ultrastruct. Res.*, 35:582-605, 1971.
07. BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R.; GIUSTI, F.; MAZZINI, M.; RENIERI, T.; ROSATI, F. & SELMI, G. The spermatozoon

- of Arthropoda; XX structure and function in the spermatozoon of *Tenebrio molitor*. *J. Mechanochem. Cell Motil.*, 2:149-61, 1973.
08. BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; PERITI, P.; PIANTELLI, F.; ROSATI, E. & SELMI, G. Structure and function in the spermatozoon of *Bacillus rossius*. *J. Ultrastruct. Res.*, 44 (Suppl 12):1-73, 1973.
09. BACCETTI, B.; DALLAI, R. & BURRINI, A.G. The spermatozoon of Arthropoda; XVIII the non-motile bifurcated sperm of Psychodidae flies. *J. Cell Sci.*, 12:287-311, 1973.
10. BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F. & AFZELIUS, B.A. Protein of insect sperm mitochondrial crystals; crystallomitin. *J. Cell Biol.*, 73:594-600, 1977.
11. BAIRATI, A. Struttura ed ultrastruttura dell'apparato genitale maschile di *Drosophila melanogaster* Mieg; I? il testicolo. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 76:56-99, 1967.
12. BAIRATI Jr., A. & BACCETTI, B. Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in *Dacus oleae* Gmel. ed in *Drosophila melanogaster* Meig (Ins. Diptera); II nuovi reperti ultrastrutturali sul filamento assile degli spermatozoi. *Redia*, 49:81-5, 1964.
13. BAIRATI, A. & PEROTTI, E. Some comparative considerations on the *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: BACCETTI, B., ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia

Nazionale dei Lincei, 1970. p. 333-345.

14. BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 93(3):298-305, 1982.
15. BENNETT, H.S. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, 11(1):14-23, 1963.
16. BIBLIARDI, E.; BACCETTI, B.; BURRINI, G. & PALLINI, V. The spermatozoon of Arthropoda. XII. The distribution of some enzymes in the insect sperm tail. In: BACCETTI, B., ed. Comparative spermatology. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 451-464.
17. BLOOM, F.E. & AGHAJANIAN, G.K. Cytochemistry of synapses; selective staining for electron microscopy. *Science*, 154:1575-7, 1966.
18. BLOOM, F.E. & AGHAJANIAN, G.K. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruct. Res.*, 22:361-75, 1968.
19. BRELAND, O.P.; EDDLEMAN, C.D. & BIESELE, J.J. Studies of insect spermatozoa; I. *Ent. News*, 79(8):197-216, 1968.
20. BRELAND, O.P.; GASSNER, G.; RIESS, R.W. & BIESELE, J.J. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. *Can. J. Genet. Cytol.*, 8:759-73, 1966.

21. BRICK, D.; LIFSCHITZ, E. & FRIEDLÄNDER, M. Mitochondria differentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: an ultrastructural analysis in the male sterile mutant ms(1)413. *J. Ultrastruct. Res.*, 66:151-63, 1979.
22. COOPER, K.W. Normal spermatogenesis in *Drosophila*. In: DEMEREC, M., ed. *Biology of Drosophila*. New York, Wiley, 1950. p. 1-16. Apud FOWLER, G.L. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage, and sperm utilization. *Adv. Genet.*, 17: 293-360, 1973.
23. CRUZ-LANDIM, C. da. Nota sobre a formação de membranas durante a espermatogênese de *Conocephalus saltator* (Saussure) (Orthoptera, Conocephalidae). *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 32(4):479-83, 1980.
24. FAWCETT, D.W.; ANDERSON, W.A. & PHILLIPS, D.M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Devl. Biol.*, 26:220-51, 1971.
25. FAWCETT, D.W.; ITO, S. & SLAUTTERBACK, D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 5(3):453-60, 1959.
26. FAWCETT, D.W. & PHILLIPS, D.M. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat. Rec.*, 165:153-64, 1969.

27. FONZO, S. & ESPONDA, P. The relationship between microtubules and chromatin in spermatids of Acrididae. *Protoplasma*, 85: 193-7, 1975.
28. FRANKE, W.W. & SCHEER, U. Structures and functions of the nuclear envelope. In: BUSCH, H., ed. *The cell nucleus*. New York, Academic, 1974. v.1, cap. 5, p. 219-347.
29. GASSNER III, G.; CHILDRESS, D. & KLEMETSON, D.J. Spermiogenesis in boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Insect. Morph. Embryol.*, 4(2): 115-25, 1975.
30. GATENBY, J.B. XXV: The electron microscopy of centriole, flagellum and cilium. *J. R. Microsc. Soc.*, 79(4): 299-317, 1961.
31. GATENBY, J.B. & TAHMISIAN, T.N. Centriole adjunct, centrioles, mitochondria, and ergastoplasm in orthopteran spermatogenesis; an electron microscope study. *Cellule*, 60:103-34, 1959.
32. GORDON, M. & BENSCH, K.G. Cytochemical differentiation of the guinea pig sperm flagellum with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruct. Res.*, 24:33-50, 1968.
33. HABLITON, D.L.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: the effect of abnormal association of centrosome and

- nucleus in mutant ms(1)6S¹. *J. Ultrastruct. Res.*, 60:221-34, 1977.
34. HASCHEMEYER, R.H. & MYERS, R.J. Negative staining. In: HAYAT, M.A., ed. *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications.* New York, Van Nostrand Reinhold, 1972. v.2, cap. 3, p. 101-147.
35. HESS, O. & MEYER, G.F. Genetic activities of the γ chromosome in *Drosophila* during spermatogenesis. *Adv. Genet.*, 14:171-223, 1968.
36. HUGHES, M. & DAVEY, K.G. The activity of spermatozoa of *Periplaneta*. *J. Insect. Physiol.*, 15:1607-16, 1969.
37. KAYE, J.S. Acrosome formation in the house cricket. *J. Cell Biol.*, 12:411-31, 1962.
38. KAYE, J.S. & McMASTER-KAYE, R. The fine structure and protein composition of developing spermatid nuclei. In: DUCKETT, J.G. and RACEY, P.A. eds. *The biology of the male gamete. Biol. J. Linnean Soc.*, 7(Suppl. 1):227-237, 1975. Apud McMASTER-KAYE, R. & KAYE, J.S. Acrosomal bands: specialized structures on the nuclear surface for holding the acrosomal granule. *J. Ultrastruct. Res.*, 71:233-48, 1980.
39. KESSEL, R.G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. *J. Ultrastruct. Res.*, 16:293-304, 1966.

40. KESSEL, R.G. An electron microscope study of spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of microtubular systems during differentiation. *J. Ultrastruct. Res.*, 18:677-94, 1967.
41. KESSEL, R.G. Spermiogenesis in the dragonfly with special reference to a consideration of the mechanisms involved in the development of cellular asymmetry. In: BACCETTI, B. ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 531-549.
42. KETTANEH, N.P. & HARTL, D.L. Histone transition during spermiogenesis is absent in segregation distorter males of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 193:1020-1, 1976.
43. KIEFER, B.I. Ultrastructural abnormalities in developing sperm of X/O *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 54: 1441-52, 1966.
44. KIEFER, B.I. Phenotypic effects of γ chromosome mutations in *Drosophila melanogaster*; I. spermiogenesis and sterility in KL-1⁻ males. *Genetics*, 61:157-66, 1969.
45. KIEFER, B.I. Development, organization, and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. *J. Cell Sci.*, 6: 177-94, 1970.
46. LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 9:409-15, 1961.

47. MAKIELSKI, S.K. The structure and maturation of the spermatozoa of *Sciara coprophila*. *J. Morph.*, 118: 11-42, 1966.
48. McMASTER-KAYE, R. & KAYE, J.S. Organization of chromatin during spermiogenesis: beaded fibers, partly beaded fibers, and loss of nucleosomal structure. *Chromosoma*, 77:41-56, 1980.
49. McMASTER-KAYE, R. & KAYE, J.S. Acrosomal bands: specialized structures on the nuclear surface for holding the acrosomal granule. *J. Ultrastruct. Res.*, 71:233-48, 1980.
50. MEYER, G.F. Die parakristallinen Körper in den spermienschwänzen von *Drosophila*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 62:762-84, 1964.
51. MEYER, G.F. Crystalline mitochondrial derivatives in sperm. *Proceedings of the 6th International Congress of Electron Microscopy, Kyoto*, 2:629, 1966. Apud. PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 44:181-98, 1973.
52. MEYER, G.F. Spermiogenese in normalen und γ -defizienten Männchen von *Drosophila melanogaster* und *D. hydei*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 84:141-75, 1968.
53. MIZUHIRA, V. & FUTAESAKU, Y. New fixation for biological membranes using tannic acids. *Acta Histochem. Cytochem.*,

5(4):233-6, 1972.

54. MOLLENHAUER, H.H. & DROLESKEY, R.E. Some specific staining reactions of potassium ferricyanide in cells of guinea pig testes. *J. Ultrastruct. Res.*, 72:385-91, 1980.
55. PALLADINI, G.; LAURO, G. & BASILE, A. Observations sur la spécificité de la coloration aux acides phosphotungstique et phosphomolybdique. *Histochemie*, 24:315-21, 1970.
56. PEROTTI, M.E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig.. *J. Submicr. Cytol.*, 1:171-96, 1969.
57. PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 44:181-98, 1973.
58. PHILLIPS, D.M. Observations on spermiogenesis in the fungus gnat *Sciara coprophila*. *J. Cell Biol.*, 30:477-98, 1966.
59. PHILLIPS, D.M. Fine structure of *Sciara coprophila* sperm. *J. Cell Biol.*, 30:499-517, 1966.
60. PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44:243-77, 1970.
61. PHILLIPS, D.M. Substructure of the mammalian acrosome. *J. Ultrastruct. Res.*, 38:591-604, 1972.

62. PHILLIPS, D.M. Structural variants in invertebrate sperm flagella and their relationship to motility. In: SLEIGH, M.A., ed. *Cilia and flagella*. New York, Academic, 1974. cap. 14, p.379-402.
63. RAMBOURG, A. Staining of intracellular glycoproteins. In: WISSE, E.; DAEMS, W. Th.; MOLENAAR, J. and DUYN, P. van, eds. *Electron microscopy and cytochemistry*. Amsterdam, North Holland and American Elsevier, 1973. p.245-247.
Apud DERKSEN, J. & WILLART, E. Cytochemical studies on RNP complexes produced by Puff 2-18 BC in *Drosophila hydei*; uranyl acetate and phosphotungstic acid staining. *Chromosoma*, 55(1):57-68, 1976.
64. RENIERI, R. & TALLURI, M.V. Sperm modification in the female ducts of a grasshopper. *Monitore zool. ital.*, 8:1-9, 1974.
65. RIEMAN, J.G. Metamorphosis of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* during passage from the testes to the female spermathecae. In: BACCETTI, B., ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p.321-331.
66. RIEMANN, J.G. & GASSNER III, G. Ultrastructure of Lepidopteran sperm within spermathecae. *Ann. ent. Soc. Am.*, 66:154-9, 1973.
67. RIEMANN, J.G. & THORSON, B.J. Sperm maturation in the male and female genital tracts of *Anagasta kuniella*

- (Lepidoptera: Pyralididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 1:1-19, 1971. Apud RENIERI, T. & TALLURI, M.V. Sperm modification in the female ducts of a grasshopper. *Monitore zoll. ital.*, 8:1-9, 1974.
68. ROSATI, F.; SELMI, G. & MAZZINI, M. Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *J. Submicr. Cytol.*, 8(1):51-67, 1976.
69. SABATINI, D.D.; BENSCH, K. & BARNETT, R.J. Cytochemistry and electron microscopy; the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17:19-58, 1963.
70. SCHRANKEL, K.R. & SCHWALM, F.E. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tiss. Res.*, 153:45-53, 1974.
71. SHAY, J.W.; DOBSON, W.J.; SIMMONS, E.E.; BIESELE, J.J. & BRELAND, O.P. Subunits of flagellar accessory tubules. *Tissue & Cell* 1(4):593-6, 1969.
72. SHERIDAN, W.F. & BARNETT, R.J. Cytochemical studies on chromosome ultrastructure. *J. Ultrastruct. Res.*, 27: 216-29, 1969.
73. SHOUP, J.R. Spermiogenesis in wild type and in a male sterility mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.*, 32:663-75, 1967.

74. SOUZA, H.M.L. de; PIEDRABUENA, A.E. & PAVAN, O.H.O. Biologia de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera-Tephritidae); um novo meio artificial de criação para produção em massa. *Papéis Avulsos Zool.*, S. Paulo, 31(14): 213-20, 1978.
75. STANLEY, H.P. The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchii). *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 75:453-68, 1966.
76. STANLEY, H.P. An electron microscope study of spermiogenesis in teleost fish *Oligocottus maculosus*. *J. Ultrastruct Res.*, 27:230-43, 1969.
77. STANLEY, H.P.; BOWMAN, J.T.; ROMRELL, L.J.; REED, S.C. & WILKINSON, R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, 41:433-66, 1972.
78. SZÖLLÖSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect-Orthoptera). *J. Ultrastruct. Res.*, 50:322-46, 1975.
79. TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. Fine-structural cytochemistry of the centriolar adjunct in grasshopper spermatids. *Mikroskopie (Wien)*, 36:35-42, 1980.
80. TATES, A.D. *Citodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster**. Thesis. Drukkerij J.H.

- Pasmans, 'S-Gravenhage, 1971. Apud STANLEY, H.P.; BOWMAN, J.T.; ROMRELL, L.J.; REED, S.C. & WILKINSON, R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.*, 41:433-66, 1972.
81. TERAKADO, K. Chromatin arrangement and axis formation in the spermiogenesis of a pulmonate snail. *Develop. Growth and Differ.*, 23(4):381-99, 1981.
82. TILNEY, L.G. The polymerization of actin; II how nonfilamentous actin becomes nonrandomly distributed in sperm: evidence for the association of this actin with membranes. *J. Cell Biol.*, 69:51-72, 1976.
83. TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; III relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Expl. Cell Res.*, 84:239-50, 1974.
84. TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; IV nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.*, 48:284-303, 1974.
85. TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; V head-tail alignment. *J. Ultrastruct. Res.*, 50:117-29, 1975.
86. TOKUYASU, K.T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; VI significance of "Onion" Nebenkern

- formation. *J. Ultrastruct. Res.*, 53:93-112, 1975.
87. TOKUYASU, K.T.; PEACOCK, W.J. & HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; I individualization process. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 124:479-506, 1972.
88. TOKUYASU, K.T.; PEACOCK, W.J. & HARDY, R.W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; II coiling process. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 127:492-525, 1972.
89. VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25:407-8, 1965.
90. VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 101:13-27, 1969.
91. WARNER, F.D. New observations on flagellar fine structure; the relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. *J. Cell Biol.*, 47(1):159-82, 1970.
92. WARNER, F.D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, 35:210-32, 1971.
93. WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron

- microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4(4):475-8, 1958.
94. WILKINSON, R.F.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: the effects of abnormal cytoplasmic microtubule populations in mutant ms(3)10R and its colcemid-induced phenocopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 48:242-58, 1974.
95. WILKINSON, R.F.; STANLEY, H.P. & BOWMAN, J.T. The effect of vinblastine on spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: evidence for two functional classes of cytoplasmic microtubules. *J. Ultrastruct. Res.*, 53: 354-65, 1975.
96. YASUZUMI, G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. *Int. Rev. Cytol.*, 37:53-120, 1974.
97. YASUZUMI, G.; FUJIMURA, W. & ISHIDA, H. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; V spermatid differentiation of *Drosophila* and grasshoper. *Expl. Cell Res.*, 14:258-85, 1958.
98. YASUZUMI, G.; SUGIOKA, T.; TSUBO, I.; YASUZUMI, F. & MATANO, Y. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XX relationship between chromatoid bodies and centriole adjunct in spermatids of grasshopper, *Acrida lata*. *Z. Zellforsch. mikorsk. Anat.*, 110:231-42, 1970.

VOLUME II

ILUSTRAÇÕES

ABREVIACOES UTILIZADAS NAS EXPLICACOES DAS FIGURAS

AC	- adjunto do centríolo	DM	- derivados mitocondriais
ACR	- acrosoma	DP	- dupla periférica
AX	- axonema	E	- extremidade da cauda
B	- bolhas de segregaco de material citoplasmático	EM	- espessamentos da membrana
BN	- bulbo nuclear	EN	- envoltório nuclear
C	- citoplasma	EPTA	- desidrataco em etanol contendo ácido fosfotúngstico
CA	- cauda anormal	F	- flagelo
CB	- corpúsculo basal	FA	- fibras acessórias
CC	- massa citoplasmática comum entre espermátides	FD	- fibras eléctron-densas
CG	- vesículas do complexo de Golgi	FM	- figuras mielínicas
CI	- cisto	IN	- inclusões nucleares
CM	- cristas mitocondriais	L	- ligao eléctron-densa entre o axonema e os derivados mitocondriais
CMP	- camada de células musculares da parede do testículo	M	- membranas
CMV	- complexo multivesicular	MA	- membranas adjacentes
CT	- cutícula	MACR	- complexo de membranas do acrosoma
D	- descontinuidades do envoltório nuclear	MC	- microtúbulos centrais

MD	- material eléctron-denso depositado nos derivados mitocondriais	NCP	- nucléolo da célula da parede do cisto
MDM	- membrana dos derivados mitocondriais	NP	- núcleo da célula da parede do cisto
MF	- material fibrilar	P	- pontes citoplasmáticas
MI	- mitocôndrias	PC	- parede do cisto
MIT	- membrana intersticial	PI	- grânulos de pigmento das células da parede do <u>tes</u> tículo
MP	- membrana plasmática	PN	- poros nucleares
MPA	- material em arranjo periódico no interior do acrosoma	PR	- polirribosoma
MT	- microtúbulos	R	- ribosomas
N	- núcleo	RE	- retículo endoplasmático
NB	- "Nebenkern" ou complexo mitocondrial	TA	- tecido anexo
NC	- nucléolo	V	- vesículas

* - material eléctron-denso no interior dos microtúbulos centrais e das fibras acessórias do axonema

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 1 A 4

FIGURAS 1 e 2 - Cortes de espermátides de *Ceratitís capitata*, no estágio 1. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: o núcleo (N) com áreas de cromatina condensada; membranas do retículo endoplasmático (RE); vesículas do complexo de Golgi (CG); numerosas mitocôndrias (MI); e pontes citoplasmáticas (P) entre as células. Figura 1, X 8000. Figura 2, X 9600.

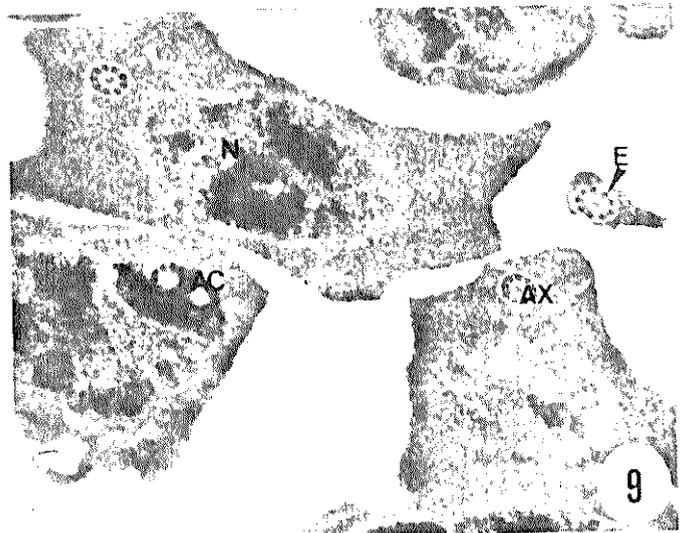
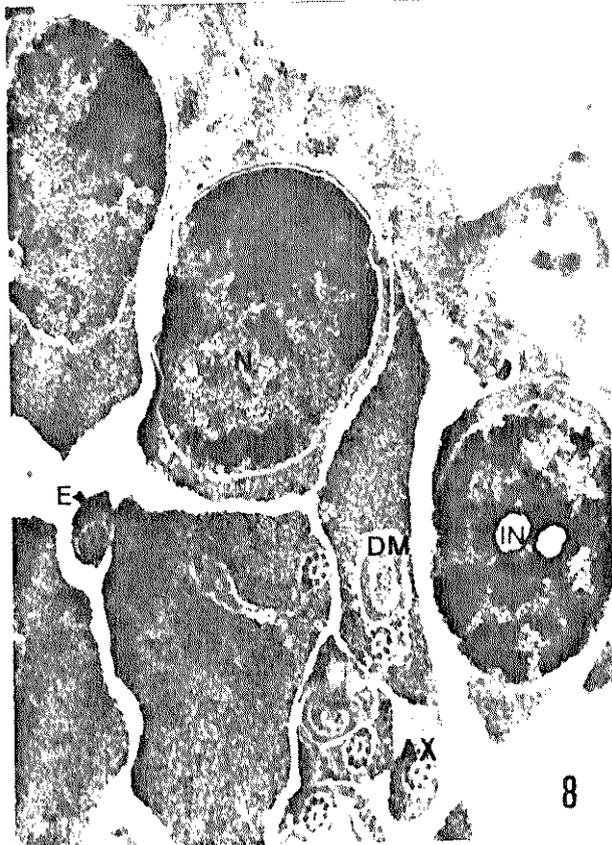
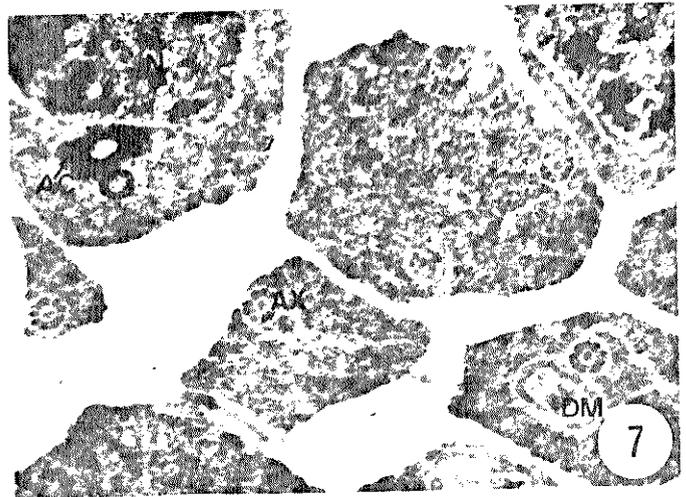
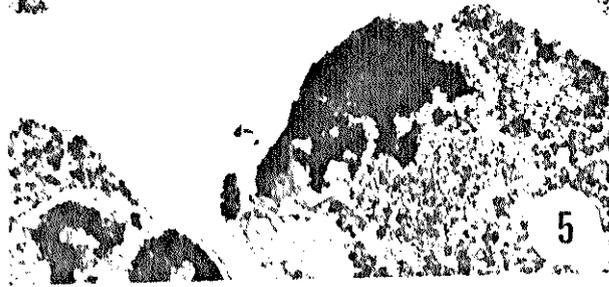
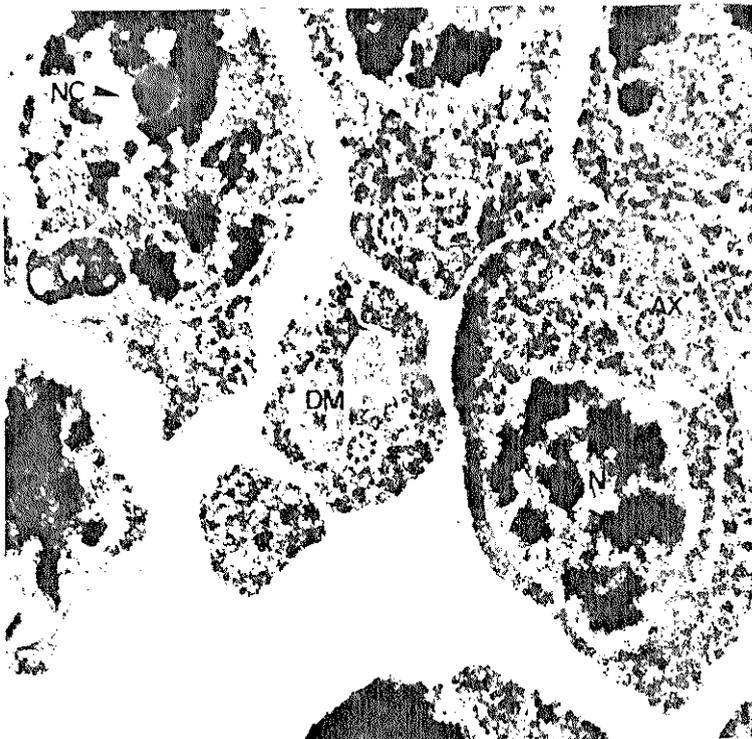
FIGURAS 3 e 4 - Cortes de espermátides no estágio 2. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: núcleo (N) com áreas de cromatina condensada; membranas do retículo endoplasmático (RE); vesículas do complexo de Golgi (CG); pontes citoplasmáticas (P) entre as células; o axonema (AX) rodeado por membranas; e o "Nebenkernel" (NB) formado pela fusão das mitocôndrias. Figura 3, X 9500. Figura 4, X 21400.



EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 5 A 9

FIGURAS 5 e 6 - Cortes de espermátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 4. Material desidratado em EPTA e cortes contrastados com uranila e chumbo. As figuras mostram: o núcleo (N) com áreas de cromatina condensada e com nucléolo (NC); o adjunto do centríolo (AC), justaposto ao núcleo; e o axonema (AX) ladeado pelos derivados mitocondriais (DM) em formação. Figura 5, X 23800. Figura 6, X 23800.

FIGURAS DE 7 a 9 - Cortes de espermátides no estágio 4. Material desidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e chumbo. As figuras mostram: o núcleo (N) ovóide, com áreas de cromatina condensada e com inclusões nucleares (IN); o adjunto do centríolo (AC) justaposto ao núcleo; o axonema (AX) ladeado pelos derivados mitocondriais (DM) em formação; a extremidade (E) da cauda da espermátide onde aparece apenas o axonema, estando ausentes os derivados mitocondriais. Figura 7, X 22900. Figura 8, X 18500. Figura 9, X 22900.



eléctron-denso (MD); e um complexo multi-vesicular (CMV) no citoplasma. X 23800.

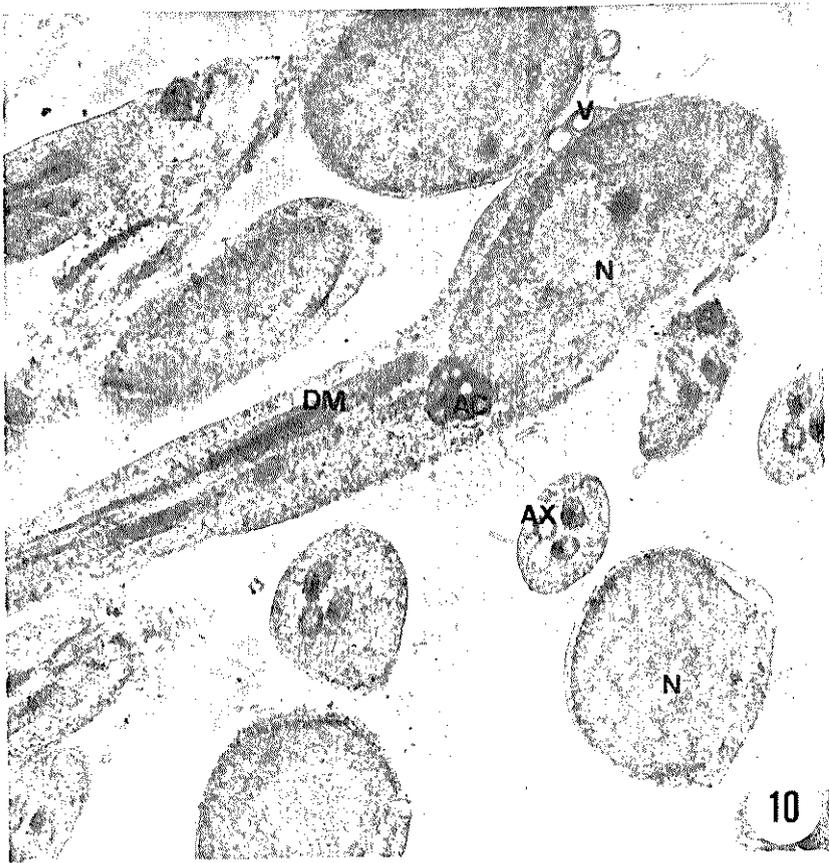
FIGURA 13 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermatídes, no estágio 5, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina em compactação e com nucléolo (NC); as membranas adjacentes (MA) ao núcleo; o axonema (AX) em formação, apenas com os dois microtúbulos centrais (MC) e as nove duplas periféricas (DP) de microtúbulos; o adjunto do centríolo (AC) junto do axonema e os derivados mitocondriais (DM), na região inicial da cauda das espermatídes; os microtúbulos (MT) ao redor do adjunto do centríolo e próximos ao axonema. X 23800.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 10 A 13

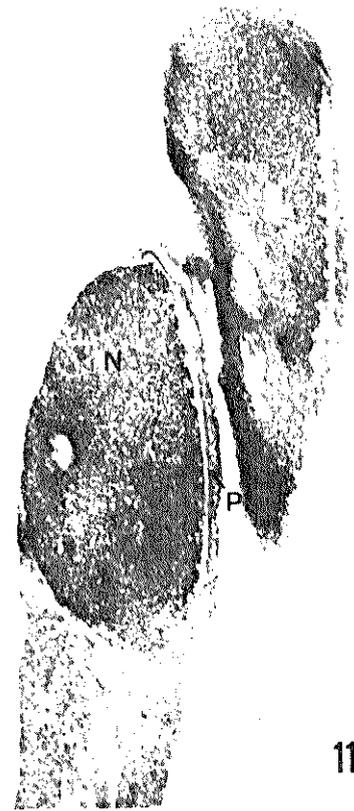
FIGURA 10 - Espermátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 5, cortadas longitudinal e transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) ovóide, com cromatina descompactada; vesículas (V) na região anterior da cabeça da espermátide; o adjunto do centríolo (AC) justaposto à extremidade posterior do núcleo; o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM) na região da cauda da espermátide. X 15300.

FIGURA 11 - Corte longitudinal de espermátides no estágio 5. Material desidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra células em alongamento, as quais apresentam núcleo (N) ovóide, com cromatina disposta em fibrilas, e aparentes poros nucleares (PN) confinados a uma área determinada do envoltório nuclear. X 24700.

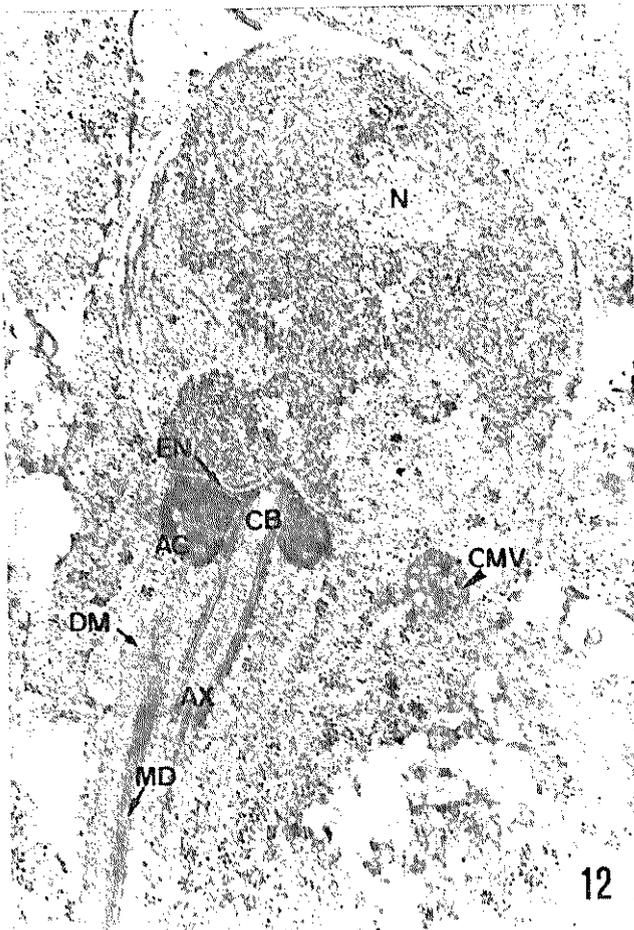
FIGURA 12 - Corte longitudinal de espermátide no estágio 5. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina em compactação; o envoltório nuclear (EN) da extremidade posterior do núcleo onde se encontra justaposto o adjunto do centríolo (AC); o corpúsculo basal (CB) na região inicial do axonema (AX); os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material



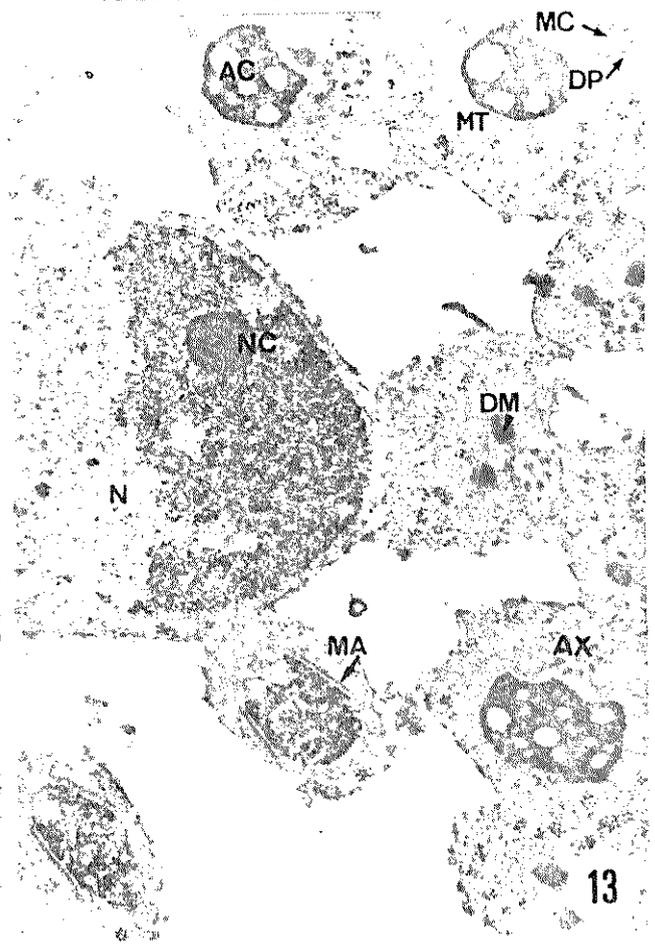
10



11



12



13

tetróxido de ósmio e ácido tânico. As figuras mostram: o acrosoma (ACR) na extremidade anterior do núcleo e a membrana intersticial (MIT) entre eles; o núcleo (N), alongado, com cromatina em compactação e com nucléolo (NC); o envoltório nuclear (EN), modificado e descontínuo (D), na extremidade posterior do núcleo onde se encontra justaposto o adjunto do centríolo (AC); aparentes poros nucleares (PN) confinados a uma área determinada do envoltório nuclear; o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM) na região inicial da cauda das espermátides. Figura 17, X 15000. Figura 18, X 13700.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 14 A 18

FIGURA 14 - Região da cabeça e região da cauda de espermátides de *Ceratitís capitata*, no estágio 5, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina em compactação; as membranas adjacentes (MA) ao núcleo; o axonema (AX); os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material elétron-denso (MD); e os microtúbulos (MT) ao redor dos derivados mitocondriais. X 18500.

FIGURAS 15 e 16 - Região da cabeça, região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e região da cauda de espermátides, no estágio 5, cortadas obliquamente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. As figuras mostram: o acrosoma (ACR) na extremidade anterior do núcleo; o núcleo (N) com cromatina em compactação; aparentes poros nucleares (PN) confinados a uma área determinado do envoltório nuclear; as membranas adjacentes (MA) ao núcleo; o adjunto do centríolo (AC) justaposto à extremidade posterior do núcleo; o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM). Figura 15, X 16000. Figura 16, X 10500.

FIGURAS 17 e 18 - Cortes longitudinais da região da cabeça, da região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e da região da cauda de espermátides no estágio 5. Material pós-fixado em mistura de

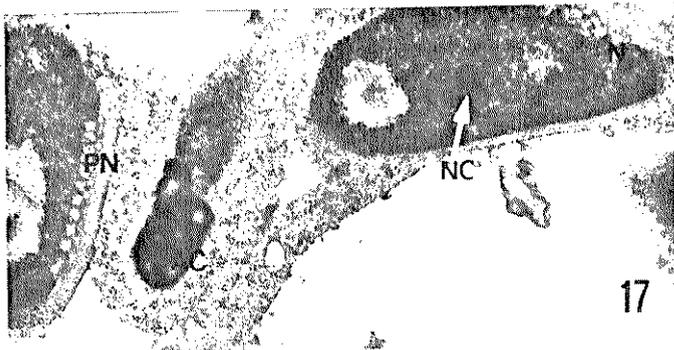
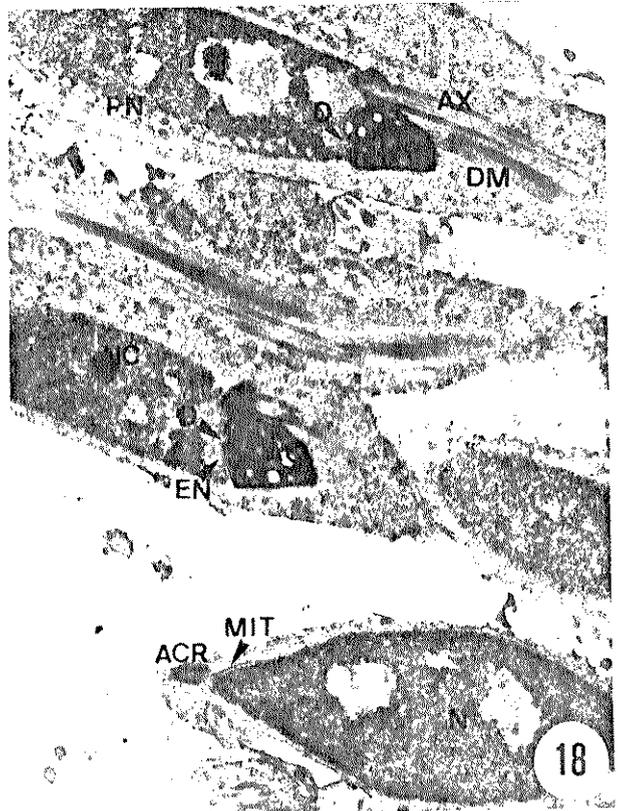
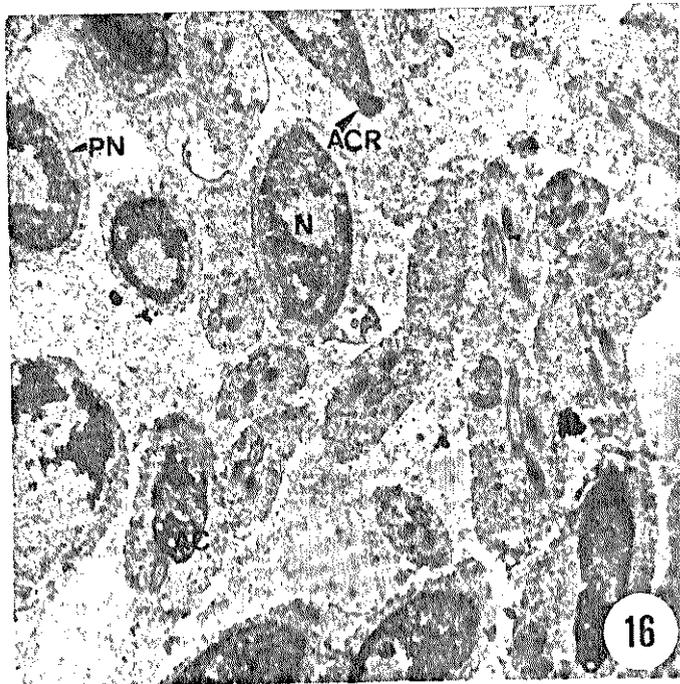
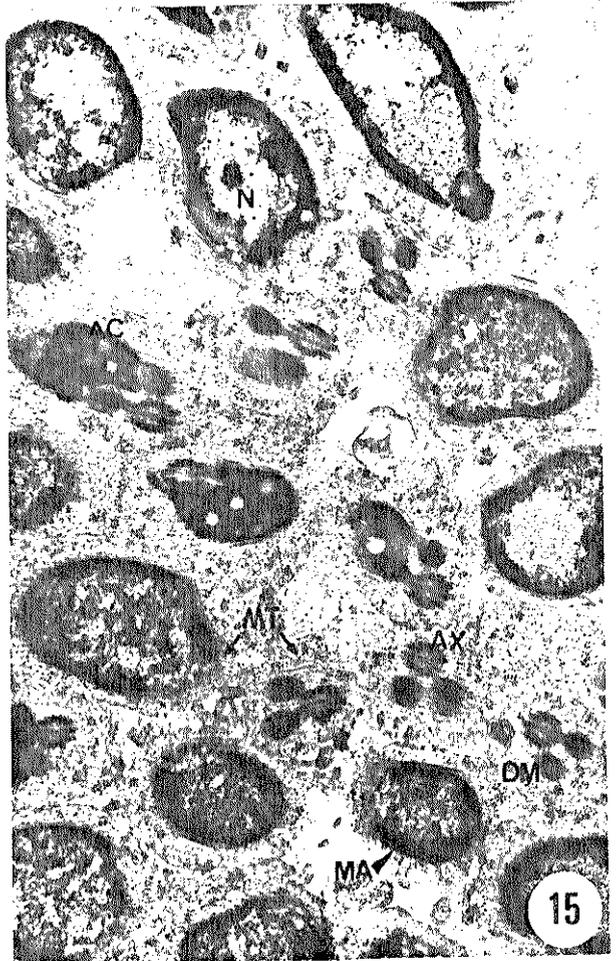


FIGURA 23 - Corte transversal da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) com concavidades laterais e com cromatina em compactação, disposta em filamentos e formando uma camada electrónica-densa junto à face interna do envoltório nuclear; as membranas adjacentes (MA) acompanhando as concavidades nucleares; e os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes. X 38000.

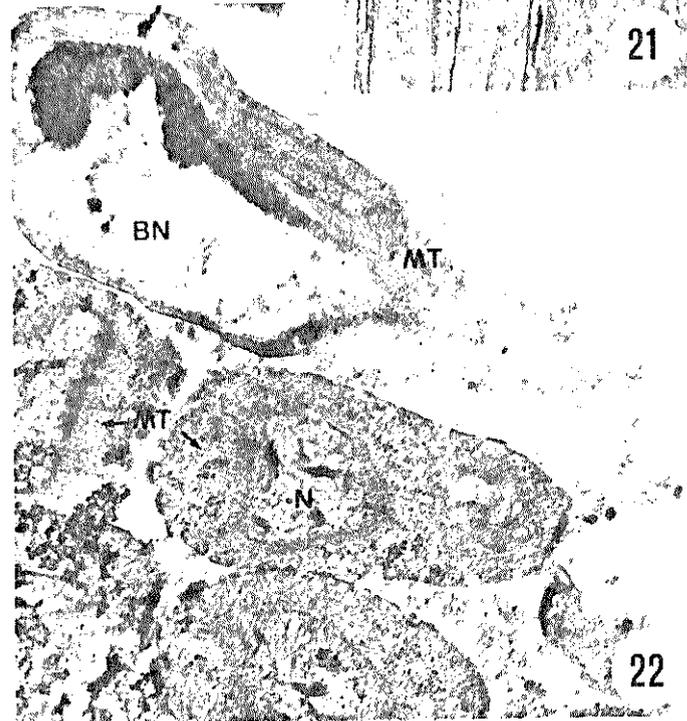
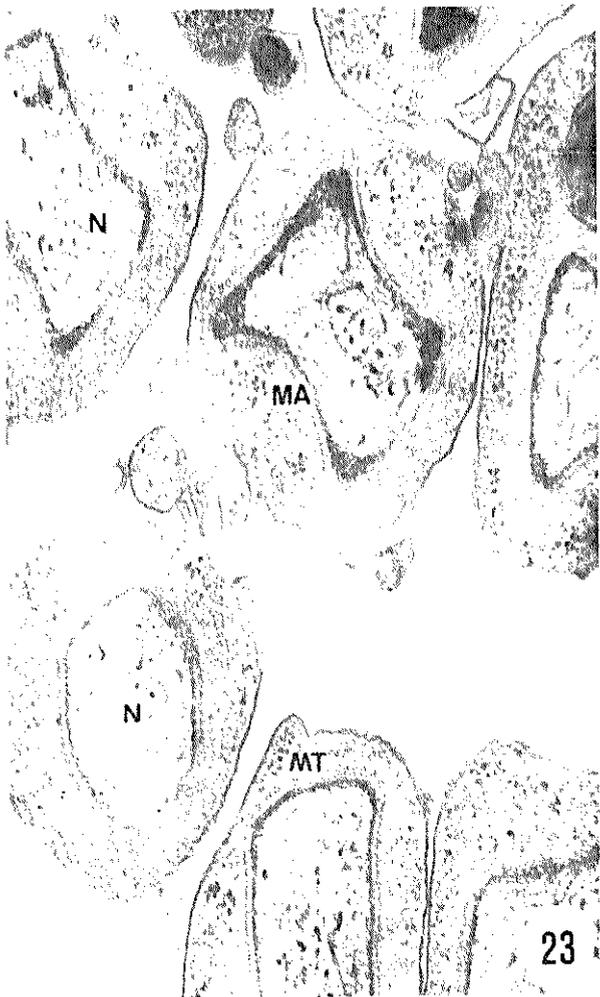
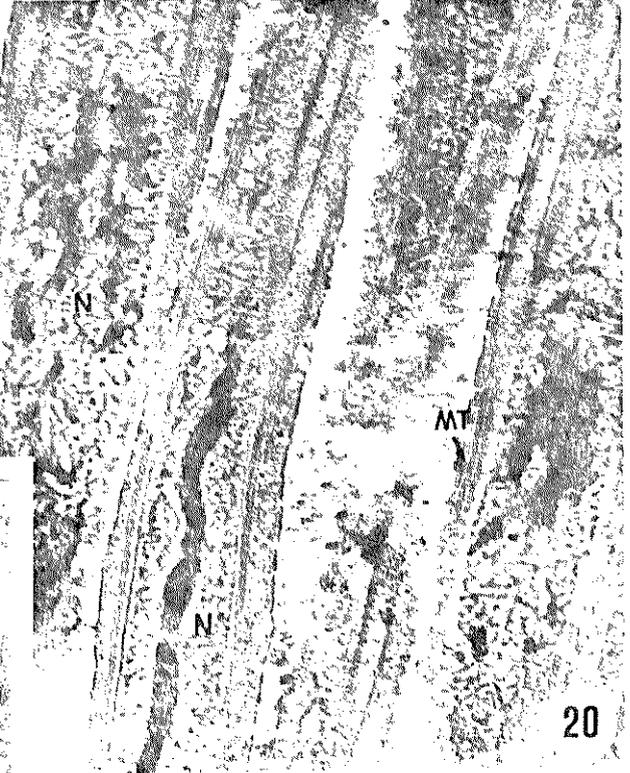
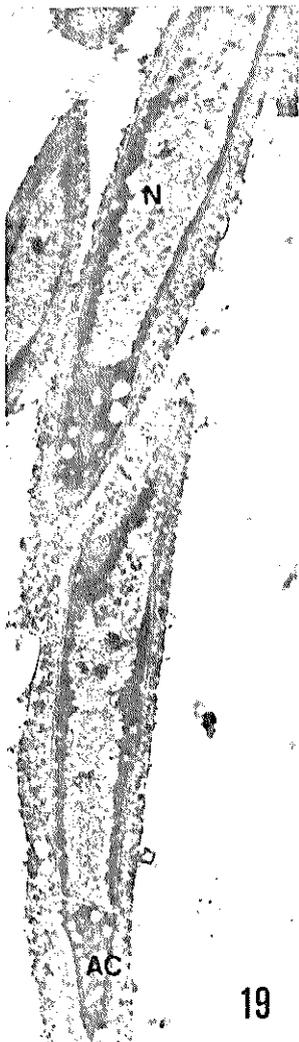
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 19 A 23

FIGURA 19 - Corte longitudinal da região final da cabeça de espermátides de *Ceratitidis capitata*, no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) alongado, com cromatina em compactação junto à face interna do envoltório nuclear; e o adjunto do centríolo (AC) justaposto à extremidade posterior do núcleo.

X 13200.

FIGURAS 20 e 21 - Cortes longitudinais da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. As figuras mostram: o núcleo (N) alongado, com cromatina em compactação, disposta em filamentos, e os microtúbulos (MT) ao redor deste. Figura 20, X 27300. Figura 21, X 18500.

FIGURA 22 - Corte transversal da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina em compactação, disposta em filamentos; um bulbo nuclear (BN) constituído pelo excesso de nucleoplasma e envoltório nuclear a serem eliminados; e os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo. X 24700.



FIGURAS 26 e 27 - Cortes transversais da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. As figuras mostram: o núcleo (N) com concavidades laterais e com cromatina em compactação, disposta em filamentos e formando uma camada electrónica-densa junto à face interna do envoltório nuclear; as membranas adjacentes (MA) acompanhando as concavidades nucleares; os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes; e um complexo multivesicular (CMV) no citoplasma. Figura 26, X 29100. Figura 27, X 23800.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 24 A 28

FIGURA 24 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermátides de *Ceratitís capitata*, no estágio 6, cortadas transversalmente. O material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) bicôncavo, com cromatina em compactação; membranas adjacentes (MA) acompanhando as concavidades nucleares; o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM); os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo, os derivados mitocondriais e o adjunto do centríolo; e os derivados mitocondriais ainda com algumas cristas mitocondriais (CM). X 34400.

FIGURAS 25 e 28 - Cortes transversais da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. As figuras mostram: o núcleo (N) com concavidades laterais e com cromatina em compactação, disposta em filamentos e formando uma camada eléctron-densa junto à face interna do envoltório nuclear; as membranas adjacentes (MA) que acompanham as concavidades nucleares; e os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo, nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes. Figura 25, X 20300. Figura 28, X 19400.

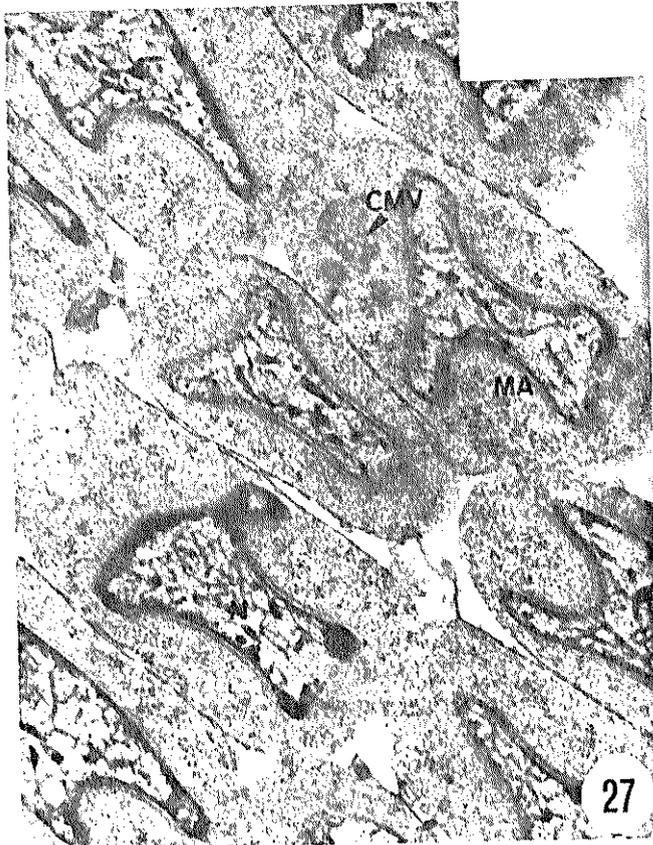
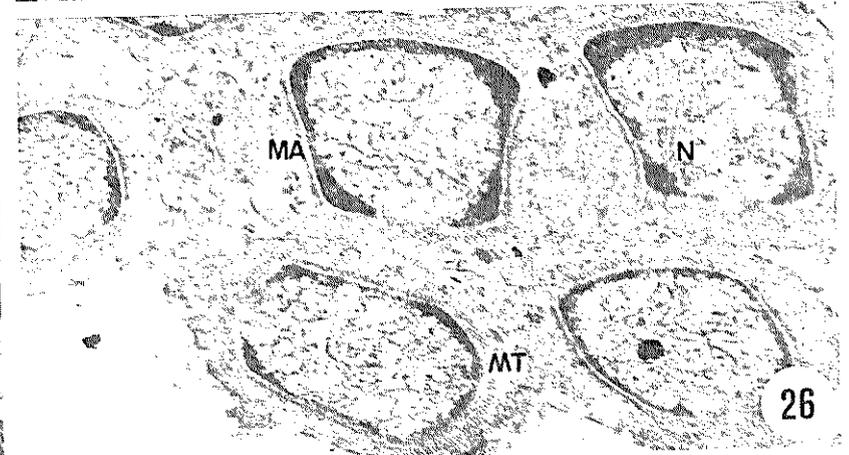
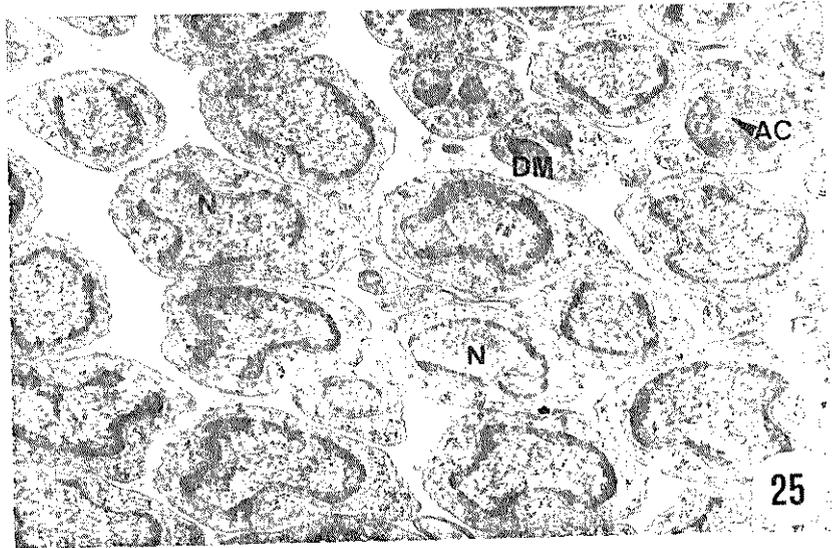
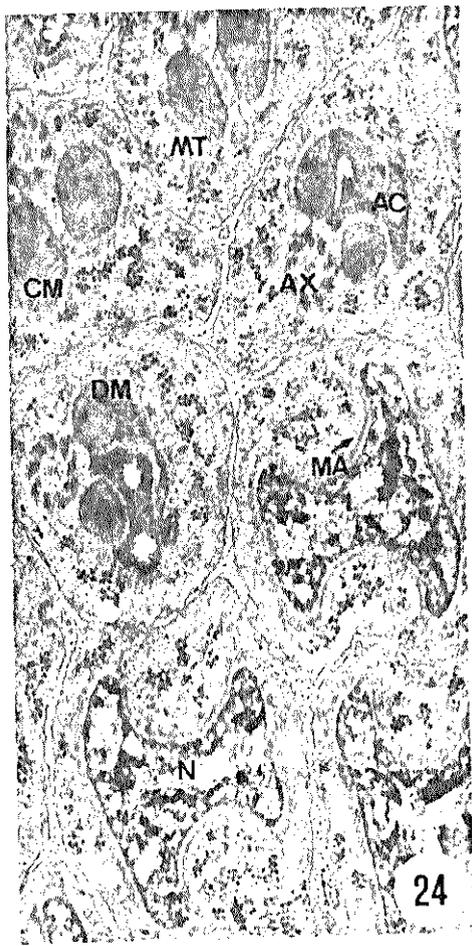


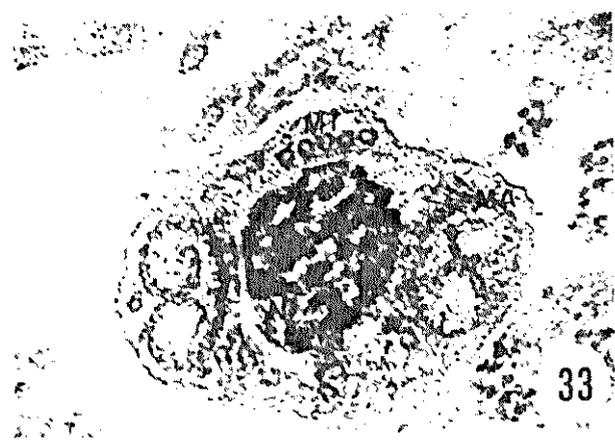
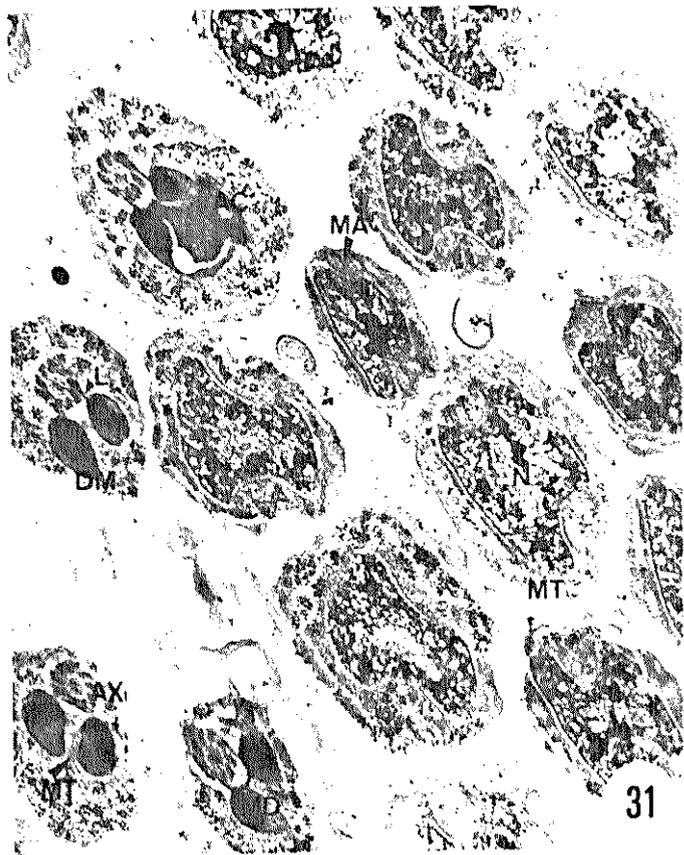
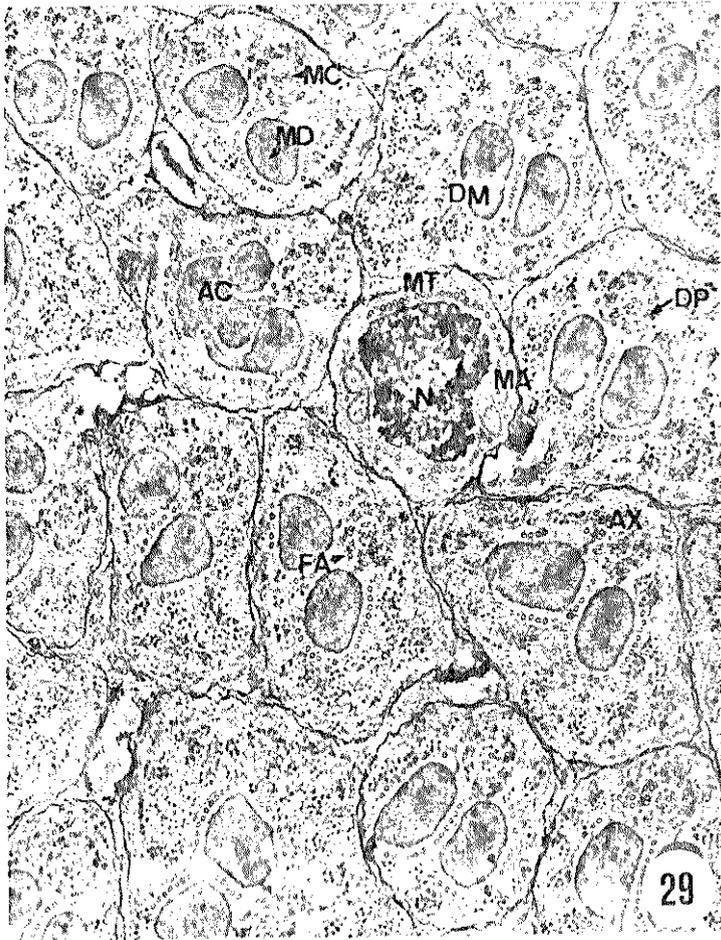
FIGURA 31 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermátides no estágio 6, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o núcleo (N), bicôncavo, com cromatina em compactação; as membranas adjacentes (MA) ao núcleo, nas suas regiões concavas; os microtúbulos (MT) ao redor dos derivados mitocondriais (DM) e ao redor do núcleo, nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes; o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais, na região inicial da cauda das espermátides; uma ligação elétron-densa (L) entre os derivados mitocondriais e o axonema (AX); e a deposição de material elétron-denso (MD) no interior dos derivados mitocondriais. X 23800.

FIGURAS 32 e 33 - Cortes transversais da região da cabeça de espermátides no estágio 7. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: o núcleo (N) sem concavidades laterais, e com cromatina em compactação; as membranas adjacentes (MA), com as extremidades laterais enroladas para dentro, distanciando-se do núcleo; e os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes. Figura 32, X 72300. Figura 33, X 79300.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 29 A 33

FIGURA 29 - Região da cabeça, região inicial da cauda, e região da cauda de espermátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 6, cortadas transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) com concavidades laterais e com cromatina em compactação; as membranas adjacentes (MA) ao núcleo com as extremidades laterais enroladas para dentro; o adjunto do centríolo (AC), que na região inicial da cauda das espermátides aparece entre os derivados mitocondriais (DM); o axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares [dois microtúbulos centrais (MC), nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e nove fibras acessórias (FA)]; os microtúbulos (MT) ao redor dos derivados mitocondriais e ao redor do núcleo, nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes; e a deposição de material elétron-denso (MD) em arranjo paracristalino no interior dos derivados mitocondriais. X 35300.

FIGURA 30 - Corte longitudinal da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o núcleo (N) alongado, com cromatina em compactação e rodeado por microtúbulos (MT). X 24700.



transversalmente. Material desidratado em EPTA e corte não contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N), bicôncavo, elétron-denso apenas em sua região central e em algumas zonas próximas à face interna do envoltório nuclear; a região inicial da cauda das espermátides mostrando o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM); e a deposição de material elétron-denso (MD) no interior dos derivados mitocondriais. X 25600.

FIGURA 37 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermátides, no estágio 6, cortadas transversalmente. Material desidratado em EPTA e corte contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N) bicôncavo, com cromatina em compactação, principalmente, junto à face interna do envoltório nuclear; o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM), na região inicial da cauda das espermátides; e a deposição de material elétron-denso (MD) no interior dos derivados mitocondriais. X 28200.

FIGURA 38 - Corte transversal da região da cabeça de espermátides no estágio 6. Material desidratado em EPTA e corte contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N) bicôncavo, com cromatina em compactação, principalmente, junto à face interna do envoltório nuclear. X 45900.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 34 A 38

FIGURA 34 - Corte longitudinal da região final da cabeça e inicial da cauda de espermatídes de *Ceratitís capitata*, no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina em compactação, disposta em filamentos e formando uma camada elétron-densa junto à face interna do envolvório nuclear; o adjunto do centríolo (AC) justaposto à extremidade posterior do núcleo; e a parte inicial do axonema (AX) das espermatídes. X 22900.

FIGURA 35 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermatídes, no estágio 6, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) bicôncavo, com cromatina em compactação formando uma camada elétron-densa junto à face interna do envoltório nuclear; as membranas adjacentes (MA) acompanhando as concavidades nucleares; os microtúbulos (MT) ao redor do núcleo nas regiões não ocupadas pelas membranas adjacentes; e o axonema e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais, na região inicial da cauda das espermatídes. X 24700.

FIGURA 36 - Região da cabeça e região inicial da cauda de espermatídes, no estágio 6, cortadas

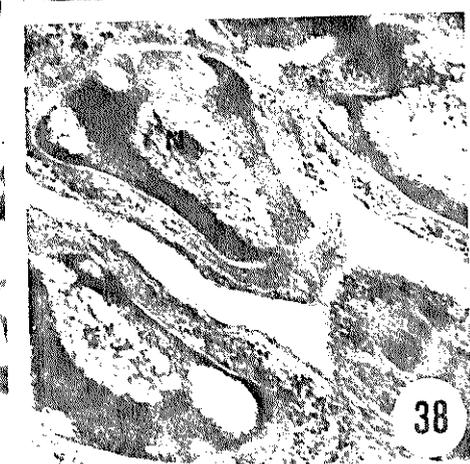
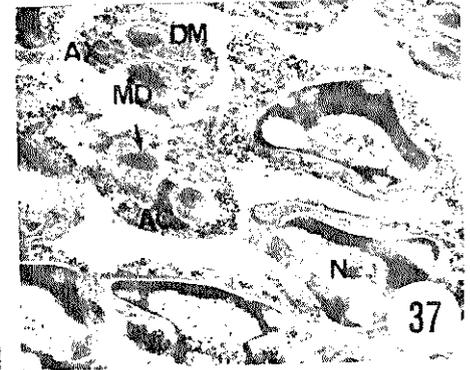
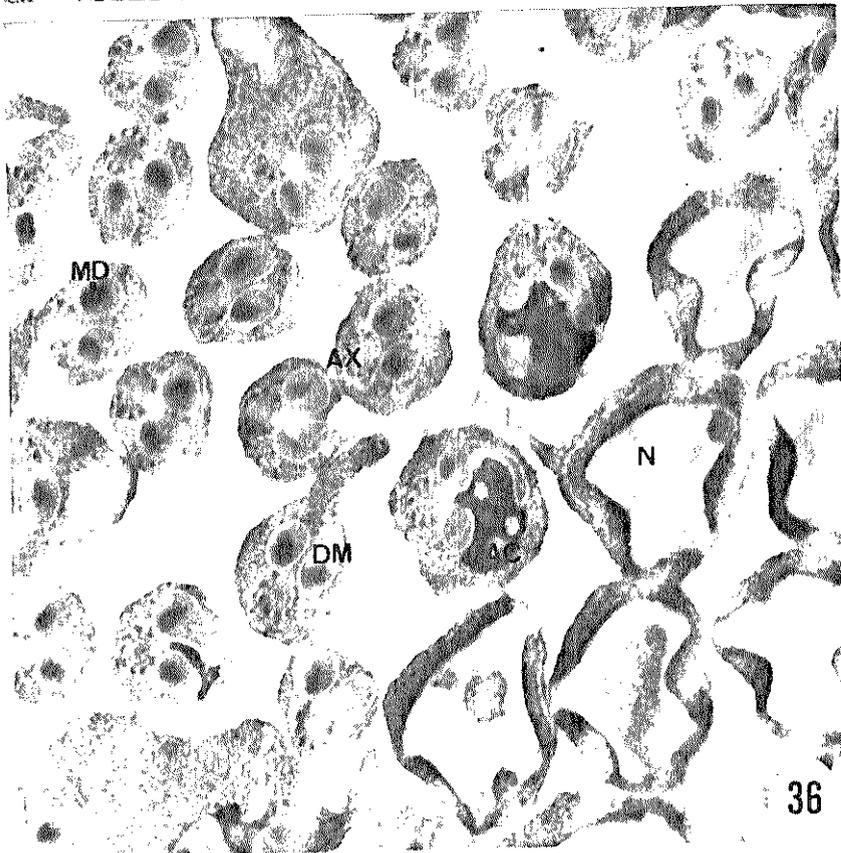
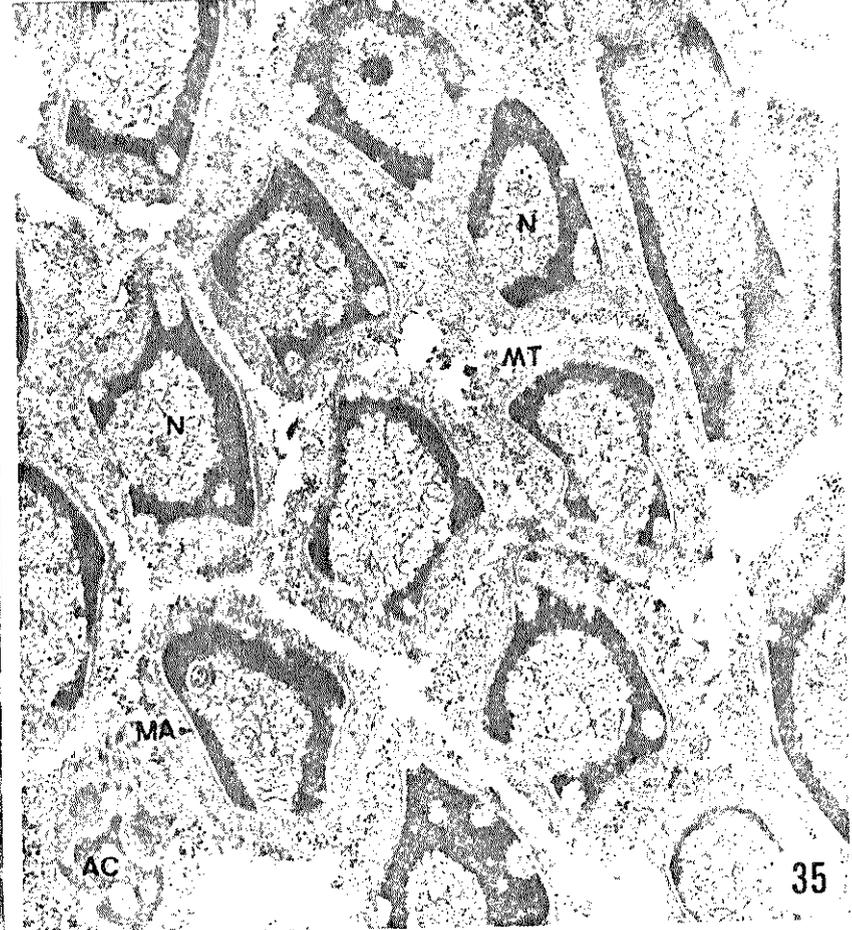
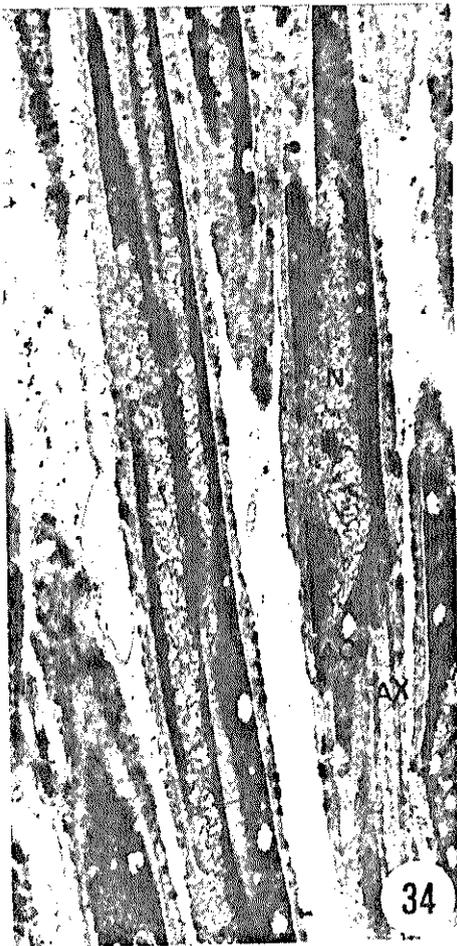


FIGURA 41 - Região da cabeça e região da cauda de espermátides, no estágio 8, cortadas transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) com a cromatina em fase final de compactação, rodeado por grande quantidade de microtúbulos (MT); as membranas adjacentes (MA), separadas em sua região central e com as extremidades laterais enroladas para dentro, distantes do núcleo; e o axonema (AX) ladeado pelos derivados mitocondriais (DM). X 41400.

FIGURAS 43 e 44 - Cortes transversais da região da cabeça de espermátides no estágio 8. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. As figuras mostram: o núcleo (N), com cromatina em fase final de compactação, circundado por microtúbulos (MT); e as membranas adjacentes (MA) com as extremidades laterais enroladas para dentro, algumas vezes separadas em sua região central, distantes do núcleo. Figura 43, X 62100. Figura 44, X 64800.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 39 A 44

FIGURA 39 - Região da cabeça e região que compreende o final da cabeça e o início da cauda de esper_mátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 7, cortadas transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o nú_cleo (N) com cromatina em fase final de compactação; as membranas adjacentes (MA) ao nú_cleo, com as extremidades laterais enroladas para dentro; os microtúbulos (MT) ao redor do nú_cleo nas regiões em que não se observam as membranas adjacentes; o bulbo nuclear (BN) formado pelo excesso de nucleoplasma e o envoltório nuclear a serem eliminados; e o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM), na região ini_cial da cauda das esper_mátides. X 26700.

FIGURAS 40 e 42 = Cortes transversais da região da cabeça de esper_mátides no estágio 8. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: o acrosoma (ACR) na extremidade anterior da cabeça das esper_mátides; o nú_cleo (N) com cromatina em fase final de compactação; as membranas adjacentes (MA), com as extremidades laterais enroladas para dentro, distanciando-se do nú_cleo; e os microtúbulos (MT) ao redor do nú_cleo. Figura 40, X 34400. Figura 42, X 26400.

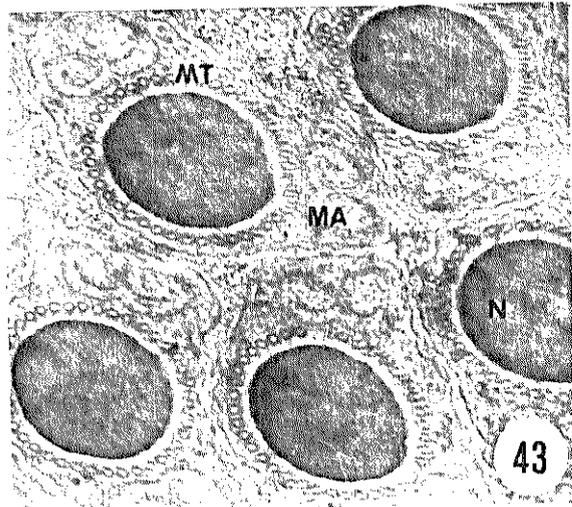
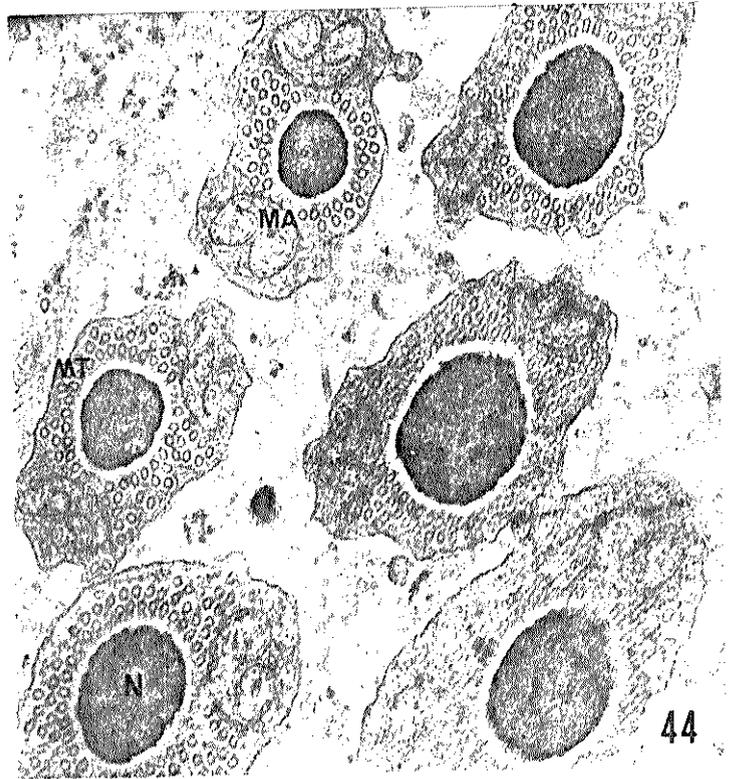
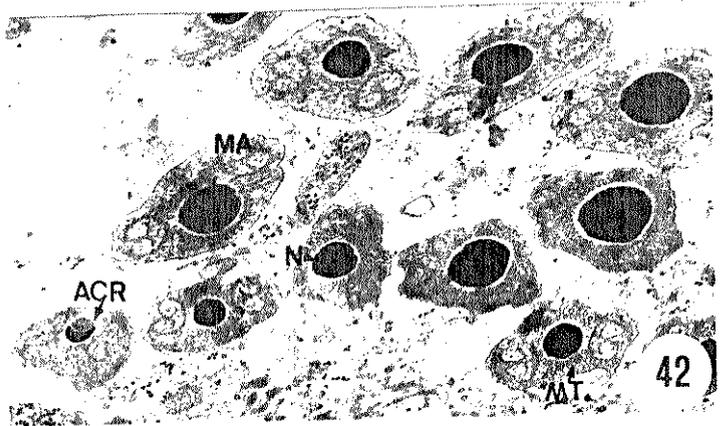
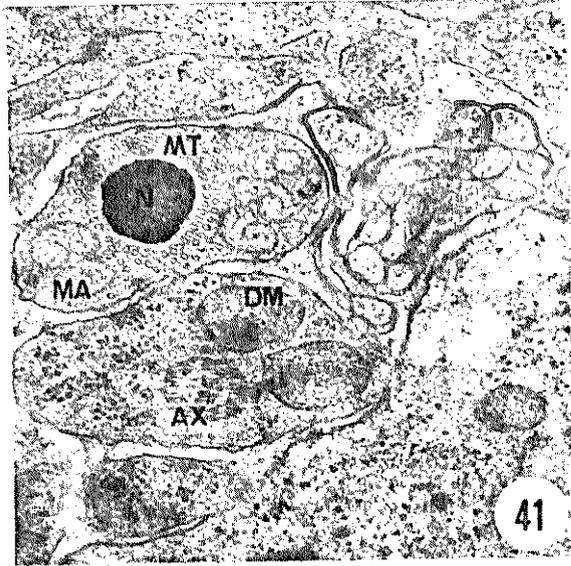
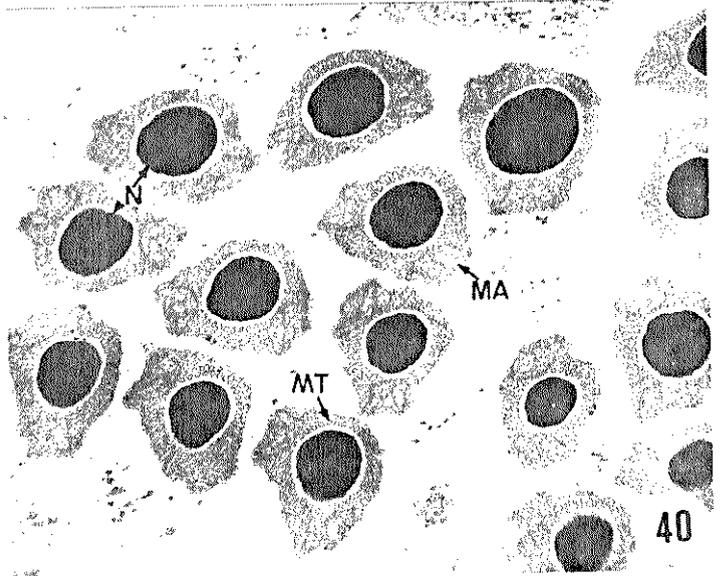
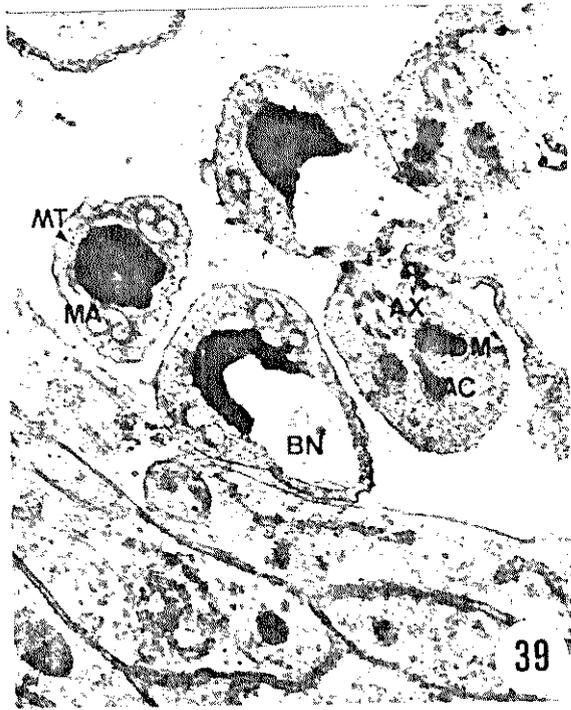


FIGURA 47 - Testículo com cisto contendo espermatozoides cortados transversal, oblíqua e longitudinalmente. Material desidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra: os grânulos de pigmento (PI) das células da parede do testículo; a camada de células musculares (CMP) da parede do testículo; o núcleo (NP) e o nucléolo (NCP) das células que formam a parede dos cistos; os núcleos (N), electrólucidos, e os flagelos (F) dos espermatozoides contidos no cisto. X 11300.

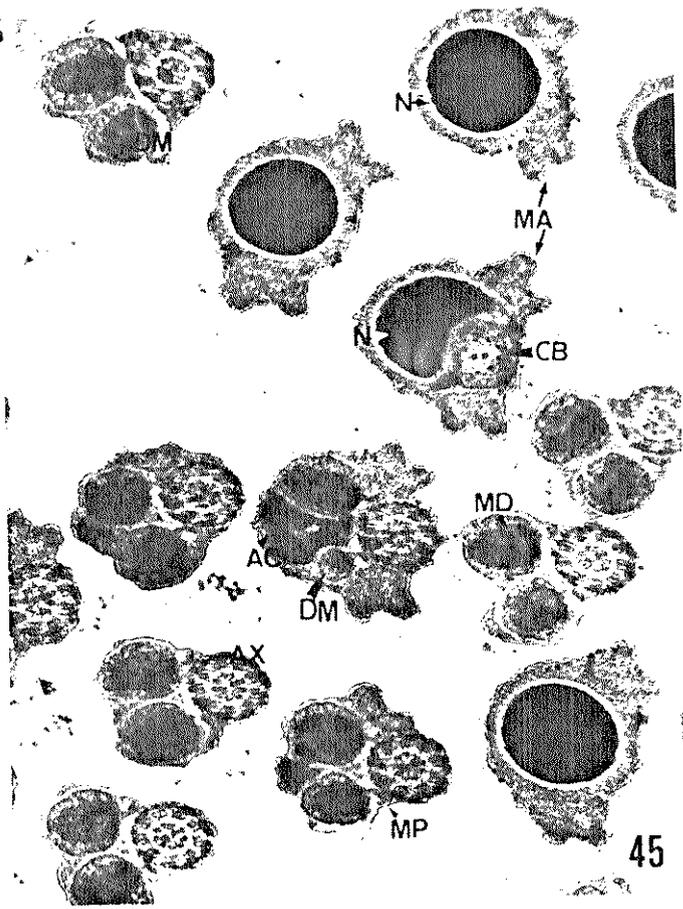
FIGURA 48 - Região da cabeça dos espermatozoides cortada transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina compactada; o acrosoma (ACR); e o complexo de membranas (MACR) que envolve o acrosoma. X 26400.

FIGURA 49 - Região da cabeça dos espermatozoides cortada transversalmente. Material desidratado em EPTA e cortes contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina compactada; a membrana plasmática (MP) da região da cabeça dos espermatozoides; o acrosoma (ACR); e o complexo de membranas (MACR) que envolve o acrosoma. X 59400.

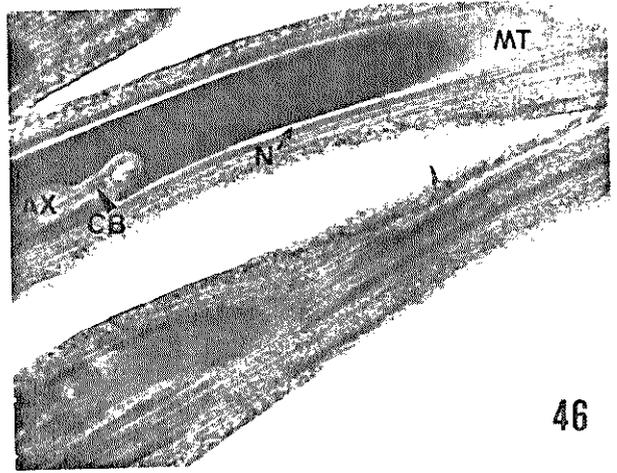
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 45 A 49

FIGURA 45 - Região da cabeça, e região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e região da cauda de espermátides de *Ceratitidis capitata*, no estágio 9, cortadas transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina compactada e rodeado por microtúbulos, e as membranas adjacentes (MA) sendo eliminadas, na região da cabeça das espermátides; o núcleo, o corpúsculo basal (CB) e as membranas adjacentes, ou as membranas adjacentes e o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM), na região que compreende o final da cabeça e o início da cauda das espermátides; o axonema com todos os seus elementos tubulares e com deposição de material elétron-denso, e os derivados mitocondriais quase que totalmente preenchidos por material elétron-denso (MD), na região da cauda das espermátides; e a membrana plasmática (MP) destas espermátides. X 42300.

FIGURA 46 - Corte longitudinal da região que compreende o final da cabeça e o início da cauda das espermátides. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) alongado, com cromatina compactada, e rodeado por microtúbulos (MT); o corpúsculo basal (CB) na região inicial do axonema (AX), a qual se insere no núcleo. X 22900.



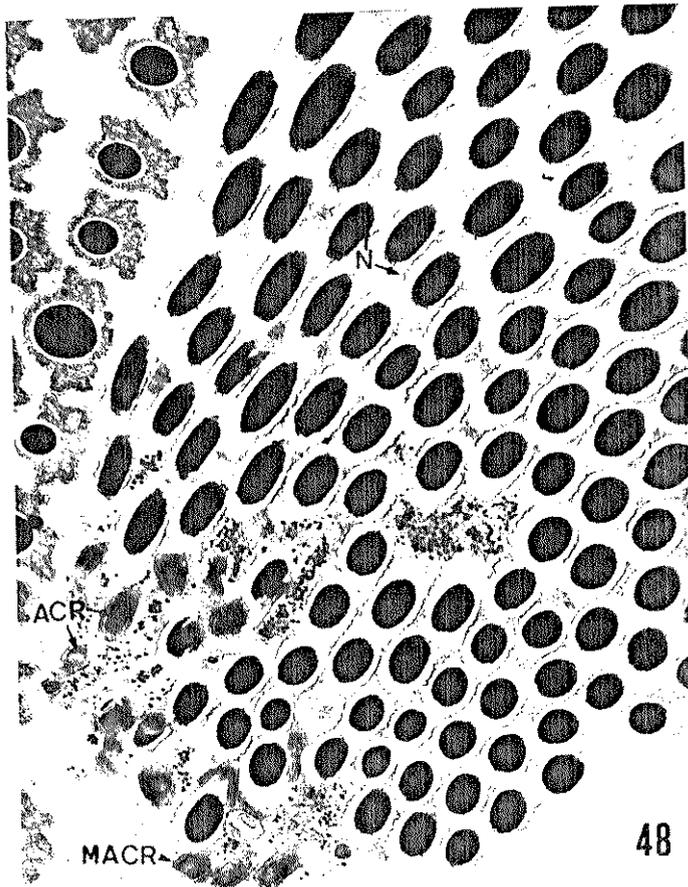
45



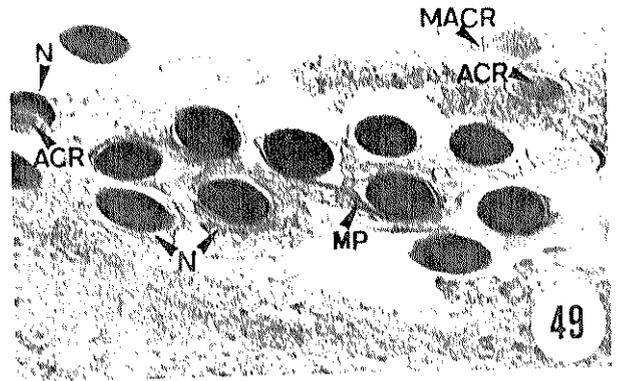
46



47



48



49

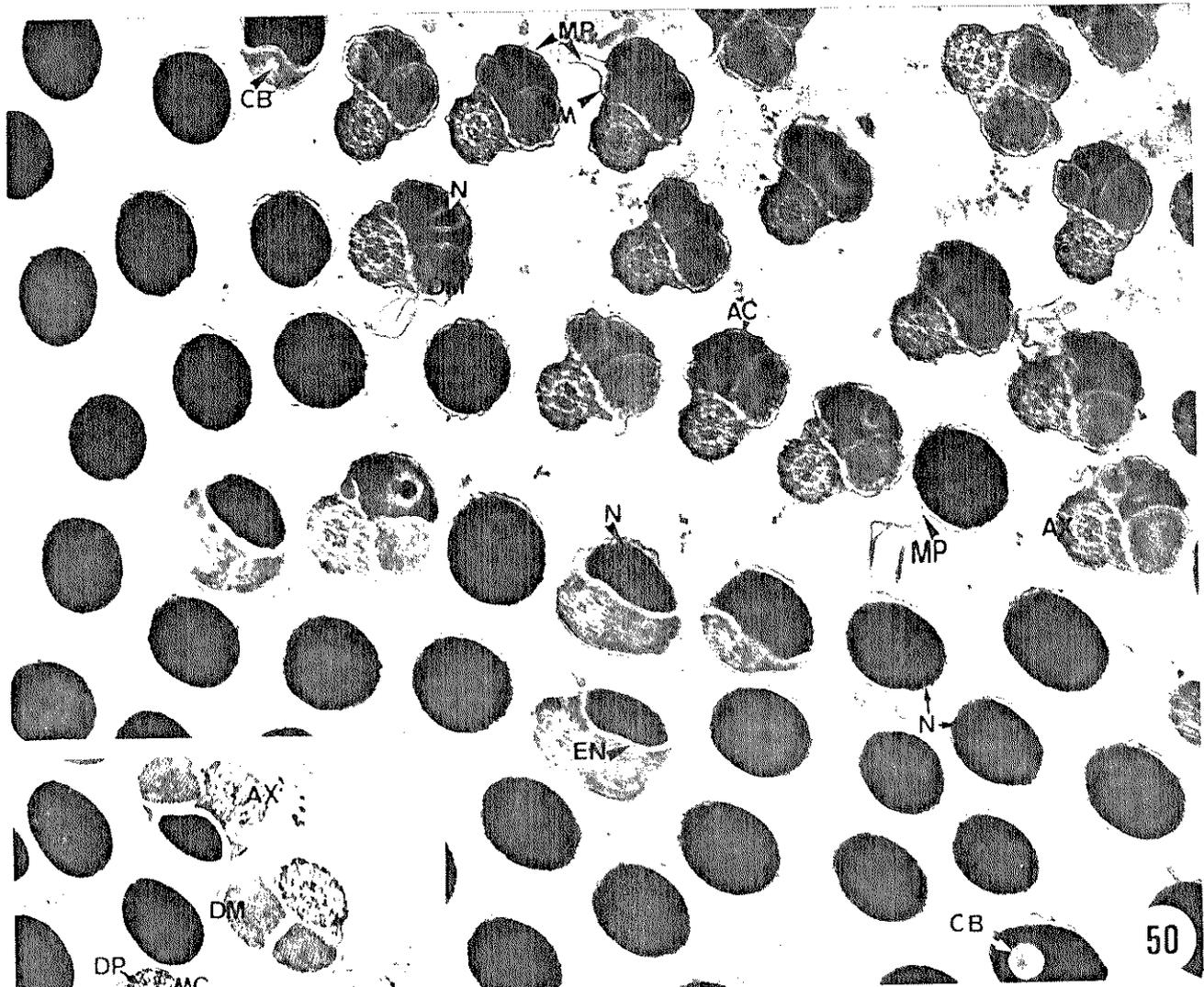
pactada, na região da cabeça dos espermatozoides; o núcleo, o axonema (AX) e apenas um dos derivados mitocondriais (DM), ou o axonema e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais, estes últimos apresentando diâmetros diferentes, na região que compreende o final da cabeça e o início da cauda dos espermatozoides; o axonema completo com todos os seus elementos tubulares [os dois microtúbulos centrais (MC), as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e as nove fibras acessórias (FA)], e com material electrónico (*) depositado no interior dos microtúbulos centrais e no interior das fibras acessórias, e com as fibras electrónico-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as duplas periféricas e entre as fibras acessórias, na região da cauda dos espermatozoides; os derivados mitocondriais providos de membrana (MDM) e totalmente preenchidos por material electrónico (MD) em arranjo paracristalino, também na região da cauda dos espermatozoides; e a membrana plasmática da região da cauda dos espermatozoides. Figura 51, 36100. Figura 52, X 75600.

FIGURA 53 - Região da cabeça, e região inicial da cauda, e região da cauda dos espermatozoides cortadas transversalmente. Material desidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N) electrónico-lúcido, na região da cabeça; o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM), na região inicial da cauda; e o axonema ladeado pelos derivados mitocondriais, na região da cauda dos espermatozoides. X 61700.

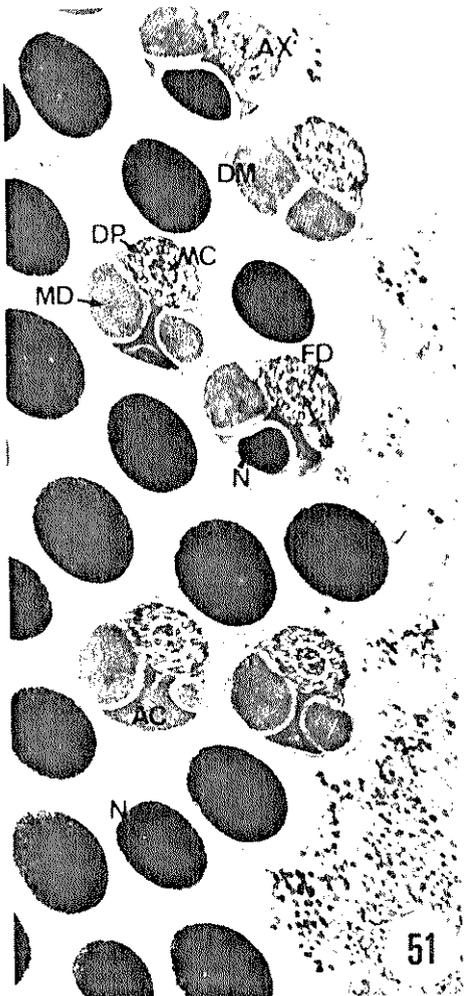
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 50 A 53

FIGURA 50 - Região da cabeça, e região que compreende o final da cabeça e o início da cauda de esper^umátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 10, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o núcleo (N) com cromatina compactada; a membrana plasmática (MP) sendo eliminada; a região mais inicial do corpúsculo basal (CB), a qual se insere no núcleo; o núcleo, com envoltório nuclear (EN) evidente, o axonema (AX) e apenas um dos derivados mitocondriais (DM), ou o axonema e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais, estes últimos apresentando diâmetros diferentes, na região que compreende o final da cabeça e o início da cauda das esper^umátides; o axonema completo com todos os seus elementos tubulares e com deposição de material elétron-denso, e os derivados mitocondriais quase que totalmente preenchidos por material elétron-denso em arranjo paracristalino, na região da cauda das esper^umátides. X 36100.

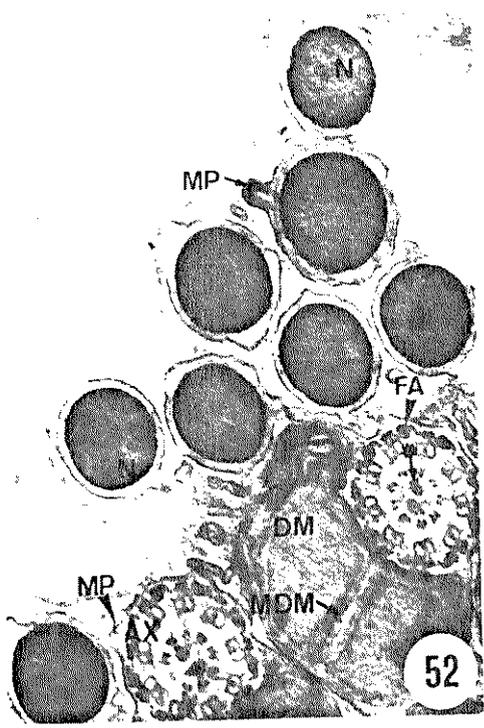
FIGURAS 51 e 52 - Região da cabeça, região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e região da cauda dos espermatozóides cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: a membrana plasmática (MP) e o núcleo (N) com cromatina com



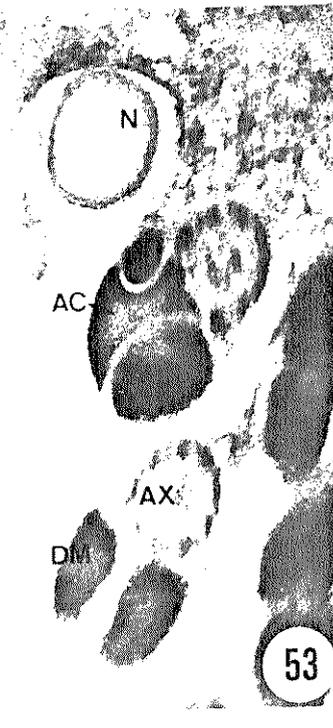
50



51



52



53

todos os seus elementos tubulares [os dois microtúbulos centrais (MC), as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e as nove fibras acessórias (FA)], e circundado por membranas (M); os derivados mitocondriais (DM), providos de membranas (MDM), ainda com algumas cristas mitocondriais (CM), e rodeados por microtúbulos (MT); bolhas (B) de eliminação do excesso de material citoplasmático; e membranas do retículo endoplasmático (RE) envolvendo o conjunto formado pelo axonema e os derivados mitocondriais. Figura 56, X 27300. Figura 57, X 30800.

FIGURA 58 - Corte transversal da região final da cauda de espermátides jovens. A figura mostra: o axonema (AX) com os dois microtúbulos centrais (MC) e com as duplas periféricas de microtúbulos (DP), e a ausência dos derivados mitocondriais. X 23800.

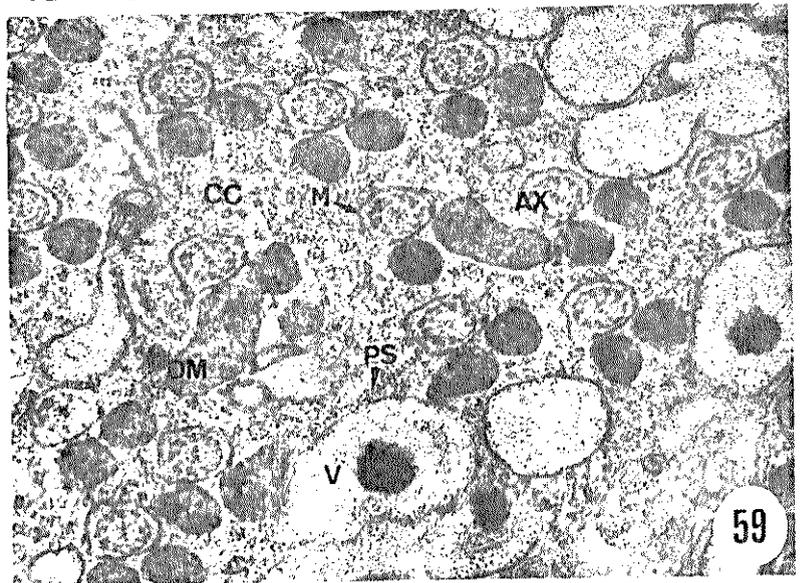
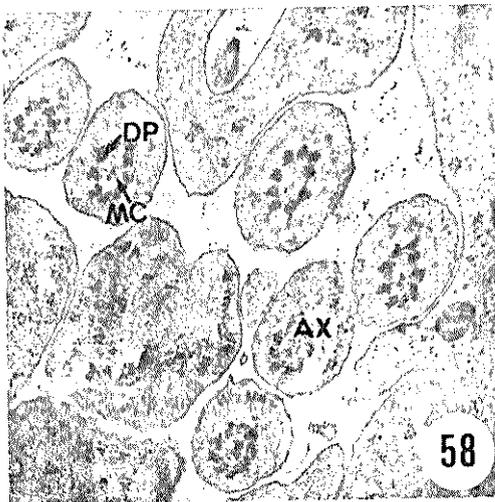
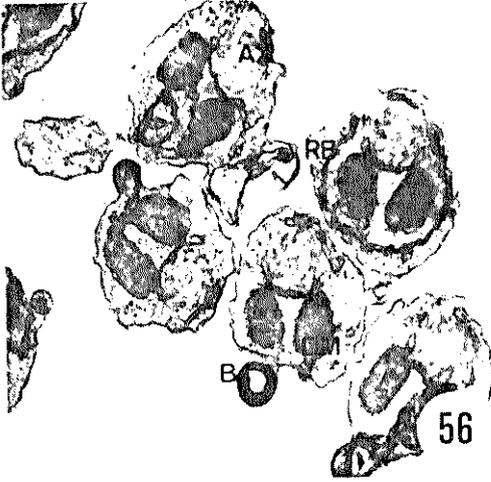
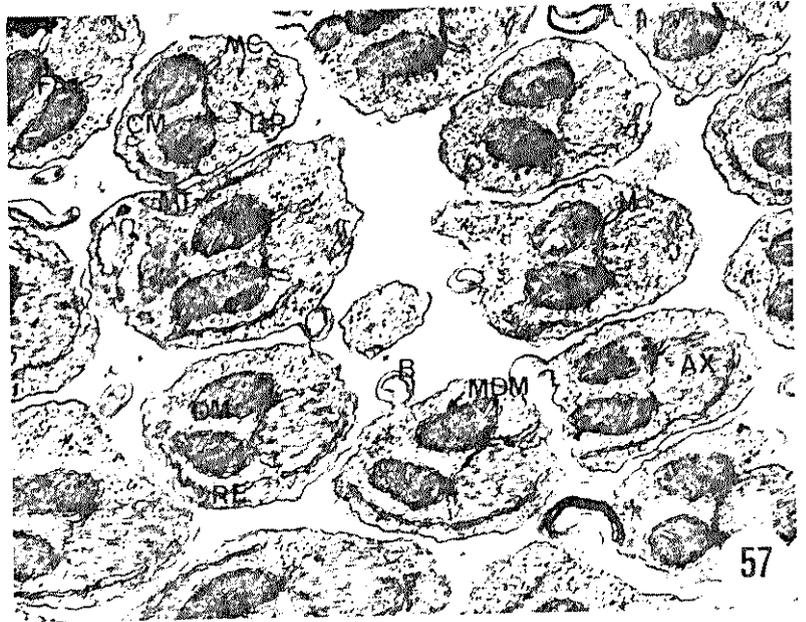
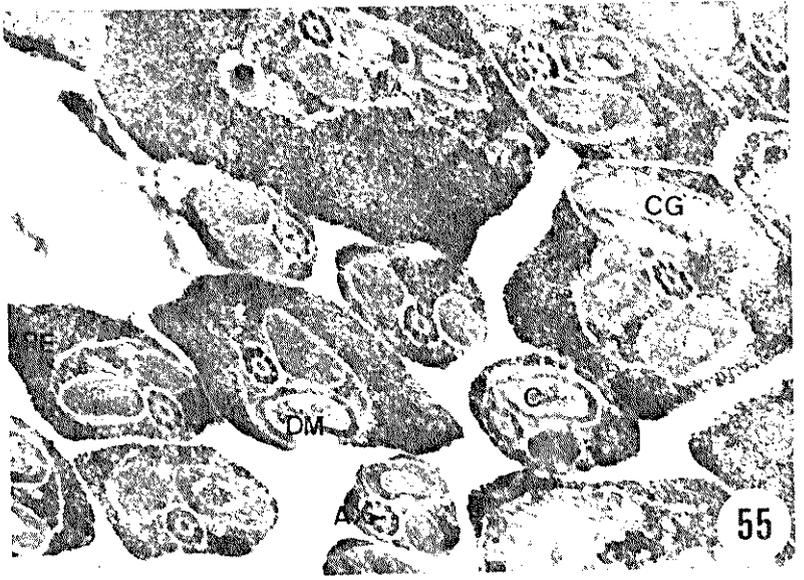
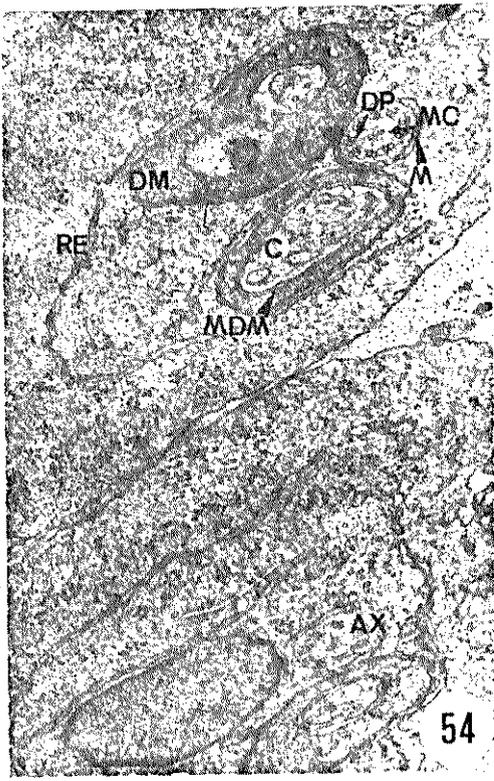
FIGURA 59 - Região da cauda de espermátides, no estágio 8, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: massas citoplasmáticas comuns (CC) entre espermátides; o axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares, com deposição de material electrónico denso e circundado por membranas (M); os derivados mitocondriais (DM); vesículas (V) contendo material electrónico denso, e numerosos polirribosomas (PR) no citoplasma das células. X 27300.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 54 A 59

FIGURA 54 - Corte transversal da região da cauda de espermatídes de *Ceratitís capitata*, no estágio 4. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. A figura mostra: o axonema (AX) constituído apenas pelos dois microtúbulos centrais (MC) e pelas nove duplas periféricas de microtúbulos (DP), e circundado por membranas (M); os derivados mitocondriais (DM) em formação, delimitados por membranas lisas e duplas (MDM); áreas de citoplasma (C) que adentram os derivados mitocondriais; e membranas do retículo endoplasmático (RE) envolvendo o conjunto formado pelo axonema e os derivados mitocondriais. X 37000.

FIGURA 55 - Corte transversal da região da cauda de espermatídes no estágio 4. Material desidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra: o axonema (AX) ladeado pelos derivados mitocondriais (DM) em formação; áreas de citoplasma (C) que adentram os derivados mitocondriais; membranas do retículo endoplasmático (RE) envolvendo o axonema e os derivados mitocondriais; e grande quantidade de vesículas do complexo de Golgi (CG) no citoplasma. X 22900.

FIGURAS 56 e 57 - Cortes transversais da região da cauda de espermatídes no estágio 6. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: o axonema (AX) com



periféricas de microtúbulos; os derivados mitocondriais (DM) rodeados por microtúbulos (MT); e membranas (M) enroladas, no citoplasma. X 43500.

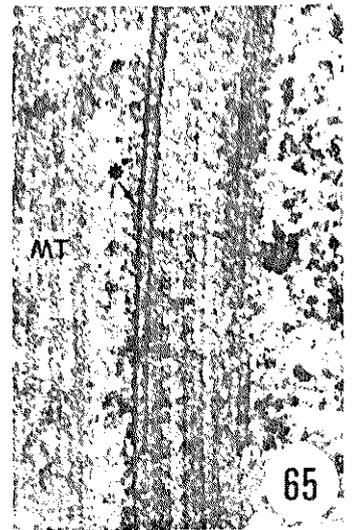
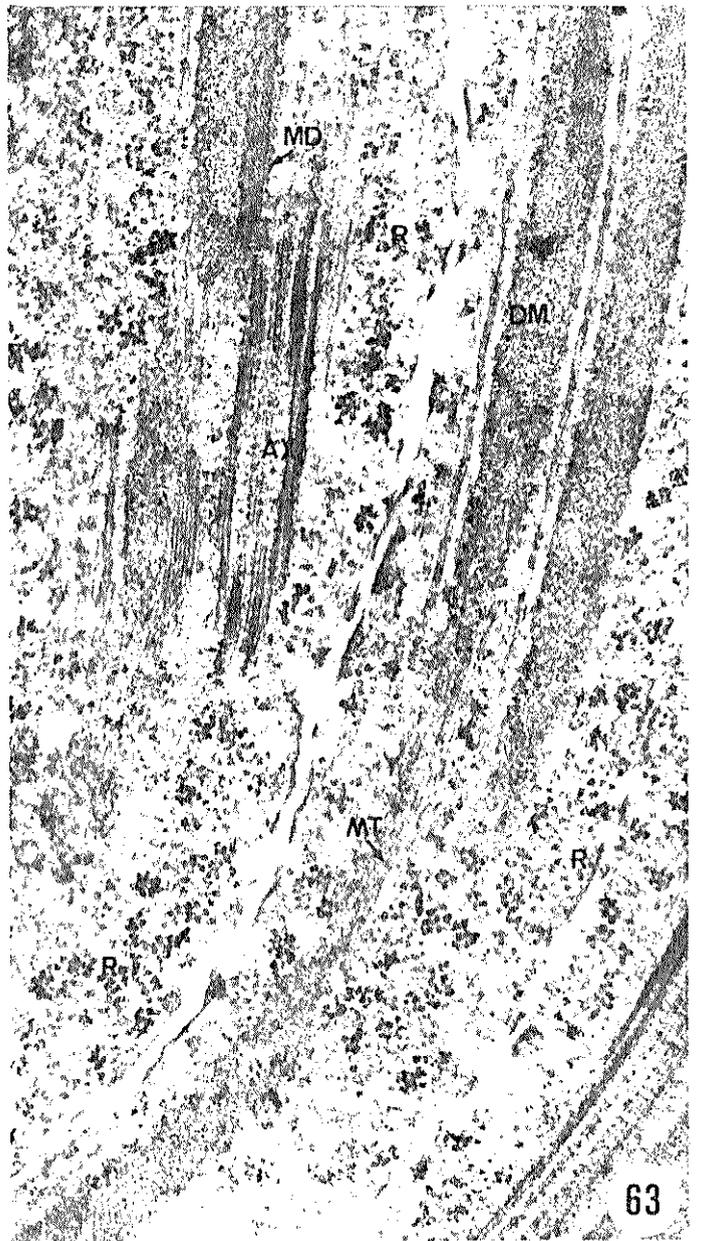
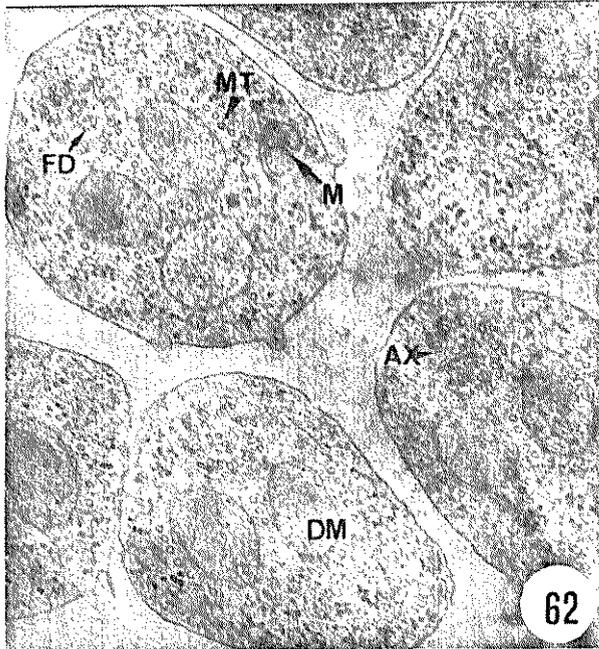
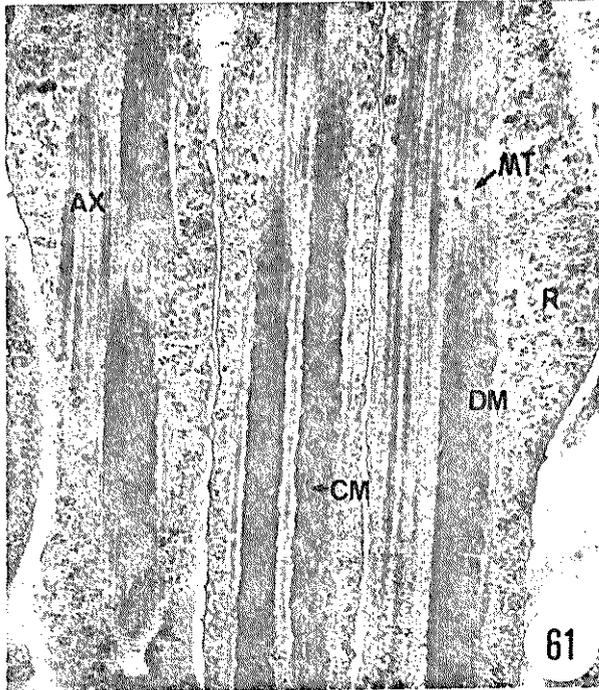
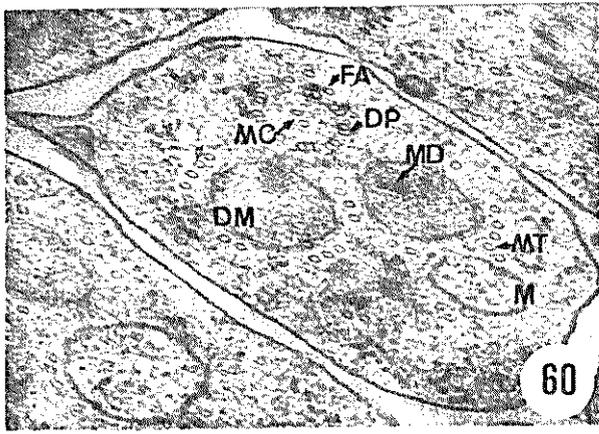
FIGURAS de 63 a 65 - Cortes longitudinais da região da cauda de espermátides. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. As figuras mostram: o axonema (AX) com uma deposição periódica de material electrónico denso (*); os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material electrónico denso (MD) em arranjo paracristalino, e rodeados por microtúbulos (MT) dispostos longitudinalmente no citoplasma; e numerosos ribosomas (R) agrupados no citoplasma. Figura 63, X 38800. Figura 64, X 61700. Figura 65, X 61700.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 60 A 65

FIGURA 60 - Corte transversal da região da cauda de espermátides de *Ceratitís capitata*, no estágio 5. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema com os dois microtúbulos centrais (MC), com as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e com as fibras acessórias (FA) em formação; os derivados mitocondriais (DM) com início de deposição de material elétron-denso (MD) em arranjo paracristalino; os microtúbulos (MT) principalmente ao redor dos derivados mitocondriais; e membranas (M) enroladas, no citoplasma. X 55600.

FIGURA 61 - Corte longitudinal da região da cauda de espermátides. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema (AX); os derivados mitocondriais (DM), ainda com algumas cristas mitocondriais (CM), e rodeados por microtúbulos (MT) dispostos longitudinalmente no citoplasma; e numerosos ribosomas (R) agrupados no citoplasma. X 25600.

FIGURA 62 - Corte transversal da região da cauda de espermátides no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema (AX) já com todos os seus elementos tubulares e com o aparecimento das fibras elétron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as duplas



da de espermatídes. Material fixado em mistura de glutaraldeído e ácido tânico. As figuras mostram: o corpúsculo basal (CB) em sua porção mais inicial, a qual se insere no núcleo (N); uma ligação eléctron-densa (L) entre o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM); e os microtúbulos (MT) que rodeiam o núcleo e os derivados mitocondriais. Figura 68, X 50200. Figura 69, X 35300.

FIGURA 70 - Corte transversal da região da cauda de espermatídes no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema com todos os seus elementos tubulares [os dois microtúbulos centrais (MC), as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e as nove fibras acessórias (FA)], e com aparecimento das fibras eléctron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as duplas periféricas de microtúbulos e entre as fibras acessórias; os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material eléctron-denso (MD) em arranjo paracristalino; e os microtúbulos (MT) dispostos principalmente ao redor dos derivados mitocondriais. X 64800.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 66 A 70

FIGURA 66 - Corte transversal da região da cauda de espermátides de *Ceratitidis capitata*, no estágio 5. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema (AX) constituído apenas pelos dois microtúbulos centrais (MC) e pelas nove duplas periféricas de microtúbulos (DP); e os derivados mitocondriais (DM) com início de deposição de material electrónico-denso (MD), e ainda com algumas cristas mitocondriais (CM). X 73000.

FIGURA 67 - Região da cauda de espermátides, no estágio 8, cortada transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: pontes (P) e massas citoplasmáticas comuns (CC) entre espermátides; o axonema (AX) completo com todos os seus elementos tubulares, e com deposição de material electrónico-denso (*) no interior dos dois microtúbulos centrais e no interior das fibras acessórias, e fibras electrónico-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos e entre as fibras acessórias; os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material electrónico-denso (MD), e ainda com algumas cristas mitocondriais (CM); e uma ligação electrónico-densa (L) entre o axonema e os derivados mitocondriais. X 28200.

FIGURAS 68 e 69: - Cortes transversais da região que compreende o final da cabeça e o início da cau-

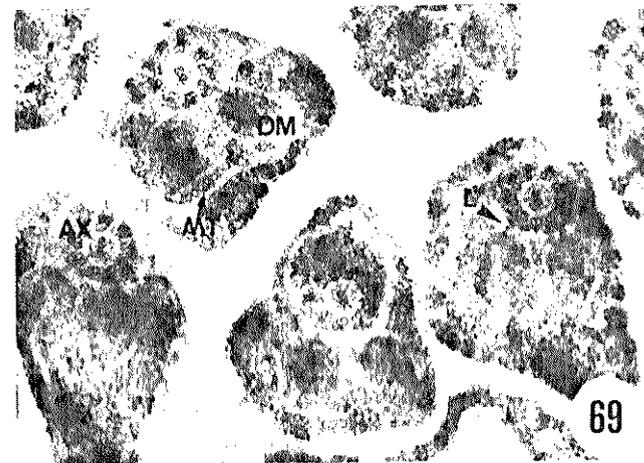
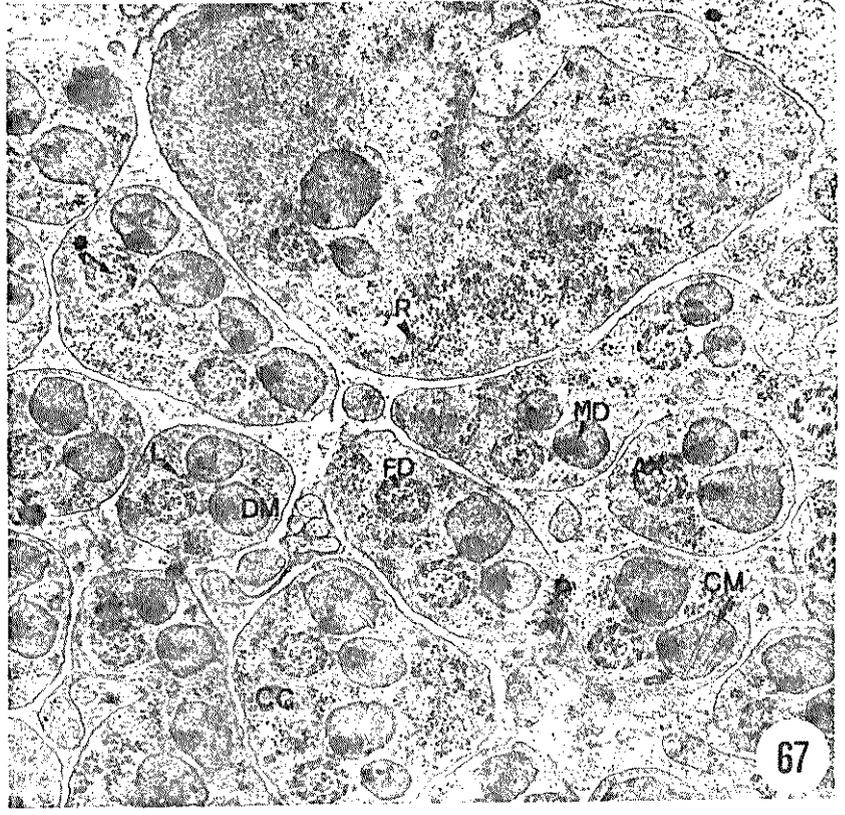
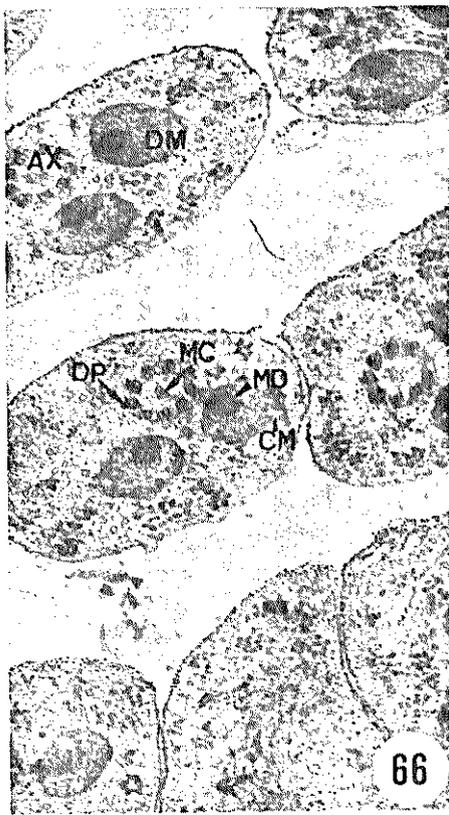


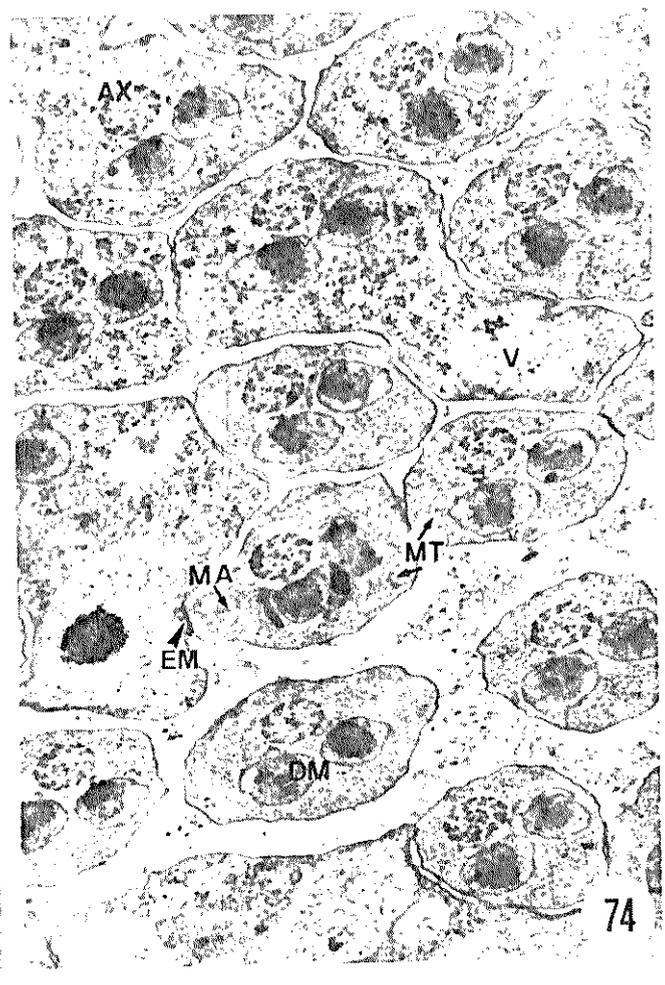
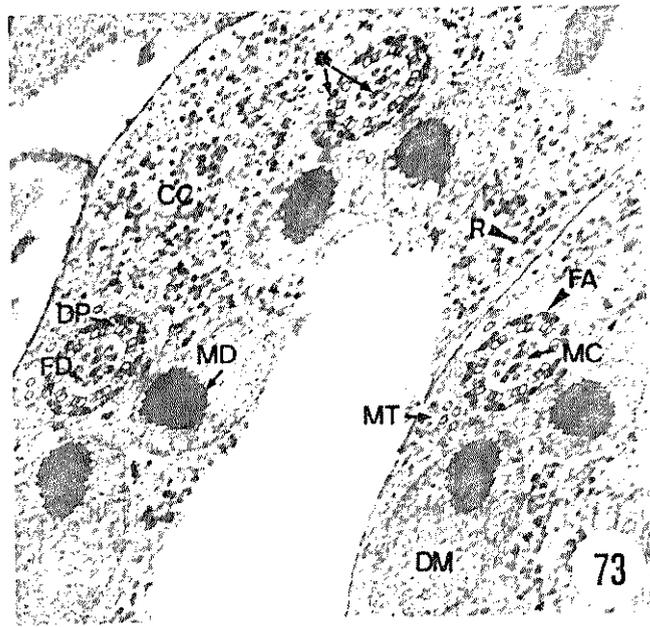
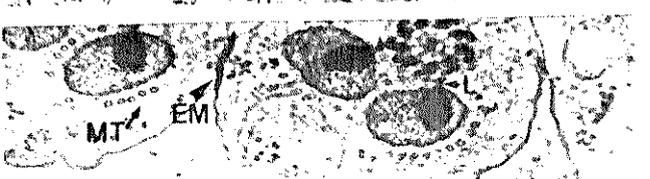
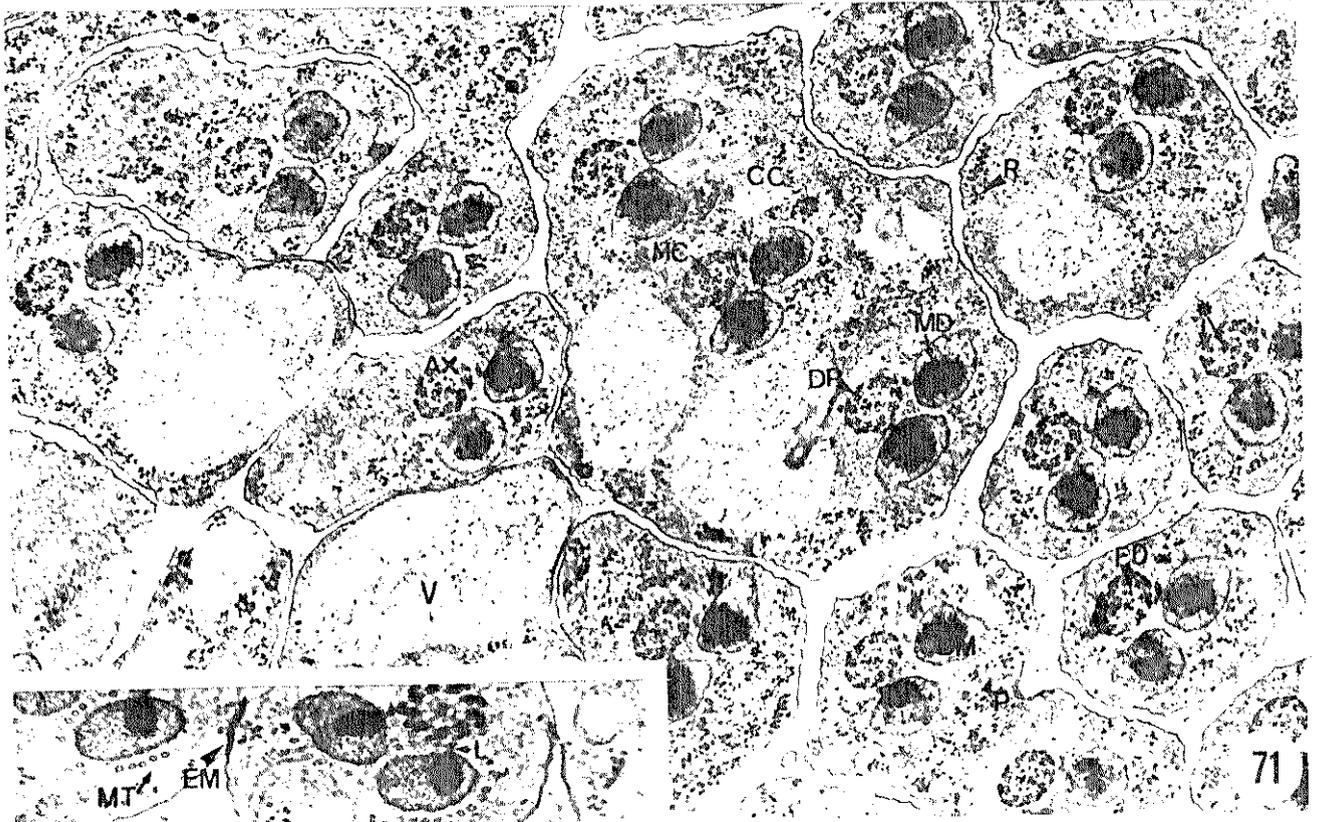
FIGURA 73 - Região da cauda de espermatídes, no estágio 8, cortada transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: massas citoplasmáticas comuns (CC) entre espermatídes; o axonema com depósitos de material elétron-denso (*) no interior dos dois microtúbulos centrais (MC) e no interior das nove fibras acessórias (FA), e fibras elétron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos; os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material elétron-denso (MD) em arranjo paracristalino; e alguns microtúbulos (MT) no citoplasma. X 108000.

FIGURA 74 - Corte transversal da região da cauda de espermatídes no estágio 8. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: espessamentos da membrana (EM) na região de contato entre duas espermatídes; o axonema (AX) completo com todos os seus elementos tubulares e com depósitos de material elétron-denso; os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material elétron-denso; vesículas (V), contendo material fibrilar, no citoplasma; a presença das membranas adjacentes (MA) ao núcleo com as extremidades laterais enroladas para dentro; e numerosos microtúbulos (MT) no citoplasma. X 33300.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 71 A 74

FIGURA 71 - Região da cauda de espermátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 8, cortada transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: pontes (P) e massas citoplasmáticas comuns (CC) entre espermátides; o axonema (AX) com deposição de material elétron-denso (*) no interior dos dois microtúbulos centrais (MC) e no interior das fibras acessórias, e com as fibras elétron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e entre as fibras acessórias; os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material elétron-denso (MD); e vesículas (V), contendo material fibrilar, no citoplasma. X 33300.

FIGURA 72 - Corte transversal da região da cauda de espermátides no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares e com fibras elétron-densas entre esses elementos; os derivados mitocondriais (DM) com início de deposição de material elétron-denso (MD) em arranjo paracristalino; membranas (M) no citoplasma; microtúbulos (MT), principalmente, ao redor dos derivados mitocondriais; uma ligação elétron-densa (L) entre o axonema e os derivados mitocondriais; e espessamentos da membrana plasmática (EM) na região de contato entre espermátides. X 37900.



71

72

73

74

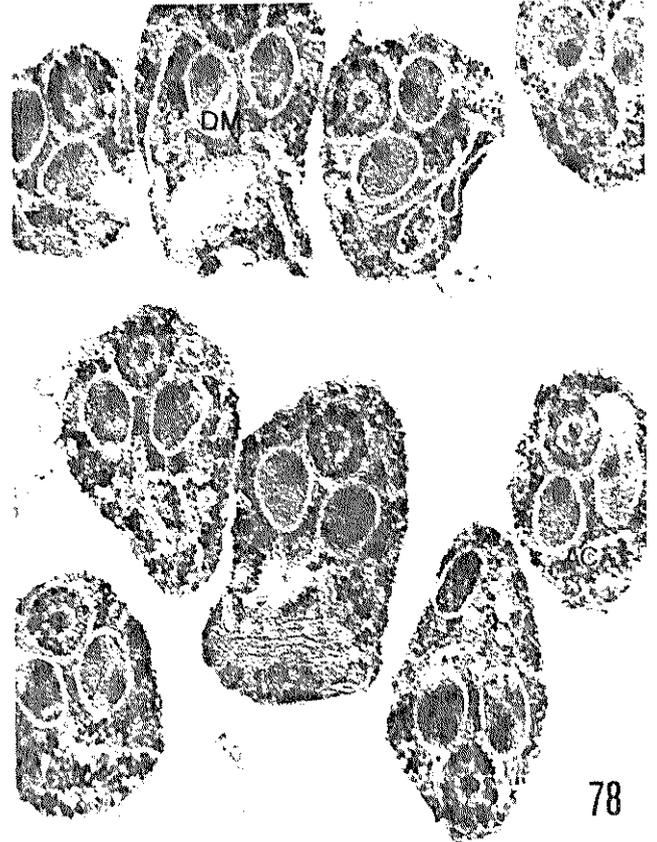
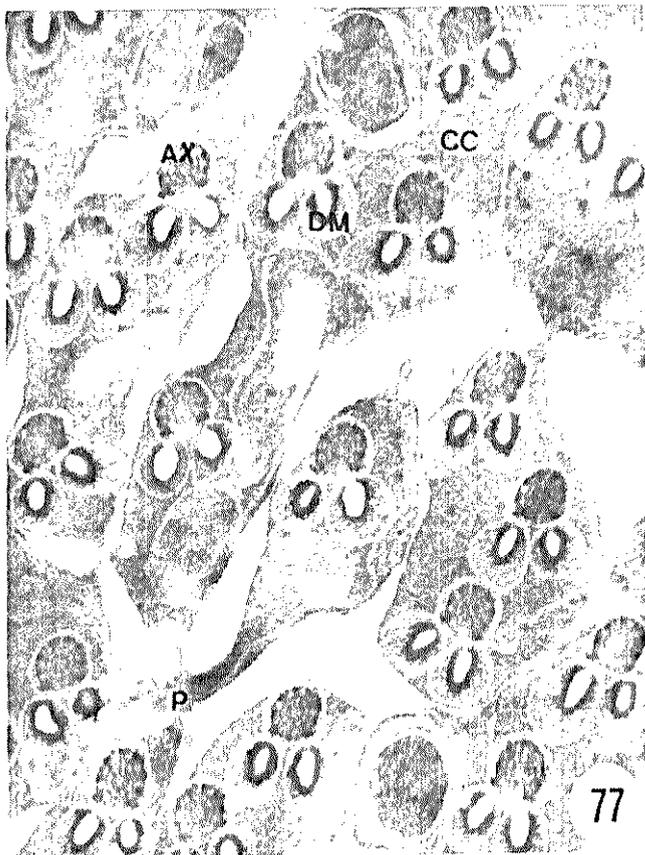
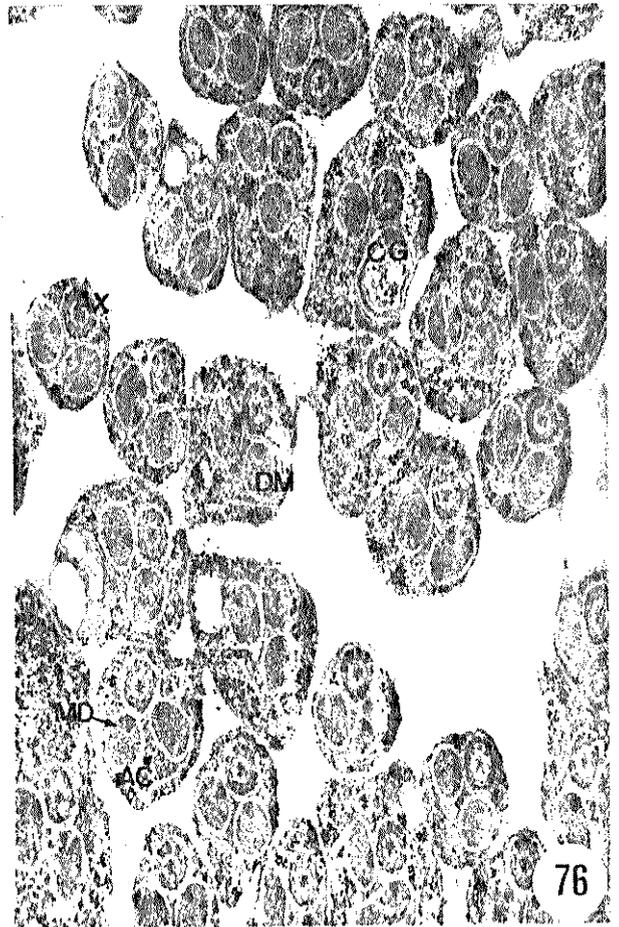
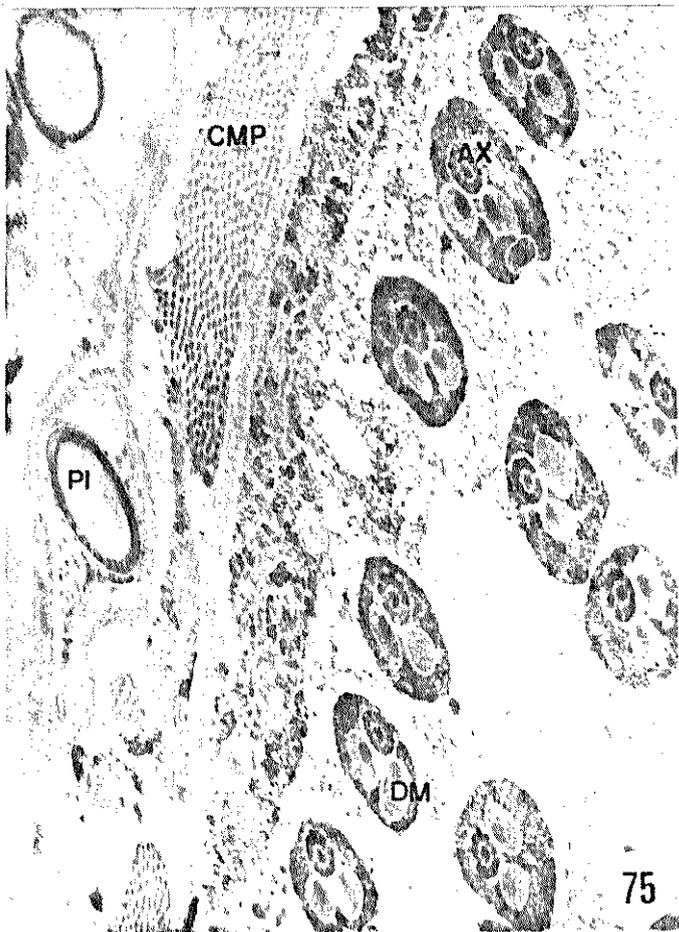
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 75 A 78

FIGURA 75 - Testículo de *Ceratitis capita*
ta com cistos contendo espermátides no estágio 7, cortadas
transversalmente. Material desidratado em EPTA e cortes
não contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: os
grânulos de pigmento (PI) das células da parede do testícu
lo; a camada de células musculares (CMP) da parede do tes
tículo; o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM),
na região da cauda das espermátides. X 25600.

FIGURAS 76 e 78 - Cortes transversais da
região da cauda das espermátides no estágio 6. Material
desidratado em EPTA e cortes contrastados com uranila e
chumbo. As figuras mostram: o axonema (AX); o adjunto
do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais (DM);
o início de deposição de material elétron-denso (MD) em
arranjo paracristalino, nos derivados mitocondriais; e,
possivelmente, vesículas do complexo de Golgi (CG) no cito
plasma. Figura 76, X 28200. Figura 78, X 46700.

FIGURA 77 - Região da cauda de espermáti
des, no estágio 8, cortada transversalmente. Material de
sidratado em EPTA e cortes não contrastados com uranila e
chumbo. A figura mostra: pontes (P) e massas citoplasmá
ticas comuns (CC) entre espermátides; uma área elétron-
-lúcida na região mais interna do material elétron-denso
depositado nos derivados mitocondriais (DM); e o axonema
(AX). X 29100.

52271BC



eléctron-denso; e uma cauda anormal (CA) com dois axonemas. X 53800.

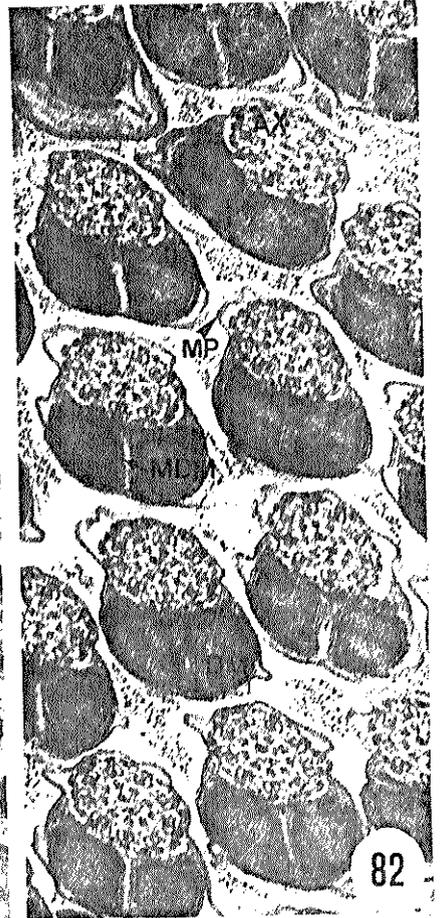
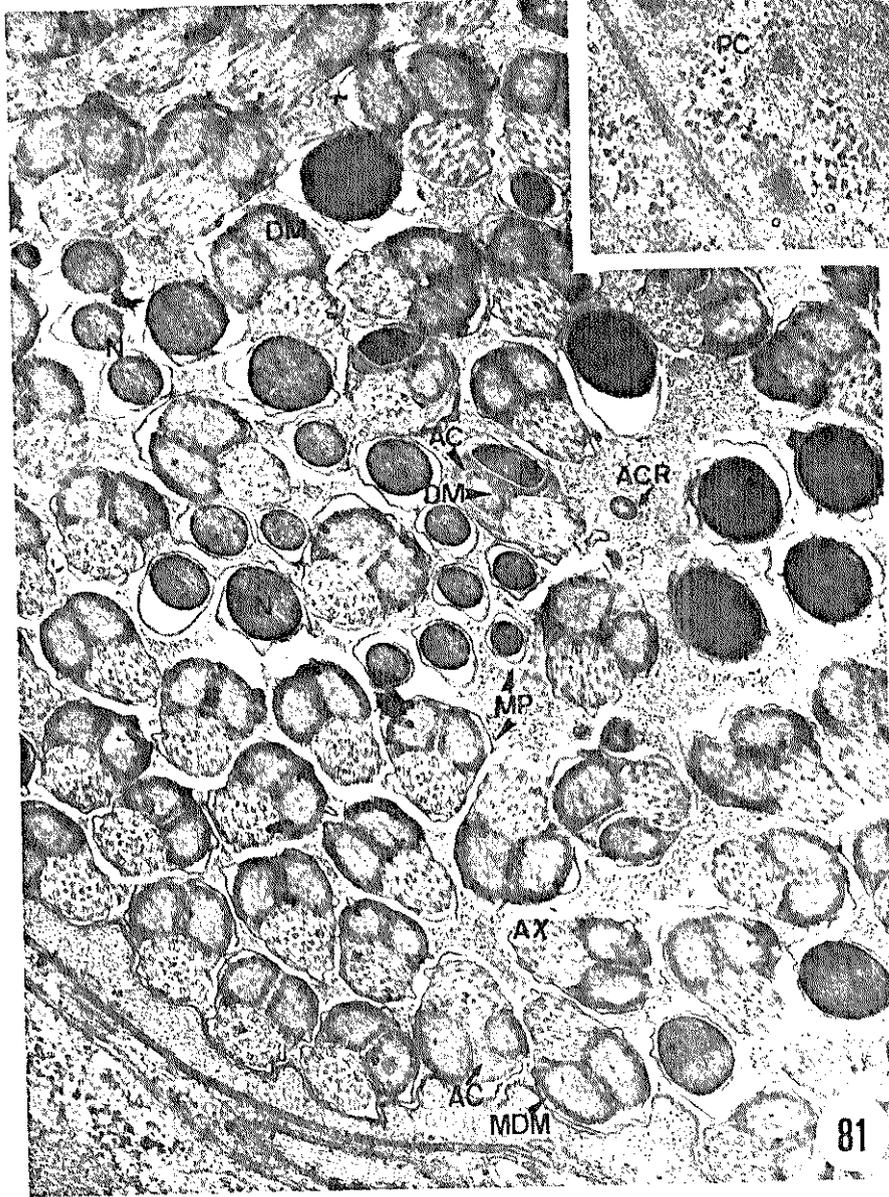
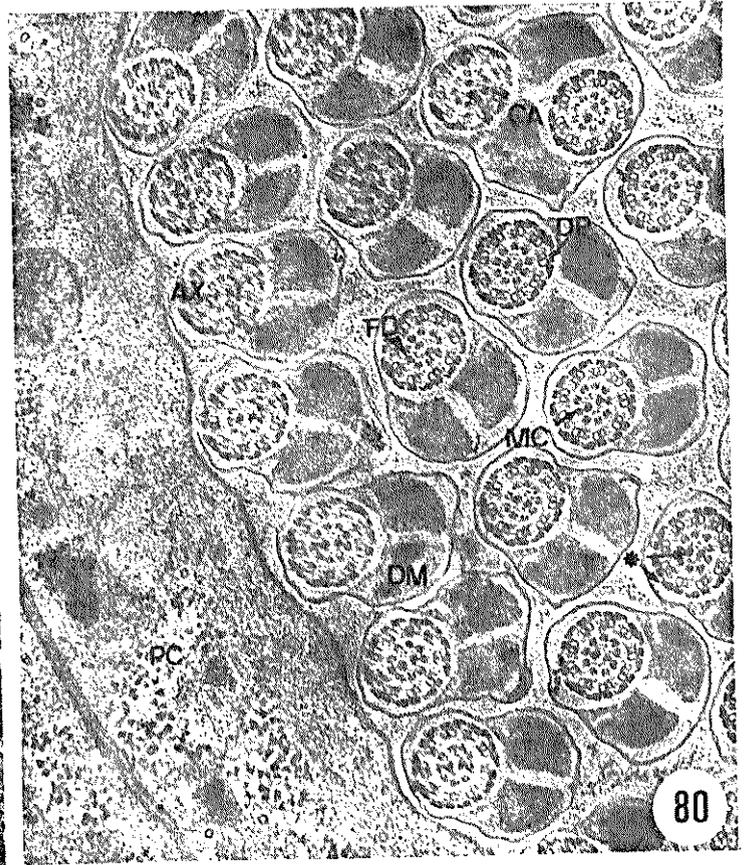
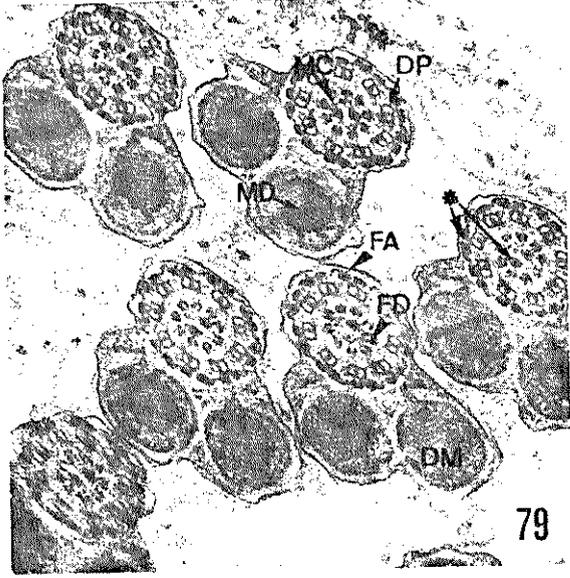
FIGURA 81 - Região da cabeça, região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e região da cauda dos espermatozoides, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o acrosoma (ACR) e o núcleo (N), com cromatina compactada, em diferentes níveis da região da cabeça dos espermatozoides; a região que compreende o final da cabeça e o início da cauda dos espermatozoides com o núcleo e o axonema (AX) e o adjunto do centríolo (AC) e apenas um dos derivados mitocondriais ou com o axonema e o adjunto do centríolo entre os derivados mitocondriais; a região da cauda dos espermatozoides com o axonema e os derivados mitocondriais, estes últimos dotados de membrana (MDM); e a membrana plasmática (MP) das diferentes regiões dos espermatozoides. X 30000.

FIGURA 82 - Corte transversal da região da cauda dos espermatozoides. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o axonema (AX) com todos os seus elementos tubulares e com depósitos de material eléctron-denso; os derivados mitocondriais (DM) providos de membrana (MDM) e totalmente preenchidos por material eléctron-denso; a membrana plasmática (MP) da região da cauda dos espermatozoides. X 52000.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 79 A 82

FIGURA 79 - Corte transversal da região da cauda de espermatídes de *Ceratitis capitata*, no estágio 10. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema com todos os seus elementos tubulares, com o par central de microtúbulos (MC) e as nove fibras acessórias (FA) preenchidos por material elétron-denso (*) e contendo um bastonete, central, de alta densidade eletrônica, e com as fibras elétron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e entre as fibras acessórias; e os derivados mitocondriais (DM) com deposição de material elétron-denso (MD) em arranjo paracristalino. X 70200.

FIGURA 80 - Região da cauda dos espermatozoides cortada transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: a parede do cisto (PC); o axonema (AX), na cauda do espermatozoide, com todos os seus elementos tubulares e com depósitos de material elétron-denso (*) no interior dos dois microtúbulos centrais (MC) e no interior das fibras acessórias, e com as fibras elétron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e entre as fibras acessórias; os derivados mitocondriais (DM) na cauda dos espermatozoides, totalmente preenchidos pelo material



dos mitocondriais (DM) e a desorganização e perda de alguns dos elementos tubulares que compõem o axonema (AX). X 41400.

FIGURA 86 - Corte transversal da região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, e da região da cauda dos espermatozoides. Material desidratado em EPTA e corte não contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: o núcleo (N) electrólúcido e o axonema (AX), ou o núcleo e o axonema e apenas um dos derivados mitocondriais (DM), ou o axonema e o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais, na região que compreende o final da cabeça e o início da cauda, dos espermatozoides; e o axonema e os dois derivados mitocondriais, na região da cauda dos espermatozoides. X 34400.

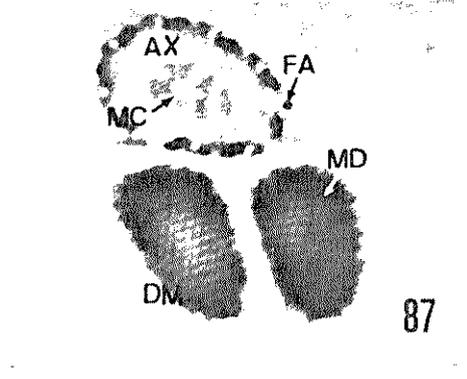
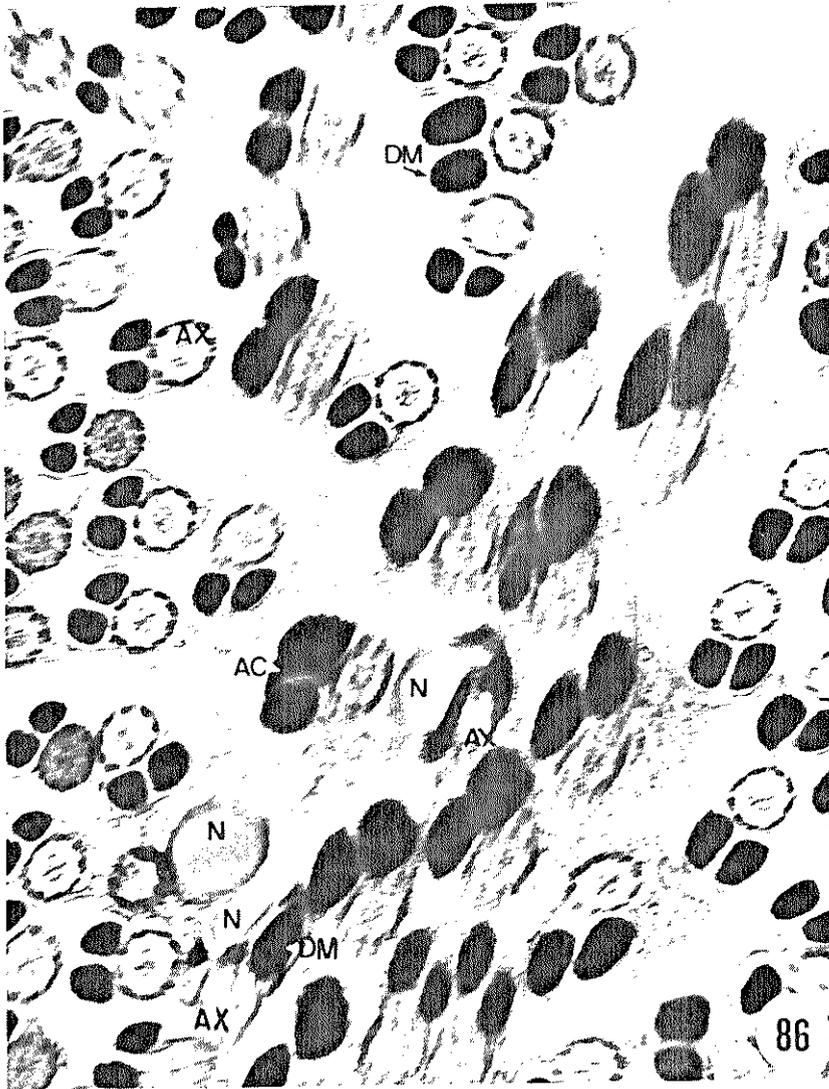
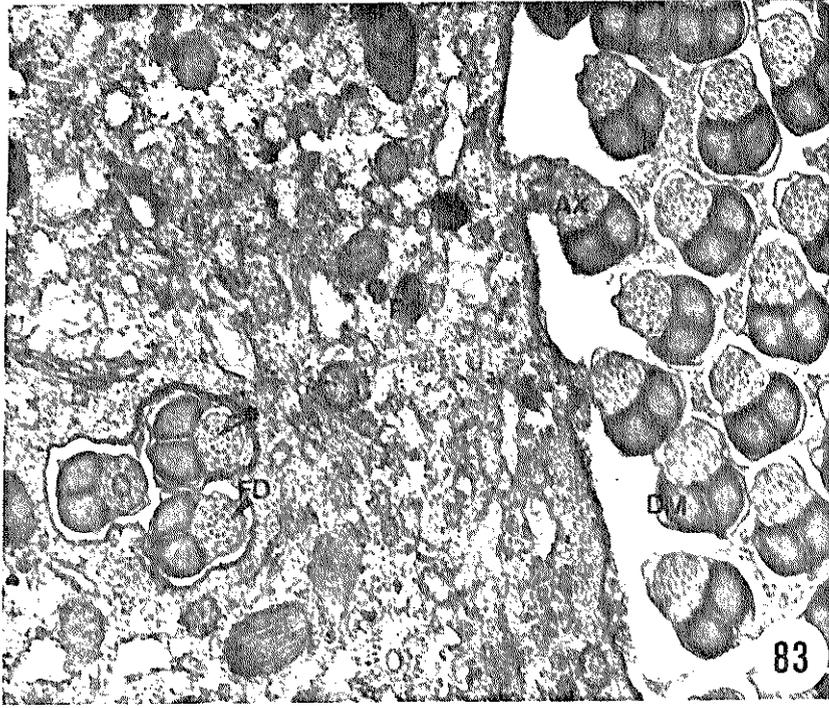
FIGURA 87 - Corte transversal da região da cauda ou flagelo de um espermatozoide. Material desidratado em EPTA e corte não contrastado com uranila e chumbo. A figura mostra: o axonema (AX), onde a luz dos dois microtúbulos centrais (MC) e das nove fibras acessórias (FA) aparece electrólúcida; e os derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material electrólúcido (MD) em arranjo paracristalino. X 91800.

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 83 A 87

FIGURA 83 - Testículos de *Ceratitis capitata* com cisto contendo espermatozóides, cortados transversalmente, na região da cauda. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema (AX) completo com todos os seus elementos tubulares e com depósitos de material eléctron-denso (*) no interior dos dois microtúbulos centrais e no interior das fibras acessórias, e fibras eléctron-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as duplas periféricas de microtúbulos; os derivados mitocondriais (DM) totalmente preenchidos por material eléctron-denso; e as células da parede do cisto (PC). X 24700.

FIGURA 84 - Região final da cauda dos espermatozóides cortada transversalmente. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: a extremidade (E) da cauda dos espermatozóides onde ocorre a terminalização dos derivados mitocondriais (DM), e a desorganização e perda de alguns dos elementos tubulares que compõem o axonema (AX). X 47600.

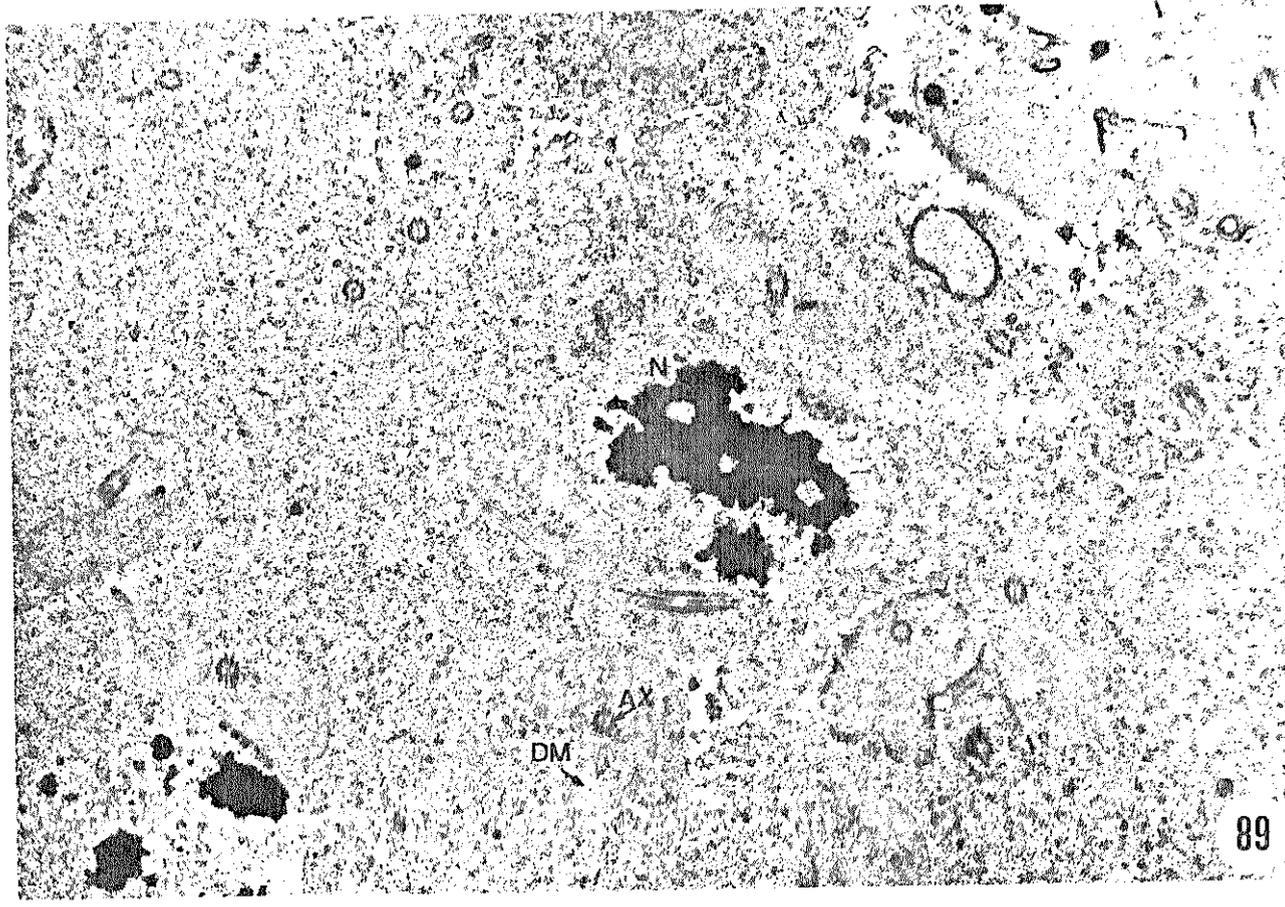
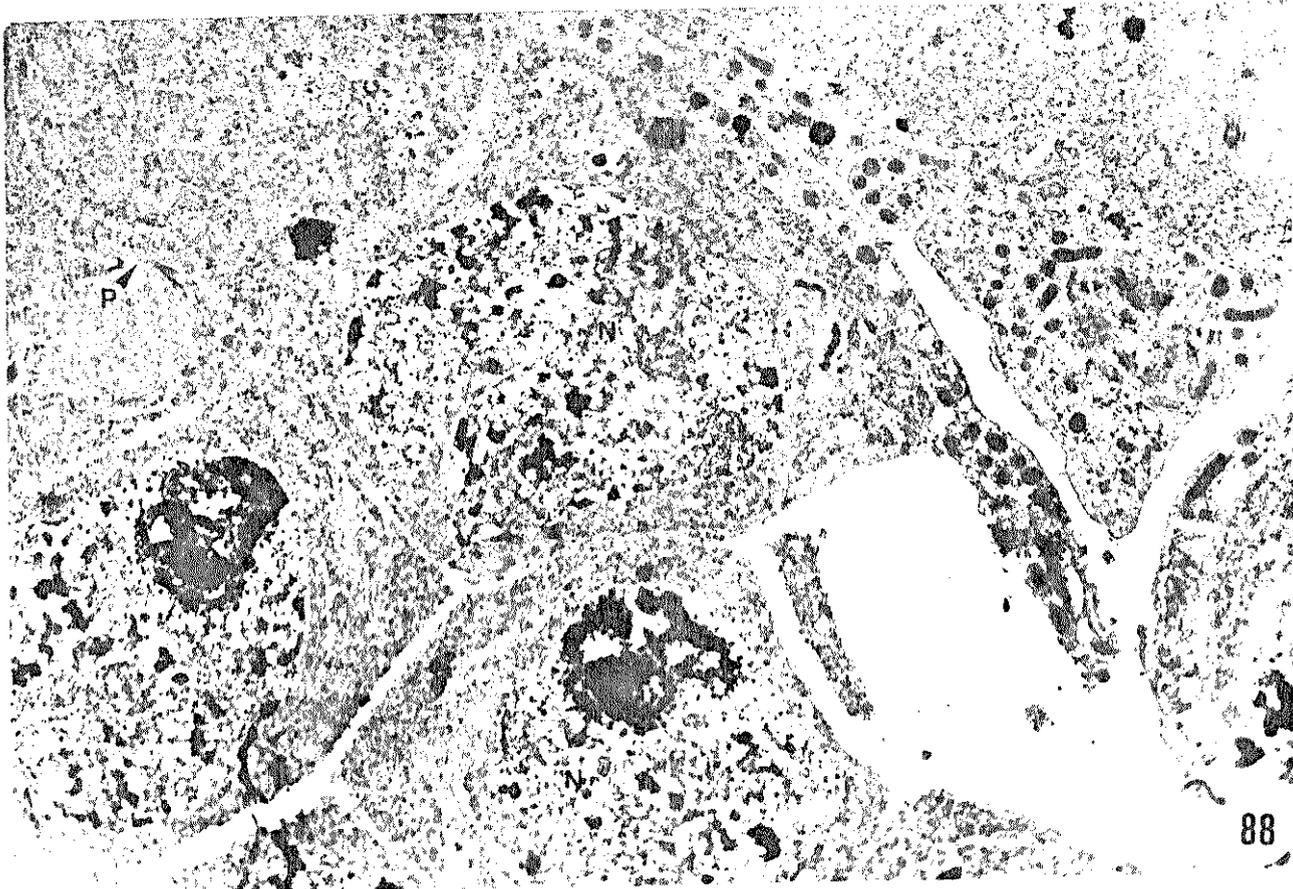
FIGURA 85 - Região final da cauda dos espermatozóides cortada transversalmente. Material desidratado em EPTA e cortes contrastados com uranila e chumbo. A figura mostra: a extremidade (E) da cauda dos espermatozóides onde ocorre a terminalização dos deriva-



EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS 88 E 89

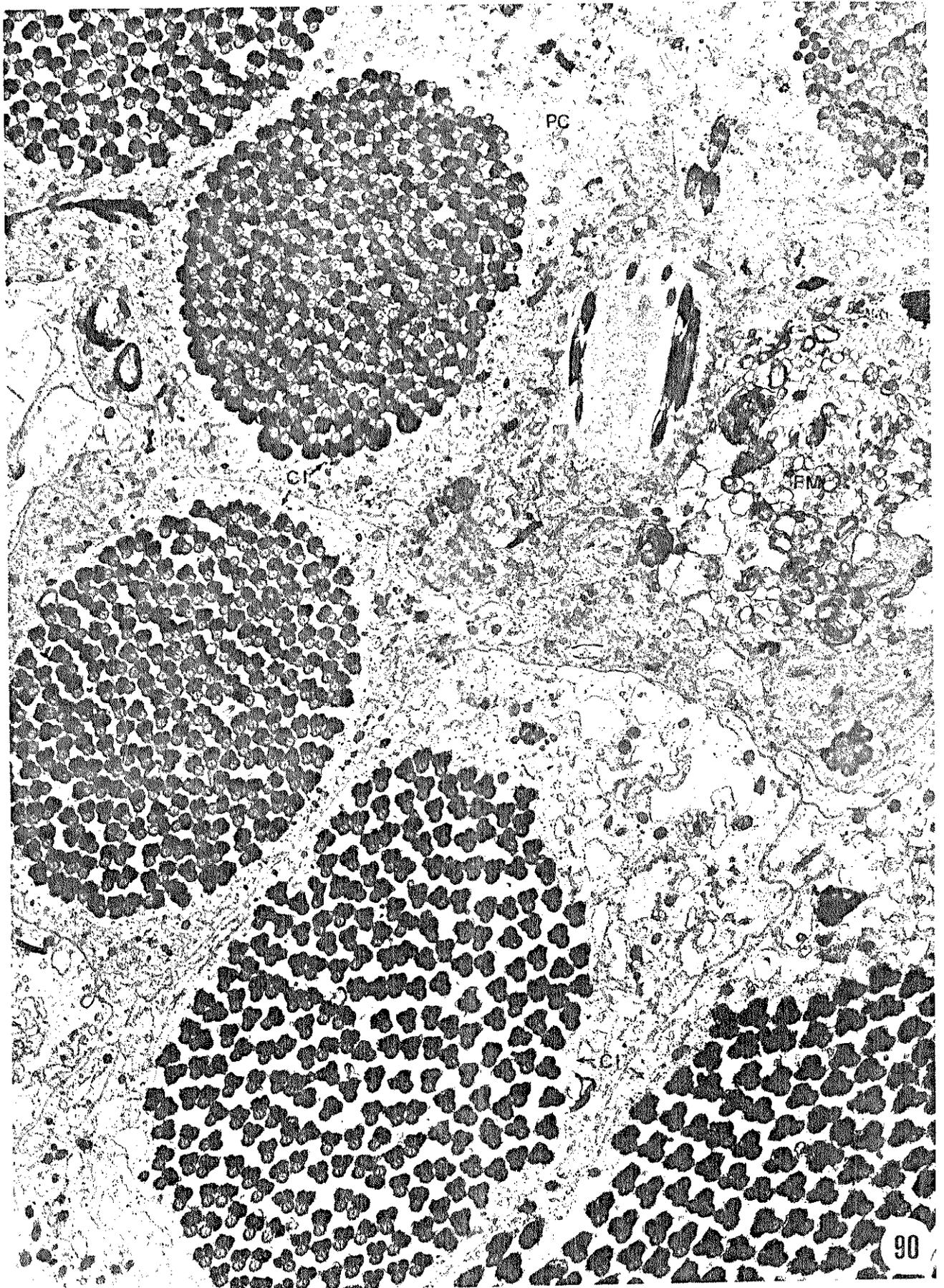
FIGURA 88 - Testículo de *Ceratitis capitata* com cisto contendo as células germinativas. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: uma ponte citoplasmática (P), com membranas plasmáticas espessas, entre células do cisto. X 9500.

FIGURA 89 - Cisto contendo espermátides, no estágio 4, cortadas transversalmente. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o núcleo (N) com áreas de cromatina condensada, e o axonema (AX) ladeado pelos derivados mitocondriais (DM) em formação. X 13500.



EXPLICAÇÃO DA FIGURA 90

FIGURA 90 - Corte de testículo de *Ceratitis capitata* mostrando: os cistos (CI) com espermatozoides; as células que formam a parede dos cistos (PC); e muitas figuras mielínicas (FM). Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio. X 9200.



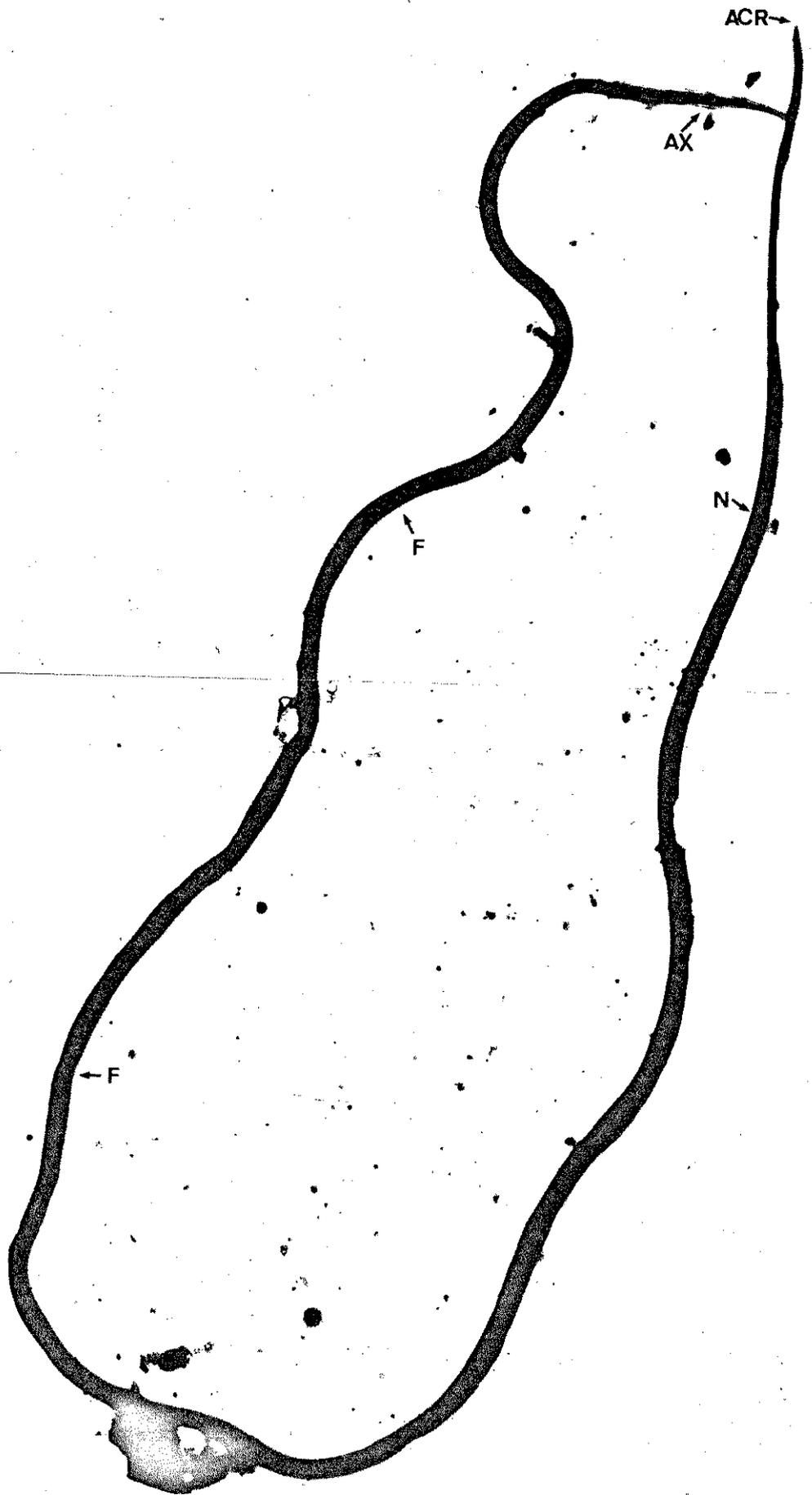
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS 91 E 92

FIGURAS 91 e 92 - Cortes de espermatecas, de fêmeas de *Ceratitís capitata*, contendo espermatozoides. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. As figuras mostram: os espermatozoides dispostos ao acaso e agrupados junto à cutícula (CT) da espermateca; o núcleo (N) que constitui praticamente toda a cabeça dos espermatozoides; o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM), elementos que formam a cauda ou flagelo (F) dos espermatozoides; o adjunto do centríolo (AC) entre os derivados mitocondriais; a região inicial da cauda dos espermatozoides; o material fibrilar (MF) que circunda os espermatozoides no interior da espermateca; e células do tecido adjacente (TA). Figura 91, X 13500. Figura 92, X 36100.



EXPLICAÇÃO DA FIGURA 93

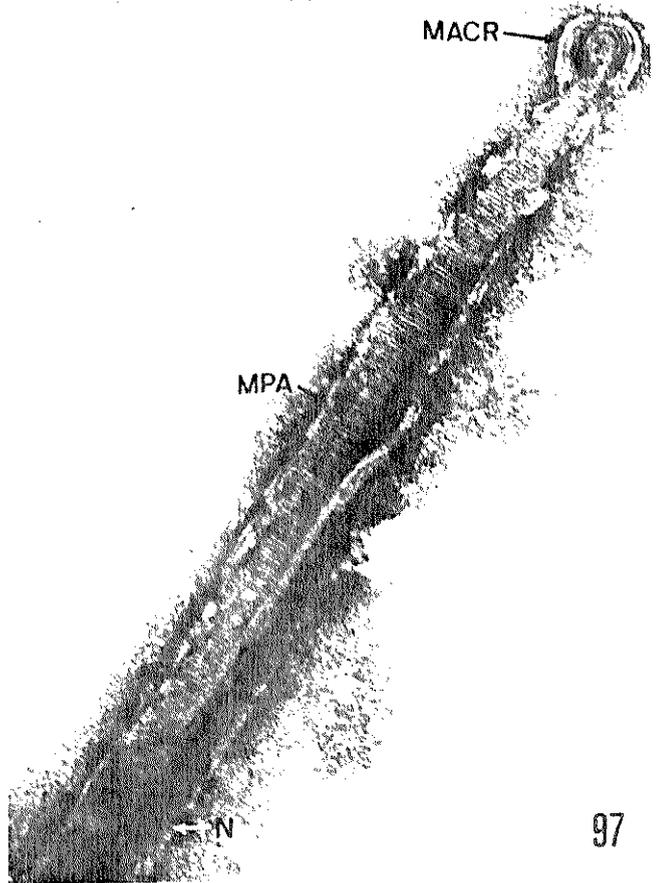
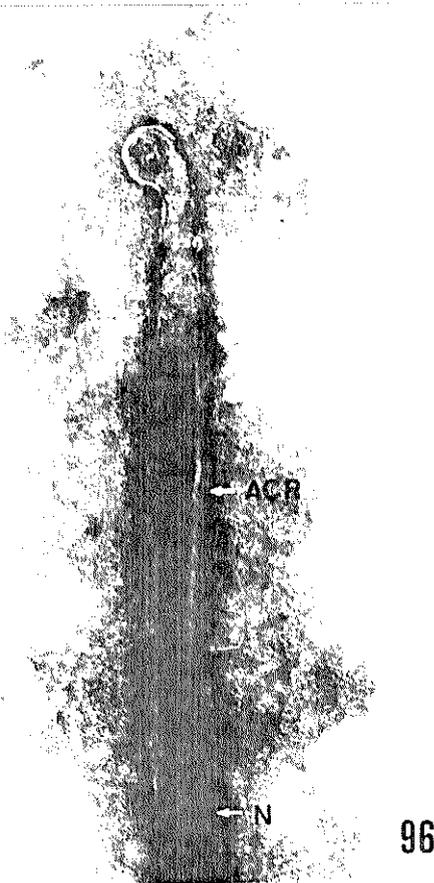
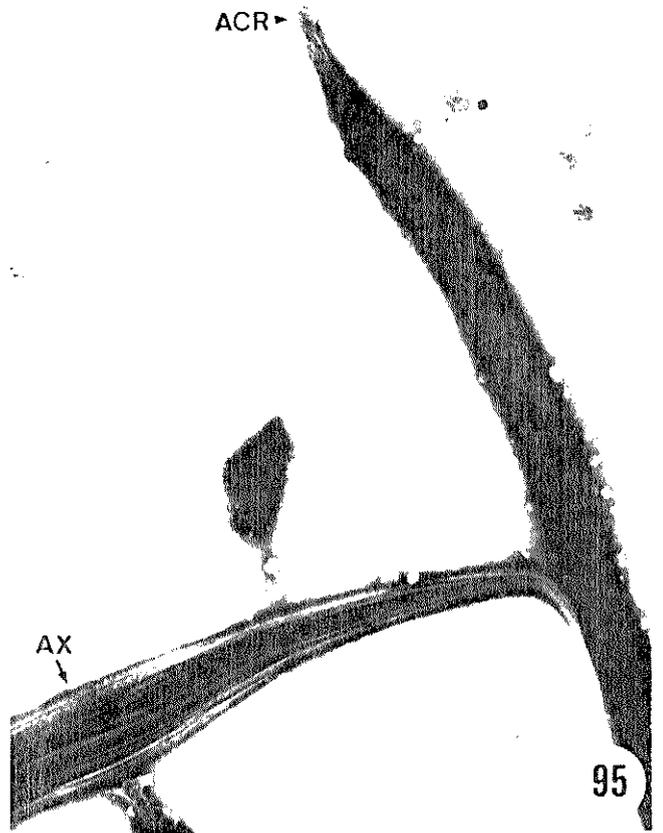
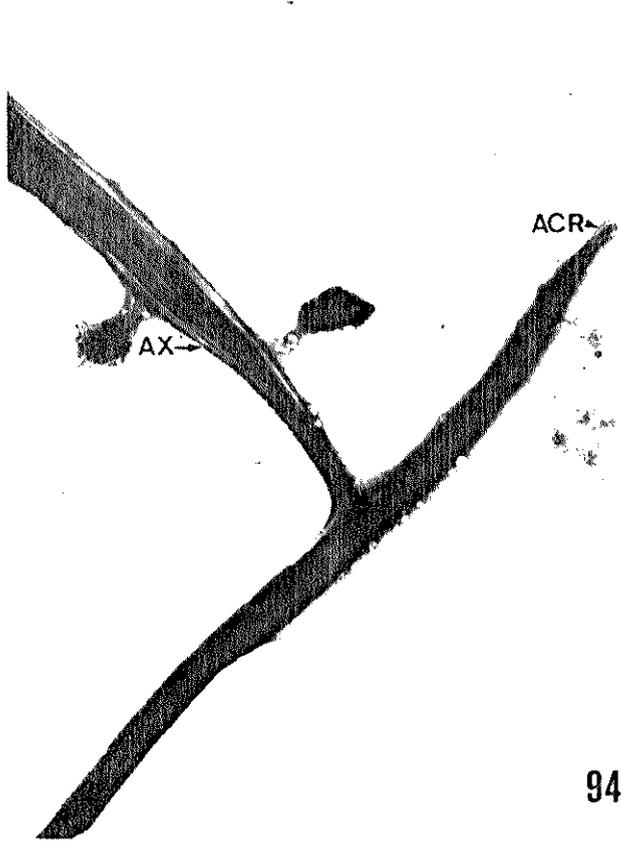
FIGURA 93 - Espermatozóide de *Ceratitidis capitata*. Coloração negativa. A figura mostra: a região da cabeça do espermatozóide formada pelo acrosoma (ACR) e pelo núcleo (N); e a região do flagelo (F) ou cauda do espermatozóide cuja extremidade final é formada apenas pelo axonema (AX), estando ausentes, aí, os derivados mitocondriais. X 4000.



EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 94 A 97

FIGURAS 94 e 95 - Região inicial da cabeça e região final da cauda do espermatozóide de *Ceratitís capitata*. Coloração negativa. As figuras mostram: o acrosoma (ACR) situado anteriormente ao núcleo na cabeça do espermatozóide; e o axonema (AX) que na extremidade final da cauda do espermatozóide não aparece ladeado pelos derivados mitocondriais e apresenta perda paulatina de alguns de seus elementos tubulares. Figura 94, X 12700. Figura 95, X 22000.

FIGURAS 96 e 97 - Região inicial da cabeça do espermatozóide mostrando o acrosoma (ACR), o complexo de membranas que o envolve (MACR), o material em arranjo periódico (MPA) no interior do mesmo, e a região inicial do núcleo (N). Coloração negativa. Figura 96, X 49400. Figura 98, X 81000.

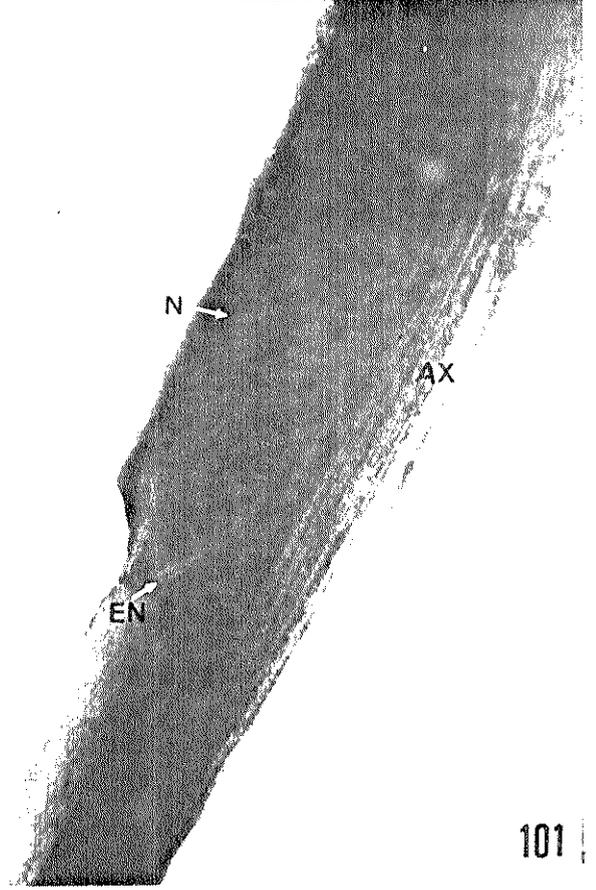
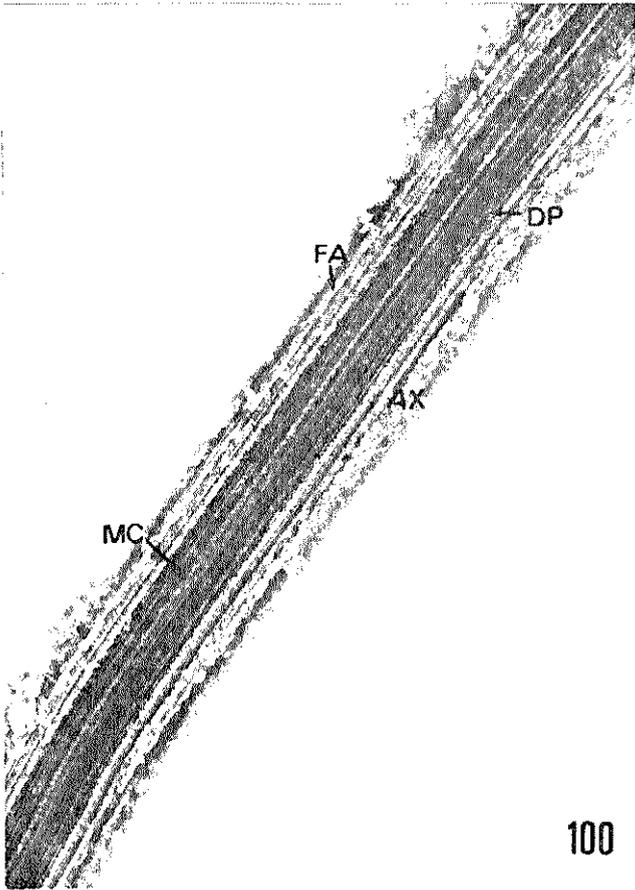
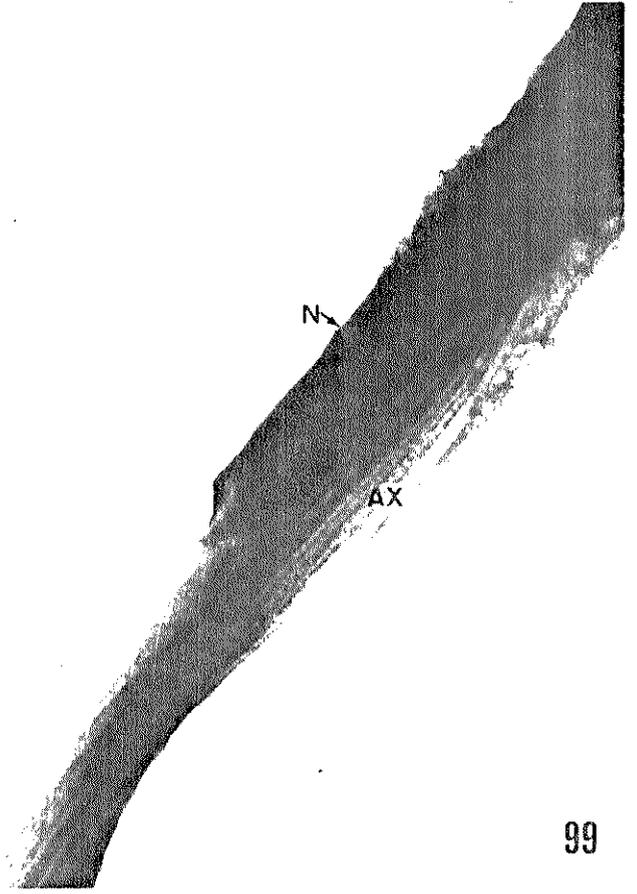
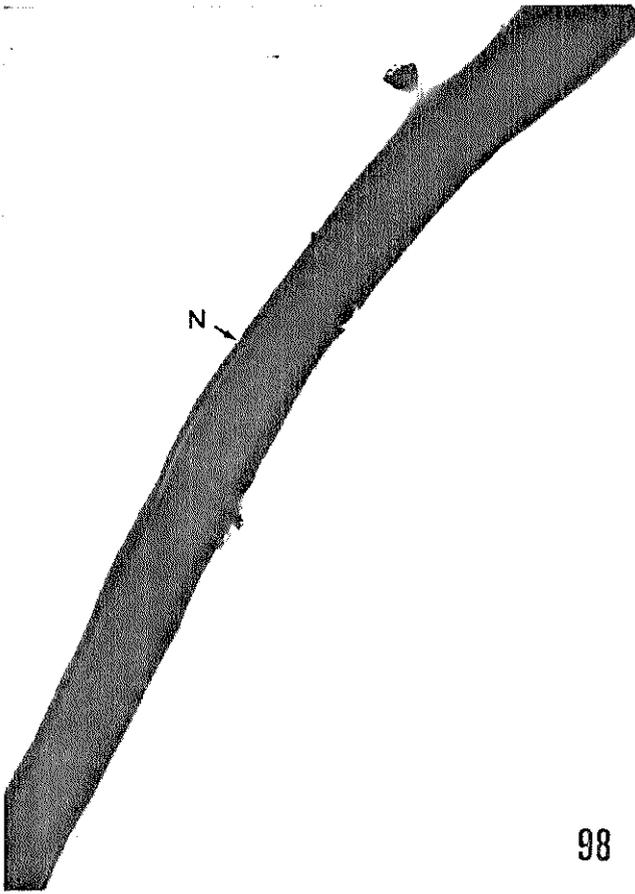


EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 98 A 101

FIGURA 98 - Fragmento da região da cabeça do espermatozóide, de *Ceratitís capitata*, formado pelo núcleo (N). Coloração negativa. X 44600.

FIGURAS 99 e 101 - Fragmento da região que compreende o final da cabeça e o início da cauda do espermatozóide, mostrando a porção inicial do axonema (AX) que se insere no núcleo, e o envoltório nuclear (EN) da extremidade final do núcleo (N). Coloração negativa. Figura 99, X 38800. Figura 101, X 64800.

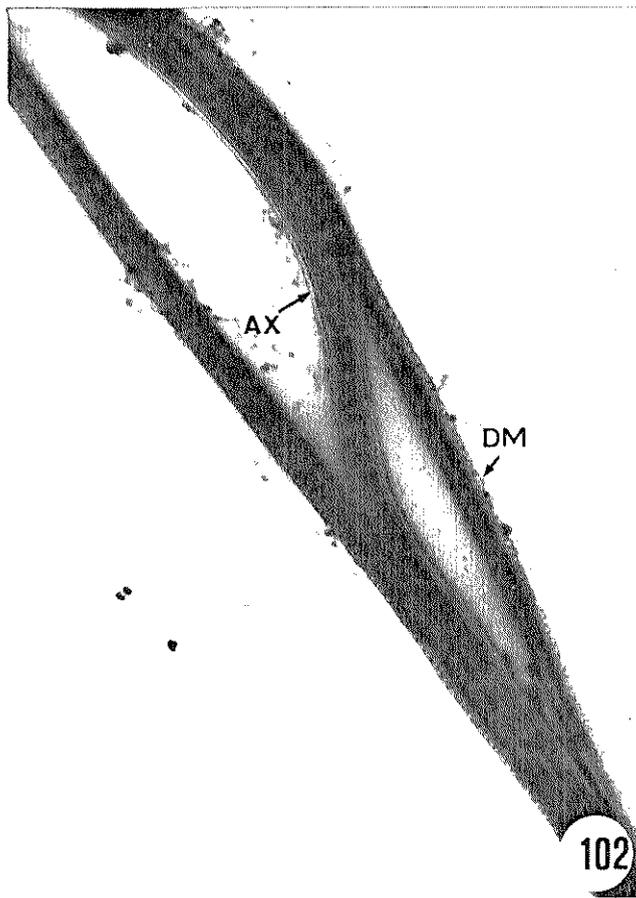
FIGURA 100 - Fragmento do axonema (AX), do espermatozóide, mostrando os elementos tubulares de que é constituído: os microtúbulos centrais (MC), as duplas periféricas de microtúbulos (DP) e as fibras acessórias (FA). Coloração negativa. X 37900.



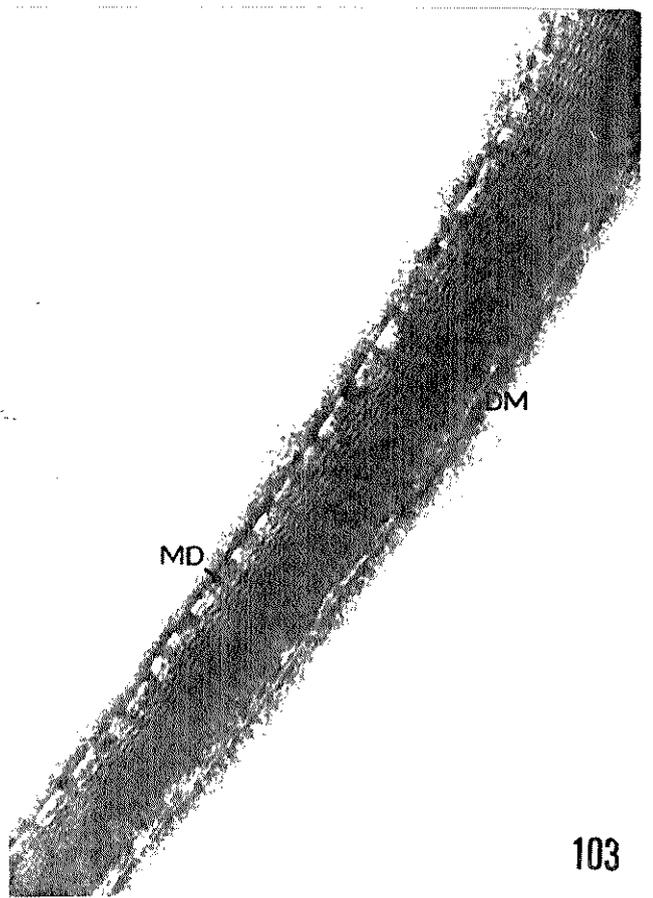
EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 102 A 105

FIGURAS 102 e 104 - Fragmentos da região do flagelo ou cauda dos espermatozoides, de *Ceratitis capitata*, mostrando os elementos que os constituem: o axonema (AX) e os derivados mitocondriais (DM). Coloração negativa. Figura 102, X 12700. Figura 104, X 78300.

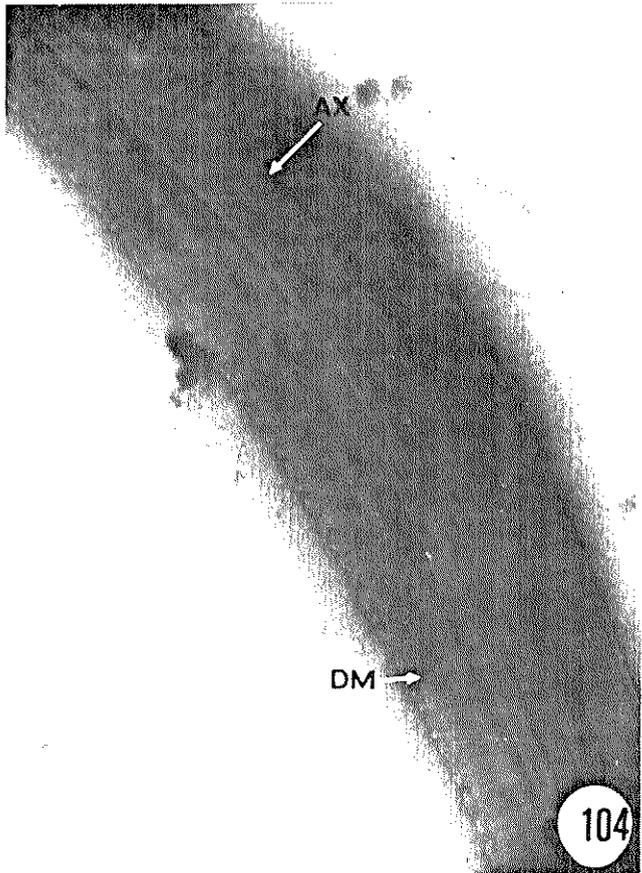
FIGURAS 103 e 105 - Fragmentos dos derivados mitocondriais, dos espermatozoides, totalmente preenchidos por material electrónico-denso (MD) em arranjo para cristalino. Coloração negativa. Figura 103, X 78300. Figura 105, X 181000.



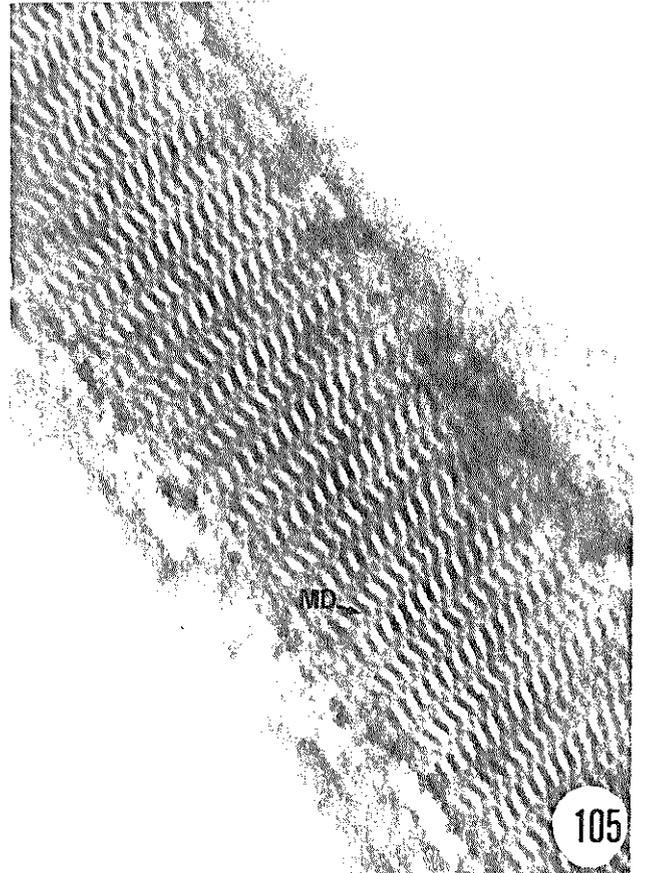
102



103



104



105

EXPLICAÇÕES DAS FIGURAS DE 106 A 109

DETALHES DA FORMAÇÃO DO AXONEMA

FIGURA 106 - Corte transversal da região da cauda de espermátides de *Ceratitis capitata*, no estágio 5. Material pós-fixado em mistura de tetróxido de ósmio e ácido tânico. A figura mostra: o axonema com os dois microtúbulos centrais (MC), com as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e com as fibras acessórias (FA) em formação; os derivados mitocondriais (DM) rodeados por microtúbulos (MT), e com deposição de material electrónico-denso (MD). X 138900.

FIGURA 107 - Corte transversal da região da cauda de espermátides no estágio 6. Material fixado em glutaraldeído e pós-fixado em tetróxido de ósmio. A figura mostra: o axonema com todos os seus elementos tubulares [os dois microtúbulos centrais (MC), as nove duplas periféricas de microtúbulos (DP) e as nove fibras acessórias (FA)], e com início da formação das fibras electrónico-densas (FD) entre os microtúbulos centrais e as duplas periféricas de microtúbulos e entre as fibras acessórias; os derivados mitocondriais (DM) rodeados por microtúbulos (MT) e com deposição de material electrónico-denso (MD) em arranjo paracristalino. X 138900.

FIGURA 108 - Corte transversal da região da cauda de espermátides no estágio 10. Material fixado

