

"CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DE ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRENES DE *Alabama argillacea* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE), AO NÍVEL DO TESTÍCULO E DAS VIAS GENITAIS DOS IMAGOS MACHO E FÊMEA ATÉ A ESPERMATECA".

Empréstimo Proibido

MARÍLIA MEDEIROS

"CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DE ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRENES DE *Alabama argillacea* HÜBNER, 1818 (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE), AO NÍVEL DE TESTÍCULO E DAS VIAS GENITAIS DOS IMAGOS MACHO E FÊMEA ATÉ A ESPERMATECA".

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

Prof<sup>a</sup> Dra. Mary Anne Heidi Dolder  
- Orientadora de Tese e Programa -

Departamento de Biologia Celular

Instituto de Biologia

UNICAMP

1986

## AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pela sua amizade, compreensão e orientação que contribuíram sobremaneira para a consecução do presente trabalho;
- Às Prof<sup>as</sup>. Dras. Carminda da Cruz-Landim (UNESP), Maria Alice da Cruz-Höfling (UNICAMP) e Marina Silveira (USP), pela análise crítica do manuscrito da Tese e pelas sugestões que conduziram ao aprimoramento do mesmo;
- Aos professores do Departamento de Biologia Celular (UNICAMP) que me auxiliaram de alguma forma na ampliação e sedimentação de conhecimentos relacionados direta e/ou indiretamente com meu trabalho;
- Aos colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular, bem como aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia (UNICAMP), pela amizade e colaboração com as quais me distinguiram;
- À funcionária Maria Tereza de Paula, pelo seu indispensável e prestimoso auxílio no processamento de cópias fotográficas;
- Ao Prof. Carlos Fernando Salqueirosa de Andrade, do Departamento de Zoologia (UNICAMP), pelo interesse e pela ajuda na coleta de espécimes e fotografiação dos aparelhos reprodutores de imagos de *Alabama argillacea*;

- Aos Profs. Antônio D'Acampora e Rogério Gargioni, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela sua desprendida e indispensável colaboração ao assumirem parcialmente minha carga de ensino no 1º semestre do corrente ano;
- Ao biólogo e artista plástico Sérgio Stähelin, pela valiosa colaboração na confecção de desenhos esquemáticos de alto nível técnico;
- À Sra. Sandra Nardini Correa da Silva e ao Sr. Airton Silva, pelos excelentes serviços de datilografia;
- À dedicada colega e amiga Irani Quagio Grassiotto, por sua colaboração e sincera amizade;
- À minha mui querida mãe e aos queridos irmãos Rosamaria e Gilberto, pelo apoio constante, pela compreensão e amizade que nos une;
- A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

"A verdade não é filha da simpatia,  
mas da discussão".

Gaston Bachelard

Dedico aos meus filhos,

*Carlos José, Carla & Carolina.*

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	p.	1
REVISÃO DA LITERATURA .....	p.	4
MATERIAL E MÉTODOS .....	p.	20
RESULTADOS		
I. Morfologia dos aparelhos reprodutores masculi <u>n</u> o e feminino de <i>A. argillacea</i> Hb.....	p.	31
II. Caracterização ultra-estrutural de espermato <u>z</u> óides eupirenes e apirenes intra- testicula- res.....	p.	35
III. Desenhos esquemáticos de espermatozóides eupi <u>z</u> óides e apirenes intra-testiculares.....	p.	53
IV. Resultados obtidos com vermelho de rutênio...	p.	56
V. Espermatozóides eupirenes e apirenes extra- testiculares ao nível do trato genital mascu <u>l</u> ino.....	p.	56
VI. Espermatozóides eupirenes e apirenes ao nível da bursa copulatrix e espermateca de imagos fêmeas.....	p.	62
DISCUSSÃO .....	p.	67
RESUMO.....	p.	104
SUMMARY .....	p.	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	p.	110

VOLUME I

TEXTO

## INTRODUÇÃO

O lepidóptero *Alabama argillacea* Hübner (1818) é um inseto holometábolo, do grupo dos Pterigota, que pertence à sub-ordem Frenatae (Heteroneura), Super-Família Noctuoidea, Família Noctuidae e sub-família Hermeniinae (COMSTOCK, 1972 - apud HABIB, 1976). Sua larva fitófaga, conhecida pela sua voracidade e denominada popularmente de "curuquerê", é considerada como uma das pragas secundárias que atacam os algodoeiros das regiões neotrópicas, podendo desfolhar totalmente as plantações e, conseqüentemente, comprometer seriamente a cultura algodoeira (HABIB, 1976, 1977, 1978; ANDRADE, 1981). No Brasil, é considerada como praga de algodoeiro desde 1578 (CALCAGNOLO, 1965 - apud HABIB, 1977 e ANDRADE, 1981).

Esse inseto peste já foi considerado como uma das maiores e mais importantes pragas de algodoads, mas após a 2ª Guerra Mundial, com o uso de inseticidas organo-sintéticos, houve significativa diminuição no surgimento de infestações danosas de *A. argillacea*, como reportam vários autores de 1962 a 1968, citados por HABIB (1976) e ANDRADE (1981).

Na região de Campinas, São Paulo, já era conhecida como uma constante ameaça, na estação chuvosa, desde 1939 (HAMBLETON - apud ANDRADE, 1981). Costuma aparecer entre novembro e dezembro, sendo que em janeiro e fevereiro, períodos das 2ª e 3ª gerações, os níveis de ataque da praga podem se tornar intensos, exigindo repetidas medidas de controle para que os danos às culturas de algodão não se tornem maiores.

Sobre a origem das erupções periódicas de *A. argillacea* e o modo pelo qual a mesma se mantém ou reaparece anualmente, nas várias regiões algodoeiras dos países americanos, há vários trabalhos publicados de 1936 a 1969, citados por HABIB (1976, 1977, 1978) e ANDRADE (1981), que consideram a América Central e o norte da América do Sul como centros de manutenção e migração de *A. argillacea*. Esta se desenvolve sobre plantações silvestres de algodão (*Gossypium sp.*), de onde as mariposas migram anualmente em gerações sucessivas, em diferentes direções, com o advento da estação chuvosa. O hábito migratório é considerado como principal fator pelo não desenvolvimento de resistência dessa praga a inseticidas químicos (ANDRADE, 1981).

O único modo de controle dessa praga, atualmente empregado, é o uso de inseticidas químicos que provocam efeitos colaterais danosos ao meio-ambiente, segundo diversos autores citados por HABIB (1976, 1977) e ANDRADE (1981). Contudo, como há crescente consciência da necessidade de utilização de novos métodos de controle de pragas que permitam maior segurança, economia e menores efeitos colaterais desvantajosos ao ambiente, HABIB (1976, 1977) prevê que a *A. argillacea* poderá voltar a ser uma das maiores pragas da cultura algodoeira no Brasil, em função do abandono gradual de inseticidas químicos. Como diz HABIB (1976), a aplicação de métodos mais recentes de controle de pragas, exige ainda inúmeros "estudos detalhados e profundos, tanto biológicos quanto morfológicos da espécie cujo controle é desejado". Os poucos trabalhos publicados a respeito de *A. argillacea* tratam apenas de biologia não detalhada, morfologia externa, migração de adultos, origem das infestações

e controle químico, segundo várias publicações datadas de 1935 a 65, citadas por HABIB (1976), que também realizou estudos biológicos e anatômicos sobre a referida espécie e considera ser ainda necessário realizar inúmeros estudos a respeito da mesma.

Com o intuito de contribuir com novos conhecimentos a respeito da anatomia macro e microscópica de indivíduos machos e fêmeas de *Alabama argillacea*, que possam servir de base para posteriores trabalhos relacionados, direta e/ou indiretamente, com o controle biológico desse lepidóptero praga, realizamos um estudo prévio da morfologia dos aparelhos reprodutores masculino e feminino, ao qual seguiu-se uma análise detalhada da estrutura ultra-microscópica de espermatozoides eupirenes (típicos) e apirenes (atípicos) intra e extra-testiculares, ao nível dos tratos genitais de imagos machos e fêmeas.

## REVISÃO DA LITERATURA

Os espermatozoides dos animais, em geral, são células altamente especializadas, verdadeiros modelos de diferenciação celular extrema, as quais passaram por uma evolução morfológica que não tem paralelo em outros tipos celulares. Algumas de suas características estruturais estão relacionadas com seu papel terminal na fertilização, enquanto que outras ou têm causas evolutivas ou são ainda objeto de estudos especulativos a respeito (PHILLIPS, 1974, BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

Há enormes variações interespecíficas na própria morfologia dos espermatozoides e estudos comparativos que têm basicamente evidenciado tal fato, consideram que "espermatozoides de duas espécies animais podem ser semelhantes na forma, mas nunca são exatamente iguais" (BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

O fato de os espermatozoides serem, freqüentemente, muito pequenos, poderem ser obtidos em grande número e terem um alto grau de organização, favorece igualmente o estudo de sua ultra-estrutura (BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

Os espermatozoides que pertencem a filos animais que evoluíram definitivamente para a vida terrestre e que, por conseguinte, apresentam *fertilização interna* como na maioria dos anelídeos, moluscos, artrópodos e vertebrados, são células muito evoluídas e denominadas genericamente de *espermatozoides modificados*, em comparação com o tipo *primitivo*, típico de grupos de animais de fertilização externa (FRANZÉN,

1955 - apud FRANZÉN, 1970; FAVARD & ANDRÉ, 1970; BACCETTI, 1972; ANDERSON & PERSONNE, 1973; BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

Na maioria das espécies dos *insetos*, que alcançaram, entre os Arthropoda, o mais alto grau de adaptação à vida terrestre, com modos muito flexíveis de fertilização interna, os espermatozóides são do tipo *modificado* que evoluíram no sentido de aumentar sua motilidade, através de diferenciações sofridas na sua forma filamentosa, na cabeça muito a longada, no complexo acrosomal e nas mitocôndrias muito modi ficadas que flanqueiam o longo flagelo (BACCETTI, 1972; BACCETTI & AFZELIUS, 1976; DALLAI & AFZELIUS, 1980).

Ao contrário dos mamíferos, o processo de produção de espermatozóides (espermatogênese) nos insetos ocorre nos folículos testiculares, no interior de *cistos* (espermatocistos), que consistem em sacos formados por células epiteliais, no interior dos quais se desenvolvem as células germinativas por meio de divisões sincrônicas (CARSON, 1945 - apud GARBINI & IMBERSKI, 1977; SADO, 1963; VIRKKI 1963, 1969; HANNAH-ALAVA, 1965 - apud DUMSER, 1980; PHILLIPS, 1970 a,b, 1971, 1974; HOLT & NORTH, 1970; BACCETTI, 1972).

De acordo com os trabalhos de SADO (1963), que estudou a espermatogênese em *Bombyx mori* e de HANNAH - ALAVA (1965 - apud GARBINI & IMBERSKI, 1977) o desenvolvimento dos *espermatocistos* pode ser subdividido em 7 diferentes estágios, a saber: (1) espermatogônias pré-definitivas ou primárias; (2) espermatogônias definitivas ou secundárias; (3) espermatócitos primários; (4) espermatócitos secundários; (5) espermátides; (6) espermátides em alongamento (7) espermatozóides. As *espermatogônias pré-definitivas* se desenvolvem ao re-

dor de uma célula apical localizada no *germarium* existente na porção distal de cada folículo testicular. Quando uma espermatogônia pré-definitiva (não encistada) deixa o germarium e se associa a células somáticas, forma-se então um espermatocisto e a espermatogônia, agora encistada, denomina-se de definitiva. Iniciam-se, a seguir, divisões sincrônicas das quais resultam os espermatócitos primários que, por sua vez, passam pelas 2 divisões sucessivas da meiose, (divisões de maturação), resultando num espermatocisto com um feixe de espermátides, as quais sofrem profundas alterações morfo-funcionais no decorrer de um processo designado espermiogênese, do qual resulta um cisto com espermatozóides orientados paralelamente, cabeça com cabeça, cauda com cauda (SADO, 1963; HANNAH-ALAVA, 1965 apud VIRKKI, 1963 a,b, 1969, 1973; HOLT & NORTH, 1970; PHILLIPS, 1970 a,b, 1971; BACCETTI 1972; GARBINI & IMBERSKI, 1977; DUMSER, 1930).

Quanto ao número de espermátides e/ou espermatozóides por cisto, VIRKKI (1969, 1973) e PHILLIPS (1970 a,b, 1971, 1974) afirmaram que é muito constante e espécie-específico, sendo basicamente determinado pelo número de mitoses sincrônicas das espermatogônias definitivas, mais as 2 divisões meióticas dos espermatócitos e expresso como  $2^n$ , no qual "n" é usualmente igual a 5, 6, 7 e 8. Os mesmos autores destacam que o número típico de espermátides ou espermatozóides por cisto, para a maioria dos Lepidoptera e também Coleoptera é igual a 256 ( $2^8$ ). VIRKKI (1973) realizou estudos específicos relacionados com a evolução do número de espermatozóides por cisto, em insetos de vários grupos (Odonata, Orthoptera, Heteroptera, Homoptera, Neuroptera, Coleoptera, Lepidoptera e

Diptera), citando que apenas em *Tischleria* (Lepidoptera) encontrou 128 ( $2^7$ ) espermatozoides por cisto e que nunca foram observados números superiores a 512 entre os insetos holometábolos (insetos com metamorfose completa). Desse trabalho, VIRKKI concluiu que os insetos evoluídos tendem a ter menos espermatozoides por cisto que os mais primitivos, o que possivelmente, reflete uma redução geral na produção de espermatozoides, a qual poderia limitar a variabilidade genética no sentido de auxiliar as populações a adaptarem-se a nichos muito específicos.

Nos lepidópteros, mariposas e borboletas, formam-se, concomitantemente nos testículos, 2 tipos bem diferenciados de cistos: os *eupirenes* que contêm espermatozoides nucleados típicos e os *apirenes* com espermatozoides anucleados atípicos, já descritos, desde o início desse século, num estudo comparado em *Pygaera bucephala*, por MEVES (1903 - apud ZYLBERBERG, 1963, 1969; VIRKKI, 1963; YASUZUMI & ŌURA, 1964; FAIN-MAUREL, 1966; FRIEDLÄNDER & WAHRMAN, 1970, 1971; RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977; LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979; FRIEDLÄNDER & BENZ, 1981, 1982; FRIEDLÄNDER, JANS & BENZ, 1981; FRIEDLÄNDER & HAUSCHTECK-JUNGEN, 1982 a, b e FRIEDLÄNDER, 1983).

De acordo com FAIN-MAUREL (1966), que elaborou uma detalhada revisão a respeito de espermatogênese atípicas em diversos grupos de invertebrados (Tubelários, Rotíferos, Moluscos e Insetos), a maioria dos trabalhos a respeito da dupla espermatogênese e conseqüente dimorfismo de espermatozoides de Lepidoptera, foram desenvolvidos sobretudo entre 1903

e 1930, a partir de observações em microscopia de luz. Contudo, a partir da década de 1960, principalmente, em função do gradual e contínuo desenvolvimento, bem como comercialização dos microscópios eletrônicos, foram sendo publicados inúmeros trabalhos de natureza ultra-estrutural a respeito da espermatoogênese dicotômica de lepidópteros.

Concomitantemente, diversos outros trabalhos baseados em observações de microscopia de luz foram sendo publicados, associados ou não a análises cito-químicas e/ou ultra-estruturais. SADO (1963) estudou, em nível de microscopia de luz e eletrônica, a espermatoogênese de *Bombyx mori* L. (Bombycidae), com o intuito adicional de verificar a indução de esterilidade nos machos por meio de raios-X. Relatou, o cita do autor, a existência de espermatozoides eupirenes e apirenes no testículo, em cistos diferentes distribuídos ao acaso. Posteriormente, PHILLIPS (1971) e LEVIATAN & FRIEDLÄNDER (1979) ao descreverem a organização de espermatozoides em espécies diferentes de lepidópteros, observaram também a distribuição dos espermatozoides eupirenes e apirenes em cistos diferentes.

Diversos outros trabalhos publicados subsequentemente ao de SADO (1963), em microscopia de luz e/ou eletrônica, demonstraram que todos os lepidópteros analisados apresentavam um padrão semelhante de distribuição de cistos no curso da espermatoogênese dicotômica: VIRKKI (1963) em *Diatraea saccharalis* (Crambidae) e em *Bombyx mori* (1969); ZYLBERBERG (1963, 1969) em *Pieris brassicae*; HOLT & NORT (1970) em *Trichoplusia ni* (Noctuidae); PHILLIPS (1971) em diversas espécies; FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1970, 1971) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) que eluci

daram o padrão geral da espermatogênese atípica em *B. mori*; GARBINI & IMBERSKI (1977) em *Ephestia kühniella*; FRIEDLÄNDER & MIESEL (1977) em *Ephestia cautella*; LEVIATAN & FRIEDLÄNDER (1979) em *Ectomyelois ceratoniae*; FRIEDLÄNDER, JANS & BENZ (1981) em *Actias selene* (Saturnidae); FRIEDLÄNDER & HAUSCHTECK JUNGEN (1982 a,b) *Laspeyresia pomonella* (Tortricidae) e FRIEDLÄNDER (1983) em diversas espécies de mariposas.

Contudo, há trabalhos detalhados ao nível de microscopia de luz, que descrevem a organização testicular e o processo de espermatogênese em Lepidoptera, como o de CHAUDHURY & RAUN (1966) em *Ostrinia nubilalis*, o de SHEN & BERRYMAN (1967) em *Rhyacionia buoliana* e do GELBIČ & METWALLY (1981) em *Spodoptera littoralis*, nos quais não há nenhuma referência ao dimorfismo de espermatozóides, apesar de HOLT & NORTH (1970), no estudo da espermatogênese de *Trichoplusia ni*, em microscopia de luz, terem facilmente diferenciado os espermatozóides eupirenes dos apirenes. Inclusive, PHILLIPS (1970 a) ao analisar, em níveis de microscopia de luz e eletrônica, a organização testicular e a morfologia de espermatozóides de 18 diferentes espécies de borboletas e mariposas, não fez sequer referência à espermatogênese dicotômica e ao conseqüente dimorfismo de espermatozóides.

Em relação aos períodos do ciclo de vida dos lepidópteros, nos quais surgem os primeiros feixes de espermátides e espermatozóides eupirenes e apirenes, é geralmente aceito que os espermatozóides típicos derivam-se de espermatócitos primários bipotenciais (LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979) que terminam suas divisões meióticas na larva e na pupa jovem, en

quanto que os espermatozoides atípicos derivam-se igualmente de espermatócitos bipotenciais, que sofrem suas divisões meióticas na pupa mais tardia e no imago (SADO, 1963; TAZIMA, 1964 - apud LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979; HOLT & NORTH, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; GARBINI & IMBERSKI, 1977). Entretanto, LEVIATAN & FRIEDLÄNDER (1979), ao estudarem aspectos ultra-estruturais de espermatogênese dicotômica da mariposa *Ectomyelois ceratoniae*, encontraram tanto metáfases como espermátides apirenes já na metade do 5º estágio larval, as quais não haviam sido ainda detectadas em trabalhos anteriores (FRIEDLÄNDER & WAHRMANN, 1970, 1971; FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977) relacionados com espermatogênese de *B. mori* e *Ephestia cautella*, baseados em observações de TAZIMA (1964 - apud FRIEDLÄNDER & WAHRMANN, 1970, 1971). Em termos gerais, pode-se afirmar que os eventos citológicos da espermatogênese eupirene regular precedem àqueles da apirene irregular, uma vez que a primeira começa no último estágio larval ou mesmo antes e termina na pupação, enquanto que a segunda inicia-se tanto antes da ou após a pupação e continua no imago (SADO, 1963; LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979). Por conseguinte, parece que a seqüência de uma para outra está relacionada com a pupação, porém não se conhece, ainda, se tal relação é causal ou não (FRIEDLÄNDER & BENZ, 1981). Entretanto, o mecanismo regulador da espermatogênese dicotômica permanece desconhecido, apesar de já se saber que está relacionado com a pupação (LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979; FRIEDLÄNDER, JANS & BENZ, 1981; FRIEDLÄNDER & BENZ, 1982).

Além disso, o padrão de diferenciação que leva aos 2 tipos de espermatozóides já foi estudado em detalhes (FRIEDLÄNDER & WAHRMAN, 1970, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972); FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977). Inclusive, pesquisas relacionadas com a cinética diferencial das nucleoproteínas básicas (histonas) em espermátides eupirenes e apirenes da mariposa *Laspeyresia pomonella*, levaram à conclusão de que existe provável relação entre as divisões meióticas eupirenes e a presença de uma fração protéica citoplasmática rica em lisina e que nos núcleos de espermátides eupirenes, o padrão de substituição das histonas ricas em lisina para outras ricas em arginina (o que não ocorre nos espermátides apirenes) parece refletir diferenças funcionais entre os dois tipos de espermatozóides, estando provavelmente relacionado com a regulação da espermatogênese dicotômica dos lepidópteros (FRIEDLÄNDER & HAUSCHTECK JUNGEN, 1982a, b)..

É mister considerar que o conhecimento completo dos eventos espermatogênicos eupirenes e apirenes de lepidópteros, bem como de seus mecanismos reguladores fornecerá informações valiosas, como bem o coloca DUMSER (1980) referindo-se aos insetos, em geral, para o planejamento e a aplicação de programas dirigidos ao controle químico e, principalmente, biológico de insetos praga ou à manipulação genética de populações para a produção de machos estéreis ou de baixa fertilidade.

Quanto ao papel desempenhado pelos espermatozóides eupirenes e apirenes, em Lepidoptera, sabe-se que os primeiros fertilizam os óvulos, enquanto que os segundos não desem

penham nenhum papel estrito na fertilização, como já havia sido assinalado por diversos pesquisadores do início desse século, de acordo com a extensa revisão elaborada por FAIN-MAUREL (1966). Apesar de não haver nenhuma dúvida quanto à participação dos espermatozoides eupirenes no processo de fertilização, a função dos apirenes continua sendo objeto de especulação. Estudos em microscopia de luz como os de MACHIDA-JIRO (1929 - apud SADO, 1963), de ÔMURA (1936- apud SADO, 1963), e, inclusive, o de SADO (1963), em *Bombyx mori*, levaram seus autores a deduzir que os espermatozoides atípicos provavelmente degenerariam ao nível do testículo e que os materiais resultantes poderiam servir como reservas nutritivas para os espermatozoides eupirenes, uma vez que os citados autores nunca conseguiram observar aquele tipo de espermatozoide em órgãos extratesticulares. Contudo, tal dedução baseada em observações limitadas pelas próprias técnicas citoquímicas utilizadas (por exemplo: SADO utilizou reação de Feulgen na tentativa de detectar espermatozoides anucleados em vesículas seminais) e pela própria dificuldade de observação de espermatozoides apirenes ao microscópio de luz, não é corroborada por IRIKI (1941 - apud SADO, 1963; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977 e KATSUMO, 1977 a,b) que encontraram tanto espermatozoides eupirenes quanto apirenes em órgãos extra-testiculares de imagos machos e no trato genital de fêmeas inseminadas de *B. mori*. Esta observação foi posteriormente confirmada em vários trabalhos de microscopia eletrônica e de luz, em diferentes espécies de lepidópteros (HOLT & NORTH, 1970; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; RIEMANN & GASSNER III, 1973; FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977; MEDEIROS & DOLDER, 1935 a,b). O experi

mento de IRIKI consistiu basicamente na separação dos dois tipos de espermatozoides, por centrifugação, e na subsequente inseminação artificial de fêmeas, utilizando-se os 2 tipos de espermatozoides (eupirenes e apirenes) isoladamente ou em conjunto. Quando os espermatozoides eupirenes (nucleados) eram introduzidos isoladamente na bursa copulatriz de fêmeas, jamais alcançavam a espermateca. O autor, então, concluiu que os espermatozoides nucleados (mais lentos e maiores) eram transportados da bursa à espermateca pelos anucleados (menores e mais ativos). FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) e FRIEDLÄNDER & MIESEL (1977) consideram essa função transportadora dos espermatozoides apirenes como perfeitamente plausível e aceitável, uma vez que os referidos pesquisadores encontraram grandes quantidades de espermatozoides atípicos normais em espermatecas de mariposas fêmeas por eles analisadas ao nível de microscopia eletrônica, o que inclusive colabora na invalidação da idéia inicial de que os espermatozoides apirenes participariam na nutrição dos eupirenes. Considerando também uma função transportadora para os espermatozoides atípicos, KATSUMO (1977 a) sugere, a partir de observações em microscopia de luz, que os espermatozoides apirenes desempenhem um importante papel no sentido de facilitarem a passagem dos eupirenes através da barreira celular que separa os

folículos testiculares dos vasos eferentes. KATSUMO (1977 b) considera igualmente que os espermatozoides apirenes atuam na separação dos feixes eupirenes ao nível da bursa copulatrix e que, de certa forma, auxiliam os eupirenes no processo de fertilização. Mais recentemente, SILBERGLIED *et al.* (1984), em contraposição às hipóteses propostas anteriormente, sugerem que a grande produção de espermatozoides apirenes em Lepidoptera seja o resultado da competição entre espermatozoides eupirenes rivais depositados por diferentes machos. Para esses autores, os espermatozoides apirenes não são gametas, mas "eunucos" que não competem com os espermatozoides eupirenes, mas atuam no sentido de eliminar ou inativar espermatozoides eupirenes depositados em acasalamentos anteriores e/ou impedir novos acasalamentos. Os referidos autores consideram essas novas hipóteses consistentes com o que já se conhece sobre a produção, a morfo-fisiologia e o comportamento dos espermatozoides apirenes. Considerando-se as várias hipóteses anteriores a respeito dos possíveis papéis dos espermatozoides atípicos, podemos afirmar, conclusivamente, que a função dos referidos espermatozoides não está completamente esclarecida, sendo ainda objeto de estudos especulativos.

Considerando-se especificamente os lepidópteros, pode-se afirmar que já existem diversas publicações sobre aspectos ultra-estruturais relacionados com a formação e morfo

logia de espermatozóides eupirenes e apirenes, e com as modi  
ficações sofridas pelos mesmos ao longo dos órgãos extra-tes-  
ticulares de indivíduos adultos machos e fêmeas. Estudos de  
talhados sobre a espermatogênese dupla de Lepidoptera foram  
realizados em *Pieris brassicae* por ZYLBERBERG (1963, 1969) ,  
nos quais são descritas a formação e a morfologia caracterís-  
tica de espermatozóides típicos e atípicos. Afora esse tra-  
balho, muito poucos pesquisadores têm se preocupado em des-  
crever aspectos ultra-estruturais pertinentes à formação da  
queles 2 tipos normais de espermatozóides. Entre eles, des-  
tacam-se: FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1970, 1971) que descreveram  
os estágios básicos de desenvolvimento de espermátides eupi-  
renes e apirenes em *Bombyx mori*; FRIEDLÄNDER & MIESEL (1977)  
que abordaram o processo de enucleação de espermátides atípi-  
cas durante a espermiogênese de *Ephestia cautella* e LEVIATAN  
& FRIEDLÄNDER (1979) que observaram a formação precoce de es-  
permátides apirenes em larvas de 5º estágio em *Ectomyelois*  
*ceratoniae*.

Quanto à morfologia ultra-estrutural de espermato-  
zóides eupirenes e apirenes , existem algumas descrições que  
se referem a características gerais de ambos os tipos, ao ní-  
vel do testículo, analisadas em diversas espécies de borbole-  
tas e mariposas (PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972;  
RIEMANN, 1970, 1973; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER,  
1983). Há, entretanto, várias publicações que tratam da for-  
mação, do desenvolvimento e da morfologia de determinadas es-  
truturas celulares que caracterizam ultra-estruturalmente os  
espermatozóides eupirenes e apirenes, descritas brevemente a  
seguir:

Os apêndices laciniados e reticular que recobrem a superfície externa de espermatídes e espermatozóides eupirenes intra-testiculares foram primeiramente descritos e denominados por ANDRÉ (1959 - apud ANDRÉ, 1961) nas borboletas *Pieris* e *Macroglossum*, respectivamente. Tais apêndices foram posteriormente descritos por PHILLIPS (1970, 1971, 1974) em diversas espécies de lepidóptero; por RIEMANN (1970) em *Trichoplusia ni* que chamou os apêndices laciniados de "radials" e o reticular de "corpo satélite"; por RIEMANN & THORSON (1971) em *Anagasta kllhniella*; por FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) em *B. mori* e por FRIEDLÄNDER (1976), que descreveu uma possível origem intracelular dos apêndices laciniados em *Ephestia cautella*, em contraposição a YASUZUMI & ŌURA (1964a, b, 1965a, b), que explicaram a origem extracelular dos referidos apêndices, denominados por eles de "derivados de banda clara", em espermatídes de *B. mori*.

Quanto aos flagelos de espermatídes e espermatozóides de lepidópteros, o padrão de organização 9+9+2 dos axonemas foi descrito por ANDRÉ (1961), YASUZUMI & ŌURA (1965b), PHILLIPS (1970a, 1971) que, inclusive, detectaram o conteúdo elétron-denso dos microtúbulos acessórios (chamados de "côtes" por ANDRÉ, 1961), em espermatozóides eupirenes.

Os derivados mitocondriais que flanqueiam o axonema em quase toda sua extensão (PHILLIPS, 1970a, 1971) foram detalhadamente analisados por ANDRÉ (1962), em *Pieris* e *Macroglossum*, que descreveu a "metamorfose" sofrida pelo complexo mitocondrial ("nebenkern") durante a espermiogênese eupirene (o autor não se referiu ao tipo de espermatíde em alongamento), com simultânea formação de um componente paracristalino, (des

crito pela primeira vez) estriado periodicamente na região medular dos derivados mitocondriais (provavelmente em espermátides apirenes). PHILLIPS (1970a,1971) descreveu igualmente diversas características (volume, extensão, diâmetro, espaçamento das cristas, elétrons-densidade da matriz, presença ou não de cristalóides) de derivados mitocondriais de espermatozóides eupirenes e apirenes. A *simetria* do flagelo e dos derivados mitocondriais descrita por ANDRÉ (1961) e YASUZUMI & ŌURA (1965b), foi igualmente relatada por PHILLIPS (1970a).

Quanto à existência de *centríolo* em espermátides e espermatozóides maduros, há nítida controvérsia entre os autores. Enquanto PHILLIPS (1970a) afirma que não encontrou nenhum centríolo em espermatozóides maduros (não especificou o tipo) de várias espécies de lepidópteros, FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) detectaram a presença de 1 centríolo em espermatozóides eupirenes e apirenes intra e extra-testiculares de *B. mori*.

Em relação aos espermatozóides apirenes, PHILLIPS (1971), FRIEDLÄNDER & GITAY (1972), FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) e FRIEDLÄNDER & MIESEL (1977) descreveram, ao nível das porções anteriores, em diferentes espécies de Lepidoptera, a presença de uma estrutura semelhante a um centríolo, mas divergem substancialmente em relação ao conceito de "centríolo" utilizado.

Quanto ao *adjunto do centríolo*, PHILLIPS (1970a) afirma que, em algumas espécies de lepidópteros, aquela estrutura desaparece completamente durante a espermiogênese, o que parece ser também o caso da mariposa *Alabama argillacea* Hb.,

em cujos espermatozóides eupirenes nunca foi detectado o adjunto centriolar (MEDEIROS & DOLDER, observações pessoais).

Considerando-se especificamente a organização da cabeça dos espermatozóides eupirenes de lepidópteros, há poucas descrições ao nível de microscopia eletrônica, a respeito. Em relação ao núcleo, ZYLBERBERG (1969) elaborou uma descrição detalhada de sua evolução durante a espermiogênese de *Pieris brassicae*; PHILLIPS (1971) relatou muito brevemente a respeito da variedade de formas nucleares entre as diversas espécies de borboletas e mariposas analisadas, bem como sobre a posição e o tamanho do núcleo e o aspecto do conteúdo cromatínico, sem contudo, ilustrar a descrição; e FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) elaboraram breve relato lembrando que as transformações nucleares ocorridas durante a espermiogênese de espermátides eupirenes de *B. mori* se assemelham àquelas descritas para *Acheta domestica* (Orthoptera) por KAYE & McMASTER-KAYE (1966). Em relação ao acrosoma, há certa controvérsia entre os autores pesquisados, pois enquanto alguns relatam a respeito daquela estrutura cefálica, outros nem sequer se reportam a ela, especificamente, como FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971). ZYLBERBERG (1969) descreveu a formação e evolução diferenciada do acrosoma ao longo da espermiogênese de *P. brassicae*, enquanto que PHILLIPS (1971) detectou a presença do mesmo em todas as espécies de lepidópteros por ele examinadas, descrevendo, inclusive, seu tamanho, suas formas variadas, sua posição em relação ao núcleo, sem contudo apresentar nenhuma elétron-micrografia que ilustrasse suas afirmações a respeito.

Contudo, FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) descreveram o aparecimento e desenvolvimento seqüencial de uma vesícula elétron-densa que surge junto à face anterior do núcleo, de espermátides eupirenes jovens e que se alonga, colocando-se em posição lateral ao núcleo, durante a espermiogênese de *B.mori*. Esta estrutura vesicular elétron-densa muito se assemelha à estrutura tubular descrita por ZYLBERBERG (1969) ao detalhar a evolução acrosômica de *P.brassicae* e àquela igualmente descrita em espermátides de *B. mori* com YASUZUMI & ŌURA (1964a, 1964b, 1965a). Em espermátides eupirenes de *A. argillacea* também foi detectada a presença dessa estrutura tubular adjacente ao núcleo em processo de alongamento (MEDEIROS & DOLDER, observações pessoais).

As notáveis modificações pelas quais passam os espermatozóides eupirenes e apirenes ao longo do trato genital (órgãos extra-testiculares) de imagos machos e fêmeas, foram descritas ultra-estruturalmente por PHILLIPS (1971) em diversas espécies de borboletas e mariposas; RIEMANN (1970) em *Trichoplusia ni*; RIEMANN & THORSON (1971) e RIEMANN (1973) em *Anagasta kllhniella*; FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) em *B. mori* e RIEMANN & GASSNER III (1973) em cinco diferentes espécies de mariposas praga de plantações (*Heliothis zea*, *H. virescens*, *Spodoptera frugiperda*, *Manduca sexta* e *Pectinomorpha gossypiella*).

Grande parte dos estudos anteriormente citados contribuíram sobremaneira para a interpretação das elétron-micrografias obtidas de espermátides e espermatozóides eupirenes e apirenes intra e extra-testiculares de *A. argillacea*. Entretanto, algumas lacunas nos dados conhecidos sobre o dimorfismo de espermatozóides de lepidópteros são preenchidas pelo nosso trabalho que contribui, igualmente, no sentido de um conhecimento mais amplo a respeito da referida espécie tão importante entre nós.

## MATERIAL E MÉTODOS

Larvas e pupas de *Alabama argillacea* Hübner, 1818 foram coletadas em algodoads cultivados em Fazendas situadas nos municípios de Santo Antônio de Posse e Casa Branca, em São Paulo, nos períodos de janeiro a março de 1984 e 1985. As primeiras pupas foram gentilmente fornecidas, em março de 1983, pelo prof. Carlos Fernando Salqueirosa de Andrade, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, que nos auxiliou na localização de algodoads infestados de *A. argillacea* e na manutenção, em laboratório, dos indivíduos coletados.

As larvas coletadas, em vários estágios de desenvolvimento, foram alimentadas, em laboratório, com folhas frescas de algodoeiros cultivados no próprio campus da UNICAMP, bem como próximos a ele. Dessa forma, foram possíveis o desenvolvimento e a manutenção de várias gerações sucessivas, a partir da 1ª ovoposição, com sucesso. Não foi possível a manutenção dos indivíduos, em laboratório, durante todo o período anual, devido à erradicação dos algodoads cultivados após a colheita e porque as larvas, em geral, apresentaram baixa aceitação das folhas de um algodoeiro arbustivo perene localizado no campus da UNICAMP.

Para acompanhamento e manutenção das diversas fases do desenvolvimento de *A. argillacea*, foram de grande valia as informações contidas na Tese de Doutorado do prof. Mohamed Ezz El-Din Moustafa Habib (1976), também do Departa-

mento de Zoologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Para nosso estudo, somente foram utilizados insetos adultos (imagos) machos e fêmeas, os quais eram alimentados com solução açucarada a ~ 20%. Inicialmente, um grande número de imagos machos e fêmeas foram dissecados, em solução de Ringer para insetos, e observados sob microscópio estereoscópico Zeiss, com o intuito de estudar-se a anatomia de seus aparelhos reprodutores. Com o auxílio prestimoso do Prof. Carlos Fernando S. de Andrade, foi também possível fotografarem-se os sistemas reprodutores de imagos machos e fêmeas. A partir de observações diretas e fotografias, nós elaboramos desenhos esquemáticos dos referidos aparelhos reprodutores (figuras "a" e "b") de *A. argillacea*. Para tal análise e composição, contribuíram sobremaneira as informações publicadas por IMMS (1957), CALLAHAN & CHAPIN (1960), WIGGLESWORTH (1965) e SHEN & BERRYMAN (1967).

Após o reconhecimento e a identificação das diversas partes componentes dos aparelhos reprodutores de imagos machos e fêmeas, procedeu-se, então, à dissecação de mariposas de 1-10 dias de vida, após a eclosão das pupas, com o objetivo de estudar a ultra-estrutura dos espermatozóides no testículo e nas vias genitais dos imagos macho e fêmea. Os machos e fêmeas adultos foram anestesiados com éter etílico ou imobilizados pelo frio (~ 10°C) e rapidamente dissecados sob microscópio estereoscópico Zeiss, em solução de glutaraldeído (Merck) a 0,25% em tampão fosfato Sørensen 0,1M, pH 6.8, contendo 3% de sacarose e traços de cloreto de cálcio (GLAUERT, 1975). Dos imagos machos, foram retirados e separados os testículos únicos, os vasos deferentes, as vesículas seminais e os dutos ejaculadores duplos (duplex) e simples.

Dos imagos fêmeas, foram removidas e separadas as bursa copulatrix e espermateca.

Os tratamentos experimentais aos quais foram submetidos os órgãos, ou segmentos destes, removidos dos aparelhos reprodutores de mariposas machos e fêmeas de *A. argillacea*, para observação e análise ultra-estrutural dos espermatozoides típicos e atípicos, estão descritos a seguir.

#### CORTES ULTRA-FINOS

Para obtenção de cortes ultra-finos, os órgãos dissecados de imagos machos e fêmeas de *A. argillacea* foram divididos em pedaços menores e submetidos a diferentes processos de fixação, por imersão, cujos procedimentos são os seguintes:

**FIXAÇÃO I** - Testículo, vesícula seminal e vaso deferente de imagos de 1-7 dias foram fixados previamente em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato Sørensen 0,1M, pH 6.8 (GLAUERT, 1975), com aproximadamente 3% de sacarose e traços de cloreto de cálcio, por 2 horas, a 4°C, sob agitação manual intermitente. Após rinsagem dos espécimes no mesmo tampão, a 4°C, por 15 minutos, procedeu-se à pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%, no referido tampão, por 1 hora.

Após rápida lavada em água destilada, a 4°C, os espécimes foram submetidos à desidratação gradual em uma série crescente de etanóis de 45 a 95%, a 4°C, até 100%, à temperatura ambiente, por 2 horas. Procedeu-se, a seguir, à substituição gradual do etanol a 100% por óxido de propileno (Merck),

à temperatura ambiente. Após tal procedimento, o material foi embebido em mistura de óxido de propileno e Epon (1:1), por 12 horas, em frascos abertos, à temperatura ambiente.

A seguir, os espécimes foram incluídos em Epon 812 (LUFT, 1961), numa mistura balanceada para obtenção de adequada dureza final dos blocos para posterior ultra-microtomia.

FIXAÇÃO II - Testículo, vaso deferente, vesícula seminal e ducto ejaculador duplo e simples de imagos jovens foram pré-fixados em glutaraldeído a 3-6% em tampão cacodilato 0,2M, pH 7.2, a 4°C, por 2h30min; lavados no mesmo tampão, várias vezes, por 30 min e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, a 4°C, por 2-3 horas.

A seguir, após rinsagem dos espécimes em água destilada, a 4°C, procedeu-se a uma 3ª fixação e prévia contração, por meio de solução aquosa a 2% de acetato de uranil (WATSON, 1958), pH 4.2, a 4°C, por 1-8 horas. Seguiu-se, então, a desidratação gradual do material biológico em uma série crescente de álcoois e óxido de propileno, por 2 horas, com posterior inclusão em Epon 812.

FIXAÇÃO III - Testículo, vaso deferente, vesícula seminal e ducto ejaculador duplo de imagos de 1-7 dias foram submetidos a uma prévia fixação em mistura de solução de glutaraldeído (Merck) a 3% (SABATINI, BENSCH & BARNETT, 1963) e solução de vermelho de rutênio (Sigma), a 1500 ppm em água destilada (LUFT, 1971a,b, em tampão cacodilato 0,2M, pH 7.3 (GLAUERT, 1975), contendo 3% de sacarose com traços de cloreto de cálcio).

cio, durante 1 hora, a 4°C, sob agitação manual a intervalos regulares de tempo. A seguir, os espécimes foram lavados no mesmo tampão, a 4°C, por 15 minutos. A pós-fixação foi efetuada em solução de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) (Fluka) a 1% no mesmo tampão, adicionado também de vermelho de rutênio, por 2 horas, a 4°C, com agitação manual freqüente.

Após rápida lavagem em água destilada, a 4°C, os espécimes foram submetidos à desidratação através de uma série crescente de etanóis, por 2 horas, com posterior substituição do etanol 100%, à temperatura ambiente, por uma mistura de óxido de propileno e Epon 812(1:1) na qual os espécimes foram deixados para embebição por 12 horas, em frascos abertos à temperatura ambiente. A seguir, o material biológico embebido previamente, foi incluído em Epon 812.

FIXAÇÃO IV - Testículos, vasos deferentes, vesículas seminais e ducto ejaculador de imagos jovens, foram previamente fixados em mistura de glutaraldeído a 2% com ácido tânico a 2% (Merck) em tampão fosfato Sørensen 0,5M, pH 6.8, durante 2 horas, a 4°C (MIZUHIRA & FUTAESAKU, 1972). Após rinsagem dos espécimes em tampão fosfato com 3% de sacarose e traços de cálcio, a 4°C, por 1h, os mesmos foram submetidos à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, a 4°C, por 1 hora. A seguir, procedeu-se à desidratação gradual dos espécimes em uma série crescente de álcoois e óxido de propileno, por 2 horas, para posterior inclusão em Epon 812.

FIXAÇÃO V - Testículo, vaso deferente, vesícula seminal, ductos ejaculadores duplo e simples de imagos jovens,

bem como o conteúdo da bursa copulatrix e espermateca de mariposas fêmeas inseminadas foram submetidos ao procedimento de fixação preconizado por SIMIONESCU & SIMIONESCU (1976a), descrito a seguir: fixação prévia dos espécimes em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2, a 4°C, por 90 minutos; lavagem no mesmo tampão, a 4°C, por 30 minutos, com várias mudanças; pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%, igualmente em tampão cacodilato, a 4°C, por 90 minutos; nova lavagem no referido tampão, a 4°C, por 15 minutos, com várias trocas neste intervalo de tempo; a seguir, tratamento dos espécimes com ácido tânico a 1%, em tampão cacodilato, à temperatura ambiente, por 1 hora; por fim, rinsagem rápida dos espécimes no mesmo tampão e procede-se, então, à desidratação gradual em série crescente de etanóis e óxido de propileno, por 2 horas, para posterior inclusão em Epon 812.

FIXAÇÃO VI - Espermatecas inteiras de mariposas jovens inseminadas foram dissecadas em glutaraldeído a 0,25% em tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 6.8, e estocadas, nessa solução fixadora, por 2 meses e 20 dias, a frio. Após este período, as espermatecas foram seccionadas pela metade e submetidas a um tratamento com ácido tânico 4% em tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 6.8, por 1 hora. Após lavagem no mesmo tampão com ~3% de sacarose e traços de cálcio por 1h, a 4°C, os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, por 2 horas, a 4°C. A seguir, procedeu-se a uma 3ª fixação e prévia contrastação dos espécimes com acetato de uranil a 2%, em água destilada a 4°C, por 1 hora. Após rápida lavagem com água destilada, a frio, efetuou-se a desidratação gradual dos espécimes através de uma série crescente de álcoois

e óxido de propileno, por 2 horas. Posterior inclusão em Epon 812.

Após inclusão dos espécimes e polimerização dos blocos em estufa, a 60°C, por 3-5 dias, procedeu-se à ultramicrotomia. Inicialmente, os blocos foram preparados através de desbaste apropriado com lâminas de barbear, para serem submetidos à posterior ultramicrotomia. Para tal, utilizaram-se navalhas de vidro cristal especial previamente produzidas no "knifemaker" LKB e selecionadas, para cada sessão de corte, no próprio ultramicrotomo LKB.

Antes de processar-se a obtenção de cortes ultra-finos, foram produzidos cortes semi-finos (espessura de 0,2  $\mu\text{m}$ ), corados com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2,5% e azul de toluidina a 1%, pH fortemente alcalino, com o intuito de estudo prévio do espécime, para seleção da área mais apropriada à realização de cortes ultra-finos. Para obtenção de cortes semi e ultra-finos, utilizou-se o ultramicrotomo LKB e a espessura dos cortes ultra-finos era avaliada visualmente através de suas cores de interferência na luz refletida no líquido (água bidestilada) da canaleta no qual eles flutuavam. Somente os cortes com tonalidade cinza-prata a levemente dourada - espessura de aproximadamente 40-80nm, de acordo com a escala de PEACHEY (1958 - apud REID, 1975) foram utilizados para observação ultra-microscópica.

A coleta dos cortes ultra-finos foi realizada em grades de cobre para microscopia eletrônica com 200-400 "mesh", nuas ou, em alguns casos, cobertas por películas - suporte de parlódio (solução a 2% em acetato de amila), re-

forçadas com filmes de carbono (WATSON, 1955; SPENCER, 1959; BRADLEY, 1965 e HAYAT, 1970), em evaporador Hitachi (Modelo HUS-4GB).

Após a coleta, dos cortes ultra-finos, os mesmos foram submetidos a tratamento com soluções de "contrastantes (ou "corantes") eletrônicos, com o objetivo de obter-se contraste adequado dos espécimes. As grades com os cortes ultra-finos foram inicialmente imersas (com os cortes para cima) numa solução aquosa a 2% de acetato de uranil, pH 4.2, durante 10-30 min, à temperatura ambiente. A seguir, as telas (ou grades) foram lavadas com água destilada e secas sobre papel de filtro. Após a secagem, aquelas foram deixadas flutuando, individualmente, sobre pequenas gotas de solução de citrato de chumbo a 0,1% em aproximadamente 0,1N hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965), pH-12, por 2-5 minutos, no máximo, à temperatura ambiente, num recipiente fechado contendo pastilhas de hidróxido de sódio. As telas, então, foram bem lavadas, com rapidez, em água destilada e levadas a secar em papel de filtro.

Contudo, a contrastação dupla dos cortes ultra-finos somente foi utilizada para aqueles obtidos a partir de blocos cujo material biológico tenha sido submetido às fixações I, IV e V. Apesar de não ser indicado o uso de solução de acetato de uranil (apenas citrato de chumbo) na pós-contrastação dos cortes ultra-finos, cujo material tenha sido submetido à fixação V (SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1976a), utilizou-se, às vezes, tal tratamento para fins comparativos quanto ao contraste resultante. Observou-se, inúmeras vezes, uma alta melhora no contraste final do material. Os cor

tes ultra-finos com material que havia sido submetido à fixação III, não foram pós-contrastados. Já, aqueles com material fixado de acordo com os tratamentos II e VI, no qual havia sido utilizado previamente o acetato de uranil, como pré-contrastante, foram pós-contrastados com solução de citrato de chumbo somente.

Os cortes ultra-finos, com ou sem pós-contratação, foram observados ao microscópio eletrônico Zeiss 9S-2, operando a 60 kV, em aumentos de 1.800 a 27.000 vezes, e portando filmes da Fuji (Fuji Electron-Microscopic Film FG) e/ou da Kodak (Kodalith orto, tipo 3 2556 e Kodak Electron Microscope Film 4489). Na revelação dos filmes, utilizou-se o revelador D19B, preparado conforme fórmula fornecida pela Kodak.

As cópias fotográficas foram elaboradas em papel fotográfico Kodabromide, peso simples, F3 ou F4, da Kodak, com o auxílio de um ampliador Fuji (modelo S69) equipado com as lentes originais.

Foram utilizados revelador Dektol e fixador, ambos da Kodak, para as respectivas revelação e fixação das cópias fotográficas.

Um grande número de micrografias eletrônicas foi exhaustivamente produzido a partir de um número igualmente grande de filmes, com o intuito de obter-se uma quantidade significativa de informações a respeito da natureza ultra-estrutural dos espermatozoides de *A. argillacea*. Constam do presente trabalho, micrografias de espermatozoides típicos e atípicos observados ao nível do testículo (fixação III, IV, V e contração negativa); do vaso deferente (contração nega

tiva); da vesícula seminal (fixações I, IV, V e contrastação negativa); do ducto ejaculador duplo (fixações II, V e contrastação negativa); do ducto ejaculador simples, (fixação II); da bursa copulatrix (fixação V); e da espermateca (Fixações V e VI).

#### CONTRASTAÇÃO NEGATIVA

Imagos machos jovens de *A. argillacea*, após serem anestesiados com éter etílico, foram dissecados em solução de Ringer para insetos. Testículos e vasos deferentes foram removidos e colocados separadamente na solução acima referida. Com auxílio de pinça e estilete, os testículos e vasos deferentes foram rompidos e, de tal ação mecânica, obtiveram-se suspensões de espermatozóides. Pequenas gotas de tais suspensões foram colocadas sobre grades (1 gota em cada grade) para microscopia eletrônica cobertas por películas - suporte de parlódio, reforçadas com filmes de carbono. Com auxílio de papel de filtro, secou-se o excesso de líquido, deixando-se, em cada grade, uma certa quantidade da suspensão respectiva que permitisse a formação de um filme do material a ser observado. Após 2-5 minutos, sobre cada tela com o material, foi colocada uma gota de contrastante negativo - solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1%, pH 6.8, ajustado com solução saturada de hidróxido de potássio (HASCHEMEYER & MYERS, 1972). Após intervalo de alguns minutos (5 a 10, no máximo), removeu-se o excesso de solução contrastante com auxílio de papel de filtro. Secagem das preparações à temperatura ambiente. Este método para suspensões foi proposto originalmente por HORNE (1967).

As vesículas seminais e os dutos ejaculadores duplos removidos de aparelhos reprodutores masculinos estocados em solução de glutaraldeído a 0,25%, foram submetidos isoladamente à sonicação, por 5-10 minutos, em aparelho de ultra-som Millipore. Após fragmentação ultra-sônica, as suspensões resultantes foram submetidas ao mesmo método anteriormente descrito. O contrastante negativo utilizado, neste caso, foi uma solução aquosa de acetato de uranil a 0,5%, pH -4,0.

Foi utilizado também, como contrastante negativo, solução aquosa de molibdato de amônia a 2%, pH 6.8, mas não foram obtidos resultados satisfatórios que pudessem ser publicados.

## RESULTADOS

### I. Morfologia dos Aparelhos Reprodutores masculino e feminino de *Alabama argillacea* Hb.

Não existem ainda descrições morfológicas dos aparelhos reprodutores de imagos machos e fêmeas de *A. argillacea* e a descrição de CALLAHAN & CHAPIN (1960) sobre a anatomia dos aparelhos reprodutores masculino e feminino de dois outros noctuídeos, *Pseudaletia unipuncta* e *Peridroma margaritosa*, muito nos auxiliou na análise e descrição morfológica do aparelho reprodutor masculino de *A. argillacea*, em função da similaridade existente entre este e o de *Peridroma margaritosa*. Inclusive, RIEMANN (1970) utilizou a descrição de CALLAHAN & CHAPIN (1960) como base para identificação dos órgãos componentes dos aparelhos reprodutores masculino e feminino de outro noctuídeo, *Trichoplusia ni*, no seu estudo acerca de espermatozóides eupirenes e apirenes intra e extra-testiculares da referida mariposa.

Considerando os desenhos esquemáticos "a" e "b", por nós elaborados, dos aparelhos reprodutores masculino e feminino de mariposas *A. argillacea*, as quais foram dissecadas em grande número, passamos a descrever brevemente sua morfologia.

#### A. Aparelho Reprodutor Masculino (Fig. "a")

Testículo (t) - É um órgão único arredondado, com diâmetro aproximadamente igual a 2mm, de cor esverdeada, si-

tuado mediana e dorsalmente e envolto por uma rede de traquéias.

Vasos Deferentes (vd) - Na saída do testículo, os dois vasos deferentes translúcidos calibrosos, apresentam-se retorcidos um ao redor do outro, para, logo em seguida, dilatam-se, formando as vesículas seminais e, depois, estreitam-se para formar 2 longos tubos finos, transparentes e elásticos que vão desembocar individualmente no terço anterior dos ductos ejaculadores duplos.

Vesículas Seminais (vs) - São duas porções dilatadas dos vasos deferentes muito próximas uma da outra, translúcidas e de aspecto leitoso quando contêm, no seu interior, uma massa de espermatozóides misturados a secreções das próprias vesículas (Fig. 56 e 60). Apresentam ativos movimentos peristálticos que impulsionam os espermatozóides adiante.

Ducto Ejaculador Duplo (ded) - Também denominado de *duplex*, serve como reservatório glandular tanto para a secreção das glândulas acessórias como para a própria secreção, misturadas aos espermatozóides que se encontram nessa estrutura. Esse ducto duplo, em forma de "S", apresenta duas unidades em contato íntimo. Na porção anterior há uma constricção que delimita nitidamente a região na qual desembocam as glândulas acessórias. O duplex é opaco e de aspecto leitoso. Sua parede, quando analisada ao nível de microscopia eletrônica, mostra na sua superfície interna uma camada de células epiteliais secretoras (Fig. 74), com abundante retículo endoplasmático granular, vários dictiosômos do complexo de Golgi, inúmeros grânulos de secreção e microvilosidades na sua por

ção apical. Foram observados também, nessas células secretoras, núcleos basais volumosos com nucléolos evidentes e bem desenvolvidos.

Glândulas Acessórias (ga) - São dois longos órgãos secretores opacos, de aspecto leitoso, inteiramente unidos entre si em toda a sua extensão. Com formato tubular e sinuoso, ligam-se às extremidades anteriores dos ductos ejaculadores duplos. Todos os cortes observados ao microscópio eletrônico não apresentaram espermatozóides.

Ducto Ejaculador Simples (des) - Também denominado de *simplex*, corresponde a um longo, sinuoso e elástico tubo, com nítidos movimentos peristálticos em toda a sua extensão, que se estende a partir do duplex até o aedeagus (endofalo). Apresenta regiões transparentes amareladas e regiões, de maior diâmetro, de cor leitosa, provavelmente devido ao seu conteúdo (espermatozóides e secreções - Fig. 78). Na sua porção terminal existe um segmento mais dilatado, o *bulbo ejaculador* que se continua no aedeagus, o qual se encontra envolvido num cecum resistente, revestido por uma cutícula multiesclerotizada.

#### B. Aparelho Reprodutor Feminino (Fig. "b")

O aparelho reprodutor feminino de *A. argillacea* apresenta uma morfologia mais complexa que a do masculino e será descrito brevemente, com destaque para as bursa copulatrix e espermateca ou receptaculum seminis, nas quais foram analisados os espermatozóides típicos e atípicos.

Bursa Copulatrix (bc) - É uma estrutura volumosa, semelhante a um cabeçote pedunculado, amarelo-pardo, com uma parede externa muito rígida e uma interna membranosa no interior do qual é depositado o espermátóforo. Próximo à base do conduto da bursa (ductus bursae), encontra-se a ligação com o ducto seminal (ductus seminalis), o qual se comunica com o vestíbulo do ovopositor, numa região próxima à desembocadura do ducto espermatecal.

Espermateca ou Receptaculum Seminis (rs) - é composta por uma longa e filamentosa glândula espermatecal, ligada à porção apical de um lobo arredondado, de cor branco-leitosa brilhante e de parede rígida e resistente, que corresponde à espermateca propriamente dita ou utrículo. Esse lobo se comunica com o vestíbulo do ovopositor através do ducto espermatecal. Serve como reservatório de espermatozóides típicos e atípicos, como foi observado ao nível de microscopia eletrônica (Fig. 84).

Ovários (ov) - São dois órgãos constituídos, cada um, por 4 ovariolos longos e filamentosos, cujas extremidades livres estão intimamente associadas entre si. Os ovariolos de cada ovário confluem num pequeno reservatório, em forma de cálice, que se continua em um oviduto. Os dois ovidutos laterais se unem num oviduto comum que desemboca na porção superior do vestíbulo do ovopositor. Na época da ovoposição, os ovidutos bastante elásticos podem ficar repletos e dilatados pelos óvulos maduros (de cor verde, com formato de pastilhas estriadas, cuja porção central é proeminente).

## II. Caracterização Ultra-estrutural de Espermatozóides Eupirenes e Apirenes Intra-testiculares

### A. Organização Testicular dos Cistos Eupirenes e Apirenes

No testículo de imagos jovens normais, os cistos de espermatozóides eupirenes encontram-se geralmente circundados por cistos apirenes, como mostra a Fig. 1. Em outros cortes transversais, foram observados também, vários espermatozócitos eupirenes não rodeados por cistos de espermatozóides apirenes, que, por sua vez, formavam agrupamentos independentes, porém próximos aos cistos eupirenes. Todos os feixes eupirenes e apirenes apresentam-se envoltos por células císticas (Fig. 1) que individualizam os cistos determinando limites nítidos. Às vezes, são observados núcleos das células císticas (Fig. 21), algumas organelas citoplasmáticas como mitocôndrias e retículo endoplasmático (Fig. 19 e 21) e, com frequência, detecta-se a presença de abundantes partículas de material semelhante a glicogênio, no citoplasma das células dos folículos (Fig. 21).

Tanto nos cistos *eupirenes* quanto nos *apirenes*, os espermatozóides se dispõem paralelamente entre si, com os flagelos dispostos lado a lado numa posição ordenada, como mostram as Fig. 1, 2, 3, 4, 19, 20 e 21. Inclusive, as porções anteriores de espermatozóides apirenes dispõem-se lado a lado, porém em alturas diferentes (Fig. 5, 6, 7, 8 e 9). Em função de as cabeças dos espermatozóides atípicos não estarem no mesmo nível, pode-se observar também ao nível dos flagelos,

em corte transversal, alturas diferentes (Fig. 1, 2 e 4), inclusive nas suas porções terminais (Fig. 12). Mas, em cistos eupirenes, não se observam flagelos em diferentes alturas de corte (Fig. 1, 19, 20, 21, 29, 35, 38 e 50). Com frequência, em cistos eupirenes seccionados ao nível de porções anteriores de flagelos, nota-se uma ordenação linear dos espermatozoides numa configuração geométrica hexagonal interna e, até mesmo, externa, no limite do próprio feixe (Fig. 20). Esta configuração hexagonal pode também ser notada, porém com menor evidência, em porções mais posteriores dos flagelos de feixes eupirenes nas Fig. 1, 19 e 20 e, inclusive, na Fig. 25 onde são observados diferentes níveis de corte de espermatozoides eupirenes, desde porções cefálicas a porções intermediárias entre as cabeças e as caudas.

Nos cistos apirenes, não existe uma ordenação geométrica dos flagelos (Fig. 1, 2, 3, e 4) como a dos eupirenes. Contudo, em certas regiões de alguns espermatozoides atípicos, em diferentes níveis de corte dos flagelos, observa-se uma ordenação muito regular nas regiões que apresentam somente axonemas (Fig. 1, 2, 3, e 4). Nota-se também que os espermatozoides eupirenes e apirenes, apresentam seus flagelos soltos na porção central dos cistos, particularmente em regiões mais posteriores (Fig. 1, 2, 3, 4, 19 e 21), enquanto que as porções anteriores de espermatozoides apirenes e as cefálicas dos eupirenes encontram-se imersas no citoplasma de uma célula cística apical (Fig. 5, 6, 7, 8, 9, 22, 23 e 26). Na Fig. 25, particularmente, a qual mostra um cisto eupirene, nota-se que apenas, as cabeças e porções intermediárias entre as cabeças e os flagelos estão imersas no citoplasma de uma

célula apical.

Quanto ao número de espermatozóides por cisto, há diferenças nítidas entre os eupirenes e apirenes. Os cistos típicos contêm, geralmente,  $256 \pm 1$  espermatozóides por feixe (Fig. 1, 19, 20, 21 e 25), mas os atípicos apresentam variações significativas no número de espermatozóides por feixe. Nos cistos apirenes menores, cortados ao nível dos flagelos, em alturas iguais, contam-se geralmente  $256 \pm 1$  espermatozóides por feixe (Fig. 3). Contudo, há cistos apirenes maiores (Fig. 1, 2 e 4) nos quais o número de espermatozóides por feixe é bastante variável, oscilando de  $523 \pm 1$  (Fig. 4) a  $732 \pm 1$  (Fig. 2). Nestes cistos atípicos mais volumosos, no tam-se sempre regiões flagelares compostas apenas de axonemas.

Nos testículos de imagos jovens, observam-se além de feixes de espermatozóides eupirenes maduros (Fig. 1, 19, 20 e 21), localizados mais centralmente, um número bastante variado, porém menor que o de feixes maduros, de espermátides eupirenes em diferentes estágios de maturação, como mostram as Fig. 47, 48 e 49. Além de espermátides eupirenes, também foram detectados cistos apirenes, em maior número, com espermátides completando seu processo de diferenciação.

#### B. Espermatozóides Apirenes ou Atípicos

Os espermatozóides apirenes são basicamente aparatos flagelares anucleados derivados de espermatócitos primários bipotenciais que, segundo a literatura, sofreram um pro

cesso meiótico atípico, no qual houve eliminação total do material cromatínico nuclear. O comprimento total desses espermatozóides é superior a 260  $\mu\text{m}$  (Fig. 15).

#### B.1. Porções Anteriores

Os feixes de espermatozóides atípicos maduros apresentam suas porções anteriores dispostas paralelamente umas em relação às outras, porém em alturas diferentes, e imersas no citoplasma de uma célula apical (Fig. 5, 6, 7, 8 e 9). Em cortes transversais (Fig. 5 e 6), observam-se diferentes níveis, desde regiões mais apicais até aquelas em que já se evidencia a organização típica do axonema. Na Fig. 18, que é uma ampliação da porção anterior ("cefálica") do espermatozóide apirene semelhante à Fig. 15, observa-se que essa porção é bastante reduzida (comprimento aproximado de 2,5  $\mu\text{m}$ ) em relação à extensão total do espermatozóide.

Na região apical, onde os microtúbulos se iniciam, o diâmetro é menor (cerca de 140 nm) e aumenta gradualmente até a porção basal desta região (cerca de 360 nm), que é demarcada nitidamente pelo início dos derivados mitocondriais. A Fig. 17 mostra igualmente uma porção anterior de espermatozóide apirene, porém com a membrana plasmática parcialmente rompida e microtúbulos soltos. A Fig. 6 ilustra uma porção da Fig. 5, na qual é evidenciada a organização estrutural de alguns níveis (corte transversal) de porções "cefálicas" de espermatozóides apirenes. Analisando-se, simultaneamente, as Fig. 5, 6, 7, 8 e 9, observa-se que:

a) as porções anteriores de espermatozóides apirenes são en

voltas completamente por uma capuz elétron-denso (Fig. 5, 6, 7, 8 e 9), que aumenta o comprimento total e o diâmetro da aquelas porções (o conjunto mede cerca de 3,6  $\mu\text{m}$ );

b) na região apical, o referido capuz apresenta uma estrutura amorfa, que se torna filamentosa em regiões basais, onde dispõe-se sob a forma de anéis concêntricos, em corte transversal (Fig. 6);

c) em cortes longitudinais (Fig. 7, 8 e 9), a presença de um "corpúsculo basal" (comprimento aproximado = 0,5  $\mu\text{m}$ ) que, na realidade, como mostra a Fig. 6 (corte transversal) corresponde a uma coroa periférica de 9 microtúbulos acessórios, a qual circunscreve outra de 9 duplos periféricos, sem elementos centrais, envolto pela membrana plasmática e pelo capuz elétron-denso (nível 6);

d) na Fig. 6, as porções anteriores ("cefálicas") de espermatozoides apirenes, seccionadas transversalmente em diferentes alturas, mostram vários níveis de organização estrutural, desde regiões nas quais se distingue apenas o capuz apical até porções iniciais do axonema (nível 7).

## B.2. Flagelos

Os flagelos ou caudas constituem a maior parte de toda a extensão do corpo dos espermatozoides apirenes. Apresentam 2 regiões distintas:

- a) a *porção principal* composta pelo axonema (filamento axial) e os dois derivados mitocondriais;
- b) e a *porção terminal*, composta somente pelo axonema.

Porção Principal do Flagelo - Nos espermatozoides apirenes quase maduros (Fig. 10 e 11), observa-se que o axonema apresenta o padrão de organização 9-9+2 típico de espermatozoides de insetos, composto por uma coroa de 9 microtúbulos acessórios que circunscrevem outra coroa de 9 microtúbulos duplos periféricos e, no centro do axonema, por mais 2 microtúbulos únicos. Os microtúbulos acessórios elétron-densos, mais calibrosos ( $\varnothing$  aproximado de 340 Å) que os demais microtúbulos axonemáticos (Fig. 10, 11 e 13) e situados periféricamente, se localizam no espaço externo entre as duplas de microtúbulos periféricos apresentando projeções densas em direção aos sub-túbulos B das duplas (Fig. 10, 11 e 13). As duplas de microtúbulos periféricos são formadas por 2 subunidades distintas: o sub-túbulo A, completo, de menor diâmetro e com lúmen elétron-denso, a partir do qual projetam-se 2 pequenos braços curvos (braços de dineína), como bem mostram as Fig. 11 e 14, e o sub-túbulo B, incompleto, de maior diâmetro e com lúmen elétron-transparente (Fig. 11). Das duplas de microtúbulos periféricos partem fibras densas radiais em direção aos 2 microtúbulos centrais (Fig. 10, 11, 13 e 14). Estas fibras radiais apresentam pequenas dilatações próximas aos 2 microtúbulos centrais, que correspondem às cabeças dessas fibras e que foram anteriormente denominadas de "fibras secundárias" (terminologia em desuso). Nota-se, também, que os 2 microtúbulos centrais únicos, cujos lúmenes são elétron-transparentes, apresentam diâmetro (cerca de 230 Å) menor que o dos microtúbulos acessórios e projeções curvas individuais, as quais correspondem à bainha central que os envolve (Fig. 11 e 14).

Os dois *derivados mitocondriais* se estendem paralelamente

lamente junto ao axonema em quase todo seu comprimento, apresentando forma, volume, estrutura e elétron-densidade muito similares entre si. As secções transversais (Fig. 10 e 11) apresentam formato triangular, com as bases voltadas umas para as outras e os ápices orientados em direções aproximadamente ortogonais, numa peculiar disposição em "V". Estruturalmente, possuem envoltórios duplos (região cortical), no interior dos quais (região medular) observam-se áreas mais elétron-densas na região basal (Fig. 10 e 11), de natureza periódica (período aproximado de  $110 \text{ \AA}$ ). Esta estrutura para cristalina é observada mais nitidamente em espermatozóides contrastados negativamente (Fig. 16). Considerando-se o eixo de simetria que passa pelos 2 derivados mitocondriais e o eixo que passa pelos 2 microtúbulos centrais, cortando-os pela metade, observamos que o ângulo compreendido entre dois eixos corresponde a um desvio de aproximadamente  $10^\circ$  (Fig. 10 e 11). Contudo, em diversas outras elétrons-micrografias de espermatozóides apirenes, observamos que aquele ângulo pode variar muito (cerca de  $0^\circ$  a  $60^\circ$ ), o que indica não haver relação topográfica definida entre os derivados mitocondriais e o axonema, considerando-se os referidos eixos. Em cortes transversais de flagelos de espermatozóides apirenes, em regiões próximas às terminais, percebe-se geralmente a gradual diminuição simultânea do volume de ambos os derivados mitocondriais que parecem terminalizar juntos (Fig. 56, nível C) porém, às vezes, detectamos regiões flagelares quase terminais com apenas 1 derivado mitocondrial de tamanho bastante reduzido.

Ao redor do axonema e dos derivados mitocondriais, observamos a presença de membrana plasmática com estrutura trilaminar típica (Fig. 10 e 11). Contudo, não nos é possível afirmar sua provável assimetria.

Porção Terminal do Flagelo - A porção terminal de flagelos de espermatozoides apirenes apresenta somente axonema e este se desorganiza à medida que vai terminalizando. Em cortes transversais (Fig. 12), notam-se diferentes imagens que mostram nitidamente a gradual desorganização do axonema nas porções terminais dos flagelos. Os microtúbulos acessórios, que anteriormente apresentavam certa elétrondensidade de conteúdo, mostram lúmenes elétrontransparentes no axonema ainda organizado e são os primeiros a terminalizar, enquanto que, nos microtúbulos duplos periféricos, os sub-túbulos B se abrem e se destacam dos sub-túbulos A. Em níveis mais posteriores, aparecem apenas microtúbulos simples e em número cada vez mais reduzido (Fig. 12) até o desaparecimento de qualquer organização microtubular (Fig. 64).

### C. Espermatozoides Eupirenes ou Típicos

Os espermatozoides eupirenes são constituídos basicamente por uma *cabeça* alongada e fina e uma *cauda* (flagelo) muito longa e delgada, não havendo entre essas 2 porções uma região intermediária morfologicamente nítida como a região do pescoço dos espermatozoides de mamíferos. Não foi possível, ao nível de microscopia eletrônica, determinar a extensão total dos espermatozoides eupirenes devido ao seu avantajado comprimento que, provavelmente, é superior ao dobro do

comprimento dos espermatozóides apirenes.

### C.1. Região da Cabeça

Em cortes transversais, analisando-se de fora para dentro, a cabeça dos espermatozóides eupirenes apresenta-se circundada parcial ou completamente por uma coroa radial de *apêndices laciniados* (Fig. 22, 23 e 26), que se apresentam sob forma de pétalas com estrias elétron-densas transversais, separadas regularmente entre si por material elétron-transparente de aproximadamente 100 Å. A forma, o número, o comprimento e a disposição dos apêndices laciniados variam ao longo da cabeça do espermatozóide. Tais apêndices encontram-se acolados à membrana plasmática trilaminar que se justapõe, às vezes intimamente, ao envoltório nuclear da cabeça dos espermatozóides e a rodeiam quase completamente (Fig. 22, 23 e 26). Nas regiões anteriores da cabeça (Fig. 22 e 23), o núcleo apresenta-se parcialmente circundado por uma coroa radial de 13 a 20 apêndices laciniados, e, perifericamente, próximo à membrana da célula cística apical, nota-se a presença de um apêndice laciniado mais longo e diferenciado dos demais, que contorna alguns outros do mesmo tipo e, parcialmente, um outro apêndice ímpar, mais elétron-denso, bem diferenciado, igualmente em posição periférica, denominado de *apêndice reticular*.

Ao nível de regiões medianas e posteriores da cabeça (Fig. 26), observa-se que os apêndices laciniados, mais longos, delgados, em maior número, rodeiam completamente a cabeça dos espermatozóides, dispondo-se tão próximos uns dos outros que aparentemente perdem sua individualidade. O apên

dice reticular também muda gradualmente de forma, volume e posição. Como se observa ainda na Fig. 26, o apêndice reticular nunca é observado em justaposição ao núcleo, somente em relação à porção inicial do axonema (níveis 4 e 5), na qual ainda persiste a delgada porção final do núcleo.

Em corte longitudinal de porção anterior da cabeça de um espermatozóide eupirene (Fig. 24), os apêndices laciniados dispostos em ambos os lados ao núcleo mostram-se contínuos e o acompanham longitudinalmente, o que se observa também em relação ao apêndice reticular.

Em cortes transversais de regiões anteriores de cabeças (Fig. 22 e 23), destaca-se ainda uma área elétron-densa, extra-celular, aparentemente amorfa, situada entre as regiões aplanadas dos núcleos e a membrana da célula cística envoltória. Essa área, provavelmente, é formada por apêndices laciniados muito unidos entre si, nos quais não se percebe mais sua estriação transversal típica. Ainda nas Fig. 22 e 23, nota-se junto às faces achatadas dos núcleos, uma estrutura de aspecto vesicular, aplanada longitudinalmente, de menor elétron-densidade que a do núcleo, a qual também se observa na Fig. 26 (nº 1), em cortes medianos de cabeças de espermatozóides eupirenes. Nas regiões anteriores (Fig. 22 e 23), essa vesícula tubular é mais volumosa e nas posteriores (Fig. 26) é bastante reduzida ou ausente.

Em relação aos núcleos dos espermatozóides quase maduros (Fig. 22 e 23) e maduros (Fig. 26), nota-se, além de seu conteúdo cromatínico muito compactado, nítida variação de forma, volume e posição dos mesmos ao longo das cabeças. Em

porções mais anteriores (Fig. 23), o núcleo apresenta um formato de lua crescente que gradualmente aumenta de volume, tornando-se semi-circular (Fig. 22) e, em porções medianas das cabeças (Fig. 26/1), seu aspecto é um círculo quase completo. Não foi detectada a presença de *acrosoma* ao nível das porções apicais ou laterais das cabeças de espermatozóides e pirenas. Em porções mais apicais, foram observadas apenas pequenas secções nucleares.

Nas regiões medianas e posteriores das cabeças de espermatozóides típicos (Fig. 26), nota-se que:

- a) o núcleo de posição cêntrica e ocupando praticamente todo o volume cefálico (Fig. 26/1), passa a ocupar áreas cada vez menores e excêntricas (Fig. 26/2, 3, e 4), numa posição adjacente ao corpúsculo basal ou à porção inicial do axonema;
- b) o corpúsculo basal, na região terminal da cabeça, ocupando posição cêntrica, ora se apresenta como um cilindro elétron-denso (Fig. 26/2), ora como um cilindro com paredes elétrondensas e espaço central elétron-transparente (Fig. 26/3), cuja organização de centríolo típico não se evidencia.

## C.2. Flagelo ou Cauda

O longo flagelo dos espermatozóides típicos é composto basicamente, como o dos atípicos, por 2 porções diferenciados: a *principal* e a *terminal*.

A porção *principal* que abrange a maior extensão de todo o flagelo, é constituída:

- a) pelo axonema ou filamento axial;

- b) pelos derivados mitocondriais;
- c) pela membrana plasmática trilaminar envoltória;
- d) e pelos apêndices reticular e laciniados acolados ao plasmalema.

A porção *terminal* é constituída apenas pelo axonema envolto pela membrana plasmática rodeada parcialmente por apêndices laciniados muito reduzidos em número e tamanho e pelo apêndice reticular igualmente muito reduzido. Por ser uma região de pequena extensão, não conseguimos obter elétrôn-micrografias de boa qualidade e passíveis de publicação.

Porção Principal do Flagelo - Com o intuito de se obter uma exposição seqüencial a respeito dessa longa porção flagelar, nós a dividimos em 5 regiões distintas, a partir dos níveis mais anteriores até os mais posteriores, considerando-se basicamente as variações morfológicas apresentadas pela cobertura celular (apêndices laciniados e reticular) e pelo(s) derivado(s) mitocondrial(is). O axonema não se modifica estruturalmente ao longo dessa porção flagelar e a membrana plasmática apresenta a mesma estrutura trilaminar observada tanto em espermatozóides apirenes como em eupirenes.

A região nº 1 (região mais anterior da porção principal do flagelo) é ilustrada nas Fig. 25 (região elétrôn-transparente), 27, 28 e 34; a região nº 2 (porção imediatamente subsequente à anterior), nas Fig. 29, 30, 31, 32 e 33; a região nº 3 (porção mediana), nas Fig. 35, 36 e 37; a região nº 4 (porção mediana a posterior), nas Fig. 39, 41 e 42 e a região nº 5 (porção posterior), nas Fig. 38, 40 e 43.

Cobertura Extra-Celular - É composta pelos apêndices laciniados e reticular. Ao longo da superfície da porção principal de flagelos de espermatozóides eupirenes, observa-se que os apêndices *laciniados* mudam de número, forma, comprimento e disposição espacial, mantendo, porém, sua estriação transversal típica. Na região nº 1 (Fig. 27 e 28), os apêndices laciniados acolados ao plasmalema, em número de 15 a 18, são longos, delgados e contornam perifericamente o derivado mitocondrial único e o axonema, menos na área ocupada pelo apêndice reticular. Nota-se, tanto na Fig. 27 como na Fig. 28, que os apêndices laciniados, quando rodeiam o axonema, se dispõem em tufo de 1 a 3 elementos concentrados nas regiões próximas aos microtúbulos acessórios. Na região nº 2 (Fig. 29-33), os apêndices laciniados já não se dispõem mais ao redor do axonema, mas, às vezes, observam-se alguns remanescentes (Fig. 29), limitando-se quase que à periferia do derivado mitocondrial único. Seu número, agora, varia de 7 a 9 e seu formato continua petalóide, porém com base mais larga. Na região nº 3 (Fig. 35-37), observa-se que os apêndices laciniados, em número de  $8 \pm 1$ , já estão totalmente restritos à área periférica correspondente ao derivado mitocondrial e mostram ainda sua forma petalóide peculiar, porém são mais curtos e mais largos que os das regiões precedentes. Mantêm sua estriação transversal típica. Na região nº 4 (Fig. 39 e 42), observa-se que os apêndices laciniados, em número de  $10 \pm 1$ , continuam a circundar somente o derivado mitocondrial único, porém apresentam-se bem mais curtos. Na região nº 5 (Fig. 38 - cisto parcial à esquerda e Fig. 40), os apêndices laciniados estão muito reduzidos em tam-

nho, o que determina a dificuldade de visualização e determinação numérica.

Em relação ao apêndice *reticular*, que se assemelha a um bastão elétron-denso, de diâmetro variável, ao longo do flagelo de espermatozoides eupirenes, notamos sua posição definida próxima à dupla de microtúbulos periféricos nº 1 (destaque na Fig. 31) do axonema (notação de AFZELIUS, 1959). Em corte transversal, seu diâmetro é maior (cerca de 240-270 nm) na região nº 1 (Fig. 27 e 28) e vai diminuindo gradualmente ao longo do flagelo, até apresentar-se bem reduzido no volume, como na região nº 5 (Fig. 40). Sua forma, em secção transversal, é aproximadamente circular (Fig. 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33), com pequenas variações ao longo do flagelo (Fig. 35, 36, 37, 39 e 40). O apêndice reticular liga-se à membrana plasmática por meio de pequenos septos ou pontes, evidenciados nas Fig. 30 e 36. Nota-se, inclusive, em diferentes regiões da porção principal do flagelo, em corte transversal, a presença de pequenas vesículas de tamanhos variados (Fig. 32, 33 e 34) localizados entre o apêndice reticular e o laciniado mais próximo, na região adjacente ao plasmalema. Em corte longitudinal, observa-se com nitidez a presença de grande número dessas vesículas de tamanhos bastante variados (Fig. 34), as quais são encobertas pelo apêndice reticular. Nesta figura, inclusive, é evidente o aspecto contínuo tanto do apêndice reticular (que parece possuir estrutura finamente lamelar) quanto dos laciniados que se dispõem ao longo do flagelo. A superfície livre do apêndice reticular apresenta-se irregular com pequenas expansões filamentosas, nitidamente observáveis nas Fig. 28, 30,

31, 32, 33, 34 e 36.

Axonema - O filamento axial mantém sua estrutura característica ao longo de toda porção principal do flagelo do espermatozóide eupirene, como mostram, em corte transversal, as Fig. 27 a 33 e 35 a 40. Como na maioria dos insetos, os espermatozóides eupirenes apresentam o padrão de organização flagelar do tipo 9+9+2, já explicado para os espermatozóides apirenes. Os 9 microtúbulos acessórios apresentam diâmetro maior (cerca de 350 Å) que os demais microtúbulos axonemais e seu conteúdo é fortemente elétron-denso, assemelhando-se a grãos circulares, em corte transversal (Fig. 28, 31, 33, 36 e 37) e, em corte longitudinal (Fig. 43) parece ser um bastão elétron-denso que preenche completamente o lúmen (diâmetro aproximado de 210 Å) dos referidos microtúbulos. Observando-se as Fig. 28, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 39 e 40, percebe-se que cada microtúbulo acessório está situado numa região periférica compreendida entre o sub-túbulo A de uma dupla periférica e o sub-túbulo B da dupla mais próxima.

Como no axonema dos flagelos de espermatozóides apirenes, os 9 microtúbulos acessórios contornam uma coroa mais interna de 9 microtúbulos duplos periféricos, cujas sub-unidades A e B e os braços de dineína, projetando-se do sub-túbulo A, estão bem evidenciados nas Fig. 28, 30, 31, 32, 33, 36 e 37. Igualmente, das duplas periféricas (mais propriamente da sub-unidade A) partem fibras radiais elétron-densas em direção aos 2 microtúbulos centrais únicos (diâmetro aproximado de 280 Å), que apresentam conteúdo elétron-denso (os dos espermatozóides apirenes são elétron-transparentes),

porém de menor intensidade que o dos microtúbulos acessórios.

Derivados Mitocondriais - Em grande parte da extensão total da porção principal flagelar de espermatozóides eupirenes, destaca-se a presença de apenas 1 derivado mitocondrial (fig. 27-37 e 39), contudo na região flagelar nº 5 (Fig. 38 e 40), observam-se 2 derivados mitocondriais de volumes bem diferentes. O derivado mitocondrial maior já apresenta um volume reduzido em relação àquele mostrado na região flagelar nº 4 e o menor, com formato de meia-lua, é adjacente ao primeiro.

Na região nº 1 da porção principal do flagelo (Fig. 27 e 28), o derivado mitocondrial único, de pequeno tamanho, apresenta um formato semelhante a uma meia-lua, em secção transversal, e uma camada cortical mais elétron-densa na região oposta ao axonema. A face interna, próxima ao microtúbulo acessório correspondente à dupla de microtúbulos periféricos nº 3, é ligeiramente côncava. Nas secções transversais da região nº 2 (Fig. 29 a 33), observa-se que o derivado mitocondrial único, um pouco mais volumoso (maior eixo  $\approx$  160 nm e menor eixo  $\approx$  60 nm), mostra ainda as mesmas características morfológicas da região flagelar anterior, evidenciando-se ainda mais a parede elétron-densa da face convexa e a depressão côncava na face interna. A região medular do derivado mitocondrial apresenta menor elétron-densidade. Em relação ao plano de simetria que divide o derivado mitocondrial e que passa pelo microtúbulo acessório correspondente à dupla de microtúbulos periféricos nº 3, observa-se um ângulo de aproximadamente  $30^\circ$  desse eixo em relação àquele que corta os 2 microtúbulos cen-

trais do axonema (Fig. 31). Esse ângulo é observado ao longo de toda a extensão da porção principal do flagelo.

Nos cortes transversais da região nº 3 (Fig. 35 a 37), o derivado único mais volumoso (maior eixo  $\approx$  180 nm e menor eixo  $\approx$  130 nm), possui aspecto reniforme e uma camada cortical elétron-densa em toda a periferia, com um "botão" elétron-denso situado na concavidade da face interna, adjacente ao microtúbulo acessório nº 3 do axonema próximo. A região medular possui baixa elétron-densidade. Na região nº 4 (Fig. 39), o derivado mitocondrial único em secção transversal, é mais volumoso (maior eixo  $\approx$  320 nm; menor eixo  $\approx$  160 nm), porém suas características morfológicas são similares às descritas para a região anterior. Já na região flagelar nº 5 (Fig. 38 e 40), são observados 2 derivados mitocondriais. O maior (maior eixo  $\approx$  270 nm; menor eixo  $\approx$  190 nm) já apresenta um formato mais arredondado que na região precedente, e o menor (maior eixo  $\approx$  180 nm; menor eixo  $\approx$  80 nm) com formato de meia lua, apõe-se ao derivado mais volumoso como uma pequena calota. Em cortes oblíquos (Fig. 41 e 42) de derivados mitocondriais (região flagelar nº 4), observa-se que, em função do ângulo de corte, a camada cortical elétron-densa mostra, tanto na face convexa quanto na côncava, a presença de cristas modificadas que separam esta camada em septos regulares, menos na região do "botão" elétron-denso que corresponde a um eixo cortical longitudinal. As cristas modificadas, inclusive, se projetam em direção à região medular (Fig. 41). Um corte tangencial (Fig. 43) mostra que o derivado mitocondrial apresenta, na camada cortical, uma orientação helicoidal muito regular dos septos separados pelas cristas (dis

tância entre 2 cristas  $\approx 450 \text{ \AA}$ ) que mantêm com o eixo longitudinal do flagelo um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$ . Essa orientação em hélice também é ilustrada nas Fig. 41 e 42. Em corte longitudinal (Fig. 43, região à esquerda), essa disposição logicamente não é observada, porém concede à camada cortical, maior elétron-densidade. Este arranjo de cristas é observado ao longo de todo derivado mitocondrial já na região nº 1 (Fig. 34) onde a estriação das cristas pode ser distinguida na camada cortical. Em preparados de espermatozoides eupirenes, em contrastação negativa (Fig. 44 e 46), observa-se também com evidência a orientação helicoidal dos septos que compõem a camada cortical dos dois derivados mitocondriais de diâmetros diferentes. Além dessa disposição espiralada, verifica-se nas Fig. 45 e 46, a presença de "cordões" longitudinais elétron-densos na região medular dos dois derivados.

Em regiões flagelares, mais posteriores à de nº 5, observamos que os dois derivados mitocondriais apresentam volumes bastante reduzidos, porém ainda diferenciados, e que o derivado maior terminaliza após o menor.

Em relação às porções terminais de flagelos de espermatozoides eupirenes, não conseguimos obter nenhuma elétron-micrografia, entre as centenas produzidas, que nos permitisse a interpretação da terminalização do axonema.

### III. DESENHOS ESQUEMÁTICOS DE ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRE NES INTRA-TESTICULARES

#### 1. Esquema de Espermatozóides Eupirenes

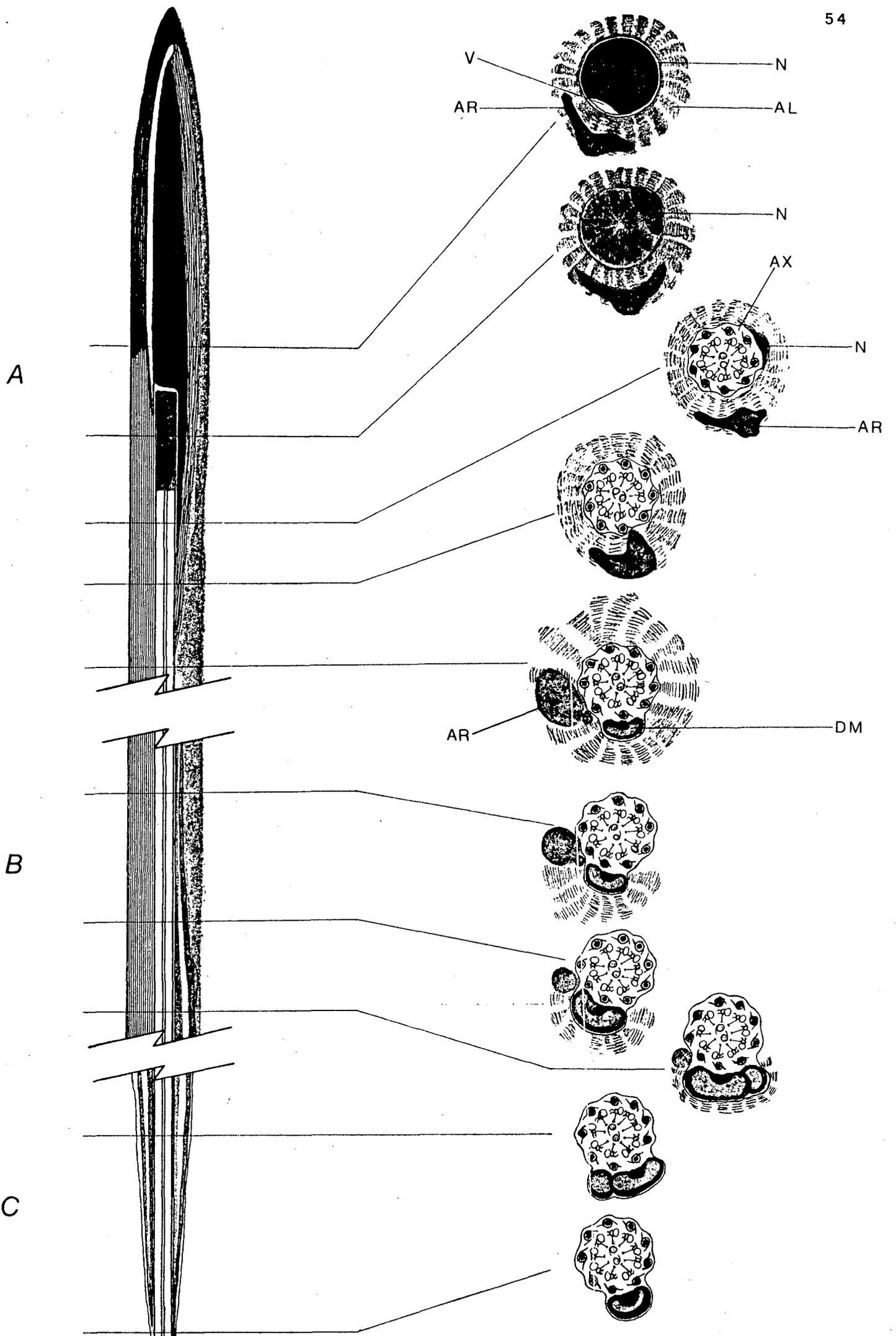
A figura 1 representa esquematicamente um espermatozóide eu-  
pirene, em corte longitudinal, considerando-se 3 segmentos distin-  
tos: (A) porção cefálica e região anterior da cauda; (B) região  
mediana a posterior da cauda; e (C) região posterior a terminal  
da cauda. Os segmentos (A), (B) e (C) apresentam secções transver-  
sais em diversos níveis, cujos detalhes ultra-estruturais estão  
representados ao lado.

LEGENDA: AL - Apêndice laciniado  
AR - Apêndice reticular  
AX - Axonema  
DM - Derivado mitocondrial  
N - Núcleo  
V - Vesícula

#### 2. Esquema de Espermatozóide Apirene

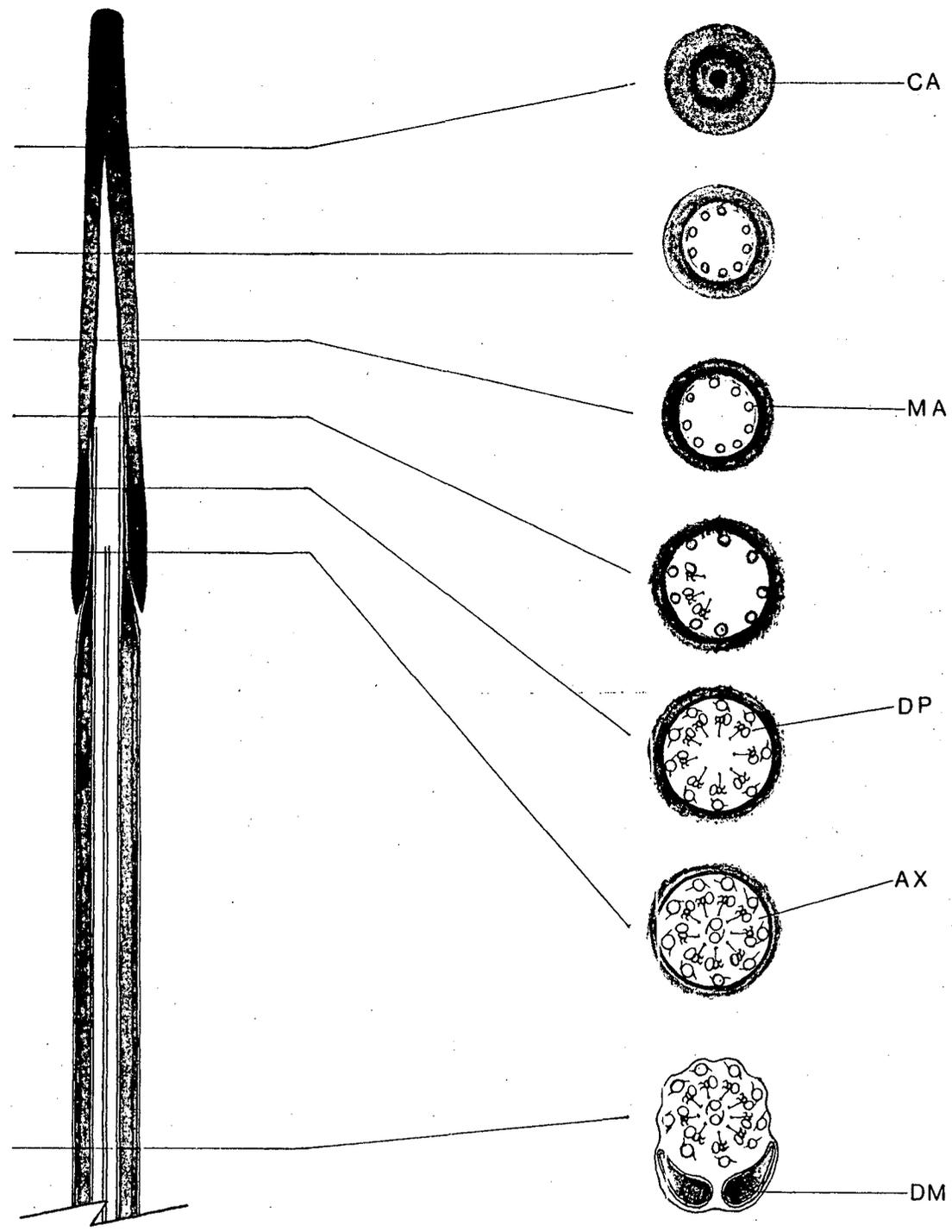
A figura 2 representa esquematicamente um espermatozóide api-  
rene, em corte longitudinal, seccionado em 2 segmentos: (A) porção  
mais anterior e região anterior a mediana do flagelo; e (B) re-  
gião posterior a terminal da cauda. Ao lado, estão representadas  
secções transversais mostrando detalhes da ultra-estrutura.

LEGENDA: AX - Axonema  
CA - Capuz anterior  
DM - Derivado mitocondrial  
DP - Dupla de microtúbulos periféricos  
MA - Microtúbulo acessório.

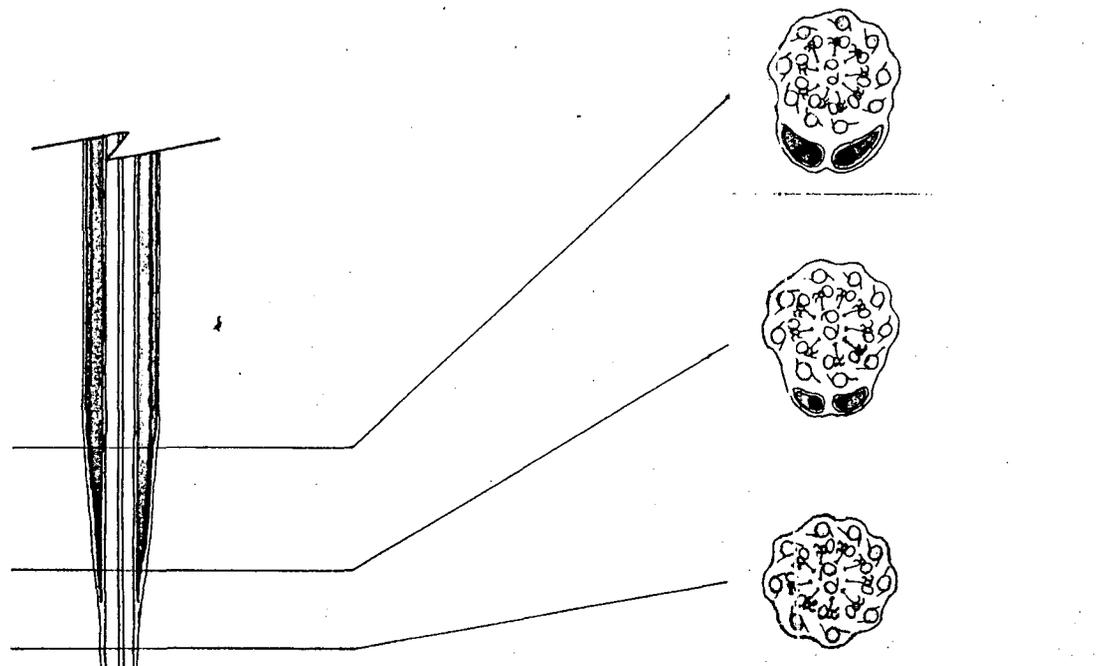


1. Esquema de Espermatozóide Eupirene

A



B



2. Esquema de Espermatozóide Apirene

*Handwritten signature*

#### IV. Resultados obtidos com vermelho de rutênio (Fixação III)

Não nos foi possível obter bons cortes ultra-finos de testículo de *Alabama* tratado com vermelho de rutênio, em função desse composto tornar o espécime muito quebradiço. Contudo, as Fig. 49 e 50 ilustram, respectivamente, espermátides eupirenes jovens e espermatozóides eupirenes, em corte transversal, tratadas com vermelho de rutênio. Na Fig. 49, observa-se nítida evidência do axonema, com destaque para os microtúbulos acessórios e as fibras radiais, ambos bem elétrôn-densos. Na Fig. 50, nota-se certa evidência das fibras radiais do axonema (apesar da falta de nitidez da estrutura total do mesmo, por ser corte não perfeitamente transversal), do apêndice reticular bem elétrôn-denso, dos apêndices laciniados menos elétrôn-densos que o reticular e da camada cortical elétrôn-densa do derivado mitocondrial único.

#### V. Espermatozóides Eupirenes e Apirenes Extra-testiculares ao nível do Trato Genital Masculino de Imagos de *Alabama argillacea*

##### A. Espermatozóides Eupirenes

Após sua liberação do testículo, conseqüente à desorganização dos respectivos cistos, os espermatozóides eupirenes mantêm-se ainda em feixes, nos quais se observam o alinhamento paralelo apresentado pelos espermatozóides dos feixes eupirenes intra-testiculares. Essa organização é mantida ao longo de todo o trato genital masculino (Fig. 51, 72,

75, 76, 77 e 78) graças à presença de *material elétron-denso extracelular* de aspecto filamentososo (Fig. 51, 52, 53, 72 e 73) ao nível da vesícula seminal ou aparentemente homogêneo e mais denso (Fig. 75, 76, 77 e 78), ao nível dos ductos ejaculadores duplo e simples. Esse material elétron-denso extracelular, existe em maior concentração na periferia de feixes de espermatozóides eupirenes, deixando mais livres os espermatozóides da área central do feixe (Fig. 51, 75 e 77). Contudo, ao nível das porções cefálicas dos espermatozóides eupirenes, o material extra-celular elétron-denso apresenta-se distribuído de modo mais uniforme em todo o feixe (Fig. 72).

Tanto ao nível da vesícula seminal (Fig. 51, 52 e 53) quanto ao nível do ducto ejaculador duplo (Fig. 72, 73, 75, 76 e 77) e simples (Fig. 78), os espermatozóides eupirenes não apresentam mais externamente os *apêndices laciniados* que caracterizavam sua cobertura celular ao nível do testículo. Contudo, uma estrutura similar ao *apêndice reticular* é ainda observada, em cortes transversais, em espermatozóides localizados tanto na vesícula seminal (Fig. 51 e 52) quanto no ducto ejaculador duplo (Fig. 72, 73 e 76), particularmente ao nível das cabeças (Fig. 72, 73 e 76) e de porções anteriores de flagelos (Fig. 51, 52 e 76). Em regiões flagelares mais posteriores (Fig. 77 e 78) de espermatozóides localizados tanto no ducto ejaculador duplo como no simples, os *apêndice reticulares* são muito reduzidos ou estão ausentes. Observa-se, inclusive, variação nas dimensões do referido apêndice, desde a porção anterior da cabeça dos espermatozóides (Fig. 73), onde sua forma é esférica e seu volume é menor (diâmetro  $\approx$  10 nm) até porções anteriores dos flagelos (Fig. 52)

onde é mais volumoso (maior eixo  $\approx 150$  nm; menor eixo  $\approx 120$  nm). Ao nível de porções anteriores de cabeças de espermatozóides eupirenes (Fig. 73) encontrados no ducto ejaculador duplo, o reduzido apêndice reticular de formato esférico situa-se numa leve depressão da capa externa. Já em porções anteriores de flagelos (Fig. 52), ao nível da vesícula seminal, os apêndices reticulares apresentam uma face em forma de cunha que se localiza numa depressão correspondente na capa envoltória. Contudo, não é possível verificar na Fig. 52, se a capa é contínua ou se interrompe na região de contato com o citado apêndice.

Quanto à posição do apêndice reticular, observa-se que há um desvio de aproximadamente  $20^\circ$  (Fig. 52), em relação à sua posição anterior em espermatozóides eupirenes intratesticulares.

Cada um dos espermatozóides eupirenes encontrados na vesícula seminal e nos ductos ejaculadores duplo e simples, apresenta-se individual e totalmente envolto por uma capa dupla (cerca de  $500 \text{ \AA}$  de espessura) observável nas Fig. 51, 52, 69, 72, 73, 75, 76, 77 e 78. Em corte longitudinal, esta capa (Fig. 69) apresenta uma estrutura estriada na sua porção externa, que se caracteriza por uma seqüência de bandas elétron-densas (cerca de  $80 \text{ \AA}$  de espessura cada uma), intercaladas por bandas mais delgadas elétron-transparentes. Tal organização estrutural parece indicar que a capa externa é formada por anéis dispostos longitudinalmente como mostram as Fig. 54 e 55, nas quais o envoltório externo apresenta uma estriação transversal regular destacada por contrastação negativa. A espessura de cada faixa anelar é aproximadamente i-

gual a 180 Å, mas em determinados pontos do envoltório pode variar de 80-100 Å, o que nos leva a crer que a capa externa dos espermatozoides eupirenes apresente certa elasticidade.

No interior das capas externas dos espermatozoides eupirenes, ao nível de vesícula seminal e ducto ejaculador duplo e simples, encontra-se uma massa de material elétron-denso (matriz elétron-densa) envolvendo parcialmente os espermatozoides. Nas porções cefálicas (Fig. 72 e 73) e porções anteriores flagelares (Fig. 51, 52 e 76) ocupa o maior volume, diminuindo notavelmente de tamanho em regiões flagelares mais posteriores (Fig. 77 e 78) parecendo mesmo tender a uma contínua e gradual diminuição, ocupando cada vez menos espaço interno, agora preenchido, em grande parte, pelo axonema e pelo volumoso derivado mitocondrial. Na vesícula seminal, observa-se que, em corte transversal ao nível de porções anteriores de flagelos de espermatozoides eupirenes, a volumosa matriz elétron-densa apresenta uma estrutura flocosa, parecendo ser formada por esférulas de conteúdo menos elétron-denso (Fig. 52). Aspecto semelhante apresenta a matriz elétron-densa que ocupa a maior parte das cabeças de espermatozoides eupirenes ao nível de ducto ejaculador duplo (Fig. 73). Contudo, em regiões flagelares mais posteriores àquelas da Fig. 52, a referida matriz densa apresenta-se com volume mais reduzido e seu aspecto é mais homogêneo (Fig. 77 e 78).

Em relação ao *derivado mitocondrial* mostrado na Fig. 78, em corte transversal de espermatozoides eupirenes no ducto ejaculador simples, observa-se, agora, a presença de uma pequena área elétron-transparente na face côncava junto ao axonema, que anteriormente era ocupada por um botão elétron-denso correspondente

ao eixo cortical interno que corria ao longo do derivado mitocondrial. Ao nível da vesícula seminal, em cortes longitudinais superficiais de derivados mitocondriais de espermatozóides eupirenes (Fig. 53), nota-se inclusive que as cristas modificadas mantêm sua estriação helicoidal (periodicidade de 450 Å aproximadamente), numa posição de  $\approx 45^\circ$  em relação ao longo eixo dos espermatozóides, como já havia sido detectado ao nível do testículo.

#### B. Espermatozóides Apirenes

Após sua liberação do testículo, os espermatozóides apirenes são encontrados, ao longo do trato genital masculino de imagos de *A. argillacea*, isoladamente ou em pequenos grupos distribuídos aleatoriamente ao redor dos feixes eupirenes próximos (Fig. 51 e 77). É comum observar-se, entre os espermatozóides atípicos, a presença de *grânulos de secreção* elétron-densos de tamanhos bastante variados (Fig. 51, 60, 70, 71 e 77), que são produzidos pelas células epiteliais secretoras da parede das vesículas seminais e do ducto ejaculador duplo (Fig. 74). Entre os espermatozóides apirenes (Fig. 56, 57, 58, 59, 60, 61, 64 e 70), também pode-se observar a presença de material elétron-denso finamente granular e, às vezes, com aspecto filamentososo, que não apresenta a mesma espessura nem disposição daquele material elétron-denso situado entre os espermatozóides dos feixes eupirenes ao nível da vesícula seminal.

As *modificações* ocorridas na cobertura celular dos espermatozóides apirenes são bem menos notáveis em compara-

ção com as apresentadas pelos eupirenes. Na vesícula seminal, os flagelos de espermatozóides apirenes, em corte transversal ao nível de porções medianas (Fig. 56 a 64), apresentam-se envoltos por uma capa elétron-densa (espessura cerca de 350 - 400 Å), a qual mostra ser constituída por fibrilas radiais elétron-densas que se projetam da membrana plasmática (Fig. 57 e 58). Na periferia, esta capa estriada (distância aproximada entre 2 estrias elétron-densas = 100 Å) apresenta maior elétron-densidade, assemelhando-se a uma fina camada homogênea da qual se projetam para fora e perpendicularmente à superfície, pequenas expansões filamentosas (Fig. 56, 57, 59, 61 e 64) que se dispõem de modo contínuo ao longo da superfície externa dos espermatozóides apirenes (Fig. 57), desde a porção mais anterior (Fig. 61/A) até a terminal (Fig. 64/H).

No *vas deferens* (Fig. 65), evidencia-se a natureza estriada anelar do envoltório de um espermatozóide apirene por meio de contrastação negativa e verifica-se que é muito semelhante àquela observada no envoltório de espermatozóides eupirenes (Fig. 54 e 55).

No ducto ejaculador duplo, verifica-se a mesma organização estrutural do envoltório de espermatozóides apirenes (Fig. 66 e 67) já detectada em órgãos precedentes do trato genital masculino. A distância entre 2 linhas transversais elétron-densas mais próximas é aproximadamente igual a 90 Å, que é o mesmo intervalo compreendido entre 1 linha elétron-densa espessa e outra mais fina intercalar, como é ilustrado na Fig. 54. Em cortes longitudinais (Fig. 68 e 71), tan

genciais (Fig. 71) e transversais (Fig. 70) de porções medianas e terminais de flagelos de espermatozóides apirenes localizados no ducto ejaculador duplo, observa-se que a capa envoltória pode ser formada por diversas camadas concêntricas, em maior número nas porções flagelares mais posteriores (Fig. 70). Na periferia dos flagelos de espermatozóides apirenes no ducto ejaculador duplo (Fig. 70 e 71) também são observadas expansões filamentosas similares àquelas já observadas na vesícula seminal, porém em maior frequência.

VI Espermatozóides Eupirenes e Apirenes ao nível da Bursa Copulatrix e Espermateca de Imagos Fêmeas de *Alabama argillacea*

A. Espermatozóides na Bursa Copulatrix

No conteúdo de espermatóforo contido na bursa copulatrix de fêmeas inseminadas (não determinamos o tempo compreendido entre a cópula e a dissecação dos espécimes), observamos espermatozóides eupirenes e apirenes juntos em grupos, porém os 2 tipos estavam distribuídos ao acaso. Em certas concentrações de espermatozóides, predominavam os eupirenes e, em outras, os apirenes, como é parcialmente ilustrado na Fig. 79, na qual se observam alguns espermatozóides apirenes seccionados transversalmente e próximos a um eupirene cortado longitudinalmente. Entre os espermatozóides, não observamos grânulos de secreção elétron-densos como aqueles que haviam sido detectados entre os espermatozóides apirenes ao longo de todo o trato genital masculino. Ao invés dos referidos grânulos, os

espermatozóides eupirenes e apirenes estavam imersos num material elétron-denso de aspecto homogêneo ou granular (Fig. 79-83) que, às vezes, formava volumosos grumos irregulares.

Os espermatozóides *eupirenes* observados ao nível da bursa copulatrix apresentam aspecto geral similar ao dos espermatozóides localizados no ducto ejaculador duplo. Contudo, na capa externa (ou bainha externa) observa-se uma nítida interrupção onde se evidencia a presença de uma pequena placa elétron-densa (Fig. 80) mais internamente. Esta região corresponde àquela onde se inseria o apêndice reticular. Comparando-se a Fig. 80 com a Fig. 52, verifica-se também que houve um desvio maior ainda dessa região em relação ao eixo ortogonal àquele que passa pelos dois microtúbulos centrais. Na vesícula seminal (Fig. 52), o desvio constatado era de aproximadamente  $20^{\circ}$  e, agora ao nível da bursa, este desvio fica em torno de  $70-80^{\circ}$ , o que parece indicar uma maior rotação de todo o envoltório em relação ao espermatozóide.

Com certa freqüência, observa-se na superfície das capas externas dos espermatozóides eupirenes, próximo ao axonema flagelar, a presença de protuberâncias situadas no lado oposto ao derivado mitocondrial maior (Fig. 81). Tais saliências correspondem às regiões por onde sairão os espermatozóides (Fig. 85) que irão participar da fertilização dos óvulos. Eventualmente, ainda ao nível da bursa copulatrix, são observados envelopes (capas externas + matriz amorfa elétron-densa) vazios de espermatozóides eupirenes (Fig. 83). É interessante notar que os microtúbulos acessórios e centrais do

axonema dos espermatozóides eupirenes apresentam ainda um ní tido conteúdo elétron-denso (Fig. 81).

Quanto aos espermatozóides *apirenes* localizados na bursa copulatrix (Fig. 79, 81 e 82), observa-se que mantêm i nalterada sua organização estrutural básica e que no seu envoltório (Fig. 81 e 82) destaca-se a capa externa estriada desprovida de filamentos, que circunda outras camadas internas concêntricas, semelhante ao que já foi descrito para os espermatozóides apirenes no trato genital de imagos machos. Não foram observados envelopes vazios de espermatozóides api renes.

#### B. Espermatozóides na Espermateca

Ao nível do receptaculum seminis ou espermateca (mais propriamente no utrículo) de fêmeas inseminadas, observamos, com freqüência, regiões nas quais se encontram um número considerável de espermatozóides eupirenes, entre os quais encontram-se poucos e esparsos espermatozóides apirenes (Fig. 84). Em outras regiões, observamos concentrações menores de espermatozóides apirenes com seus envoltórios dilatados, como é mostrado no espermatozóide apirene localizado no meio de eupirenes na Fig. 84. Nesses espermatozóides apirenes, observam-se alterações na forma, no volume e nos de rivados mitocondriais, que podem ser decorrentes de artefatos de fixação ou podem ser sinais indicadores de degeneração celular. Entre os pequenos grupos de espermatozóides apirenes, dispõem-se também longos feixes esparsos de filamentos imersos no material elétron-denso que preenche os espa-

ços compreendidos entre os espermatozoides apirenes, bem como entre os eupirenes (Fig. 84, 85, 87 e 88).

Os espermatozoides *eupirenes*, de tão próximos uns dos outros, apresentam com frequência espessamentos de suas capas externas ao nível de suas regiões de contato (Fig. 84, 85, 86 e 87). Comparando-os morfológicamente com aqueles observados ao nível da bursa copulatrix, detectamos pequenas modificações aparentes. Em termos de *envoltórios* (bainha externa + matriz amorfa elétron-densa), observou-se, algumas vezes, que a capa externa apresentava solução de continuidade na região das protuberâncias (Fig. 85) e não se observou nenhum rompimento do envoltório ao nível das placas densas, situadas opostamente às dilatações.

As cabeças e porções anteriores dos flagelos (Fig. 84 e 85) apresentam-se mais volumosas em função da quantidade considerável de material elétron-denso que preenche os envoltórios externos, circundando quase completamente os núcleos e os flagelos dos espermatozoides eupirenes. Nas regiões mais posteriores dos flagelos, esse acúmulo de material elétron-denso é menor, o que diminui o diâmetro dos espermatozoides, como mostra a Fig. 84. É interessante notar que a matriz apresenta áreas com diferentes elétrondensidades intercaladas por áreas elétron-transparentes (Fig. 84, 85, 87 e 88). Em corte longitudinal (Fig. 86), essas diferenças de elétrondensidade conferem à matriz um aspecto peculiar. Na superfície interna desse material elétron-denso volumoso, observa-se uma fina camada contornando o derivado mitocondrial e o axonema, a qual é formada por uma seqüência de esférulas que lhe dão o aspecto característico de "colar-de-contas"

Fig. 85 e 88).

Em relação ao axonema dos flagelos de espermatozóides eupirenes, nota-se, agora, que tanto os microtúbulos acessórios quanto os centrais se apresentam elétron-transparentes (Fig. 84, 85, 87 e 88). O derivado mitocondrial maior apresenta estrutura similar àquela observada em espermatozóides eupirenes ao nível do ducto ejaculador simples e da bursa copulatrix, mas observa-se que todos os derivados mitocondriais apresentam menor elétron-densidade (Fig. 84, 85, 87 e 88).

Às vezes, são observados, em determinadas regiões do utrículo espermatecal, agrupamentos de envelopes vazios (Fig. 89) de espermatozóides eupirenes, entremeados por alguns espermatozóides apirenes sempre com seus envoltórios íntegros.

## DISCUSSÃO

### I. Morfologia dos Aparelhos Reprodutores Masculino e Feminino de *Alabama argillacea* Hb.

A morfologia do aparelho reprodutor masculino de *A. argillacea* é muito semelhante àquela descrita para o noctuídeo *Peridroma margaritosa* (CALLAHAN & CHAPIN, 1960) e também apresenta certa similaridade com o aparelho reprodutor da mariposa *Rhyacionia buoliana* (Olethreudidae), descrito muito brevemente por SHEN & BERRYMAN (1967). Já o esquema geral, bem como a descrição do aparelho reprodutor masculino para os lepidópteros, em geral, apresentado por WIGGLESWORTH (1965) difere bastante daqueles descritos para as espécies anteriormente citadas, incluindo *A. argillacea*. Entretanto, a morfologia geral dos aparelhos reprodutores masculino e feminino de lepidópteros, esquematizados e descritos por IMMS (1957), serviu igualmente como orientação básica para o nosso trabalho, apesar de havermos notado certa contradição entre o esquema do aparelho reprodutor masculino e o texto explicativo correspondente, elaborados por aquele autor.

A organização morfológica do testículo único de *A. argillacea* é semelhante àquela já descrita para outros lepidópteros, incluindo noctuídeos (IMMS, 1957; CALLAHAN & CHAPIN, 1960; SHEN & BERRYMAN, 1967). Quanto aos ductos genitais masculinos e glândulas anexas de *A. argillacea*, há também muita semelhança com os que já foram descritos para outros noctuídeos (CALLAHAN & CHAPIN, 1960), mas há dessemelhança, às vezes muito significativa, em

relação aos esquemas propostos para os lepidópteros, em geral (IMMS, 1957; WIGGLESWORTH, 1965). Por exemplo, IMMS afirma que as vesículas seminais desembocam diretamente nas glândulas acessórias, as quais, por sua vez, "servem mais como receptáculo para estocagem de espermatozóides, uma vez que sua estrutura não é marcadamente glandular". Tal descrição não confere com a morfologia observada, inclusive ao nível de microscopia eletrônica, e descrita para *A. argillacea*. Provavelmente, IMMS estava se referindo ao ducto ejaculador duplo (o qual não foi mencionado pelo autor) que também possui atividade secretora, e não às glândulas acessórias, que não estão ligadas diretamente às vesículas seminais.

Quanto à organização morfológica do aparelho reprodutor feminino de *A. argillacea*, podemos afirmar que, em termos gerais, há certa semelhança básica como o que já foi descrito e esquematizado para outros noctuídeos (CALLAHAN & CHAPIN, 1960) e outros lepidópteros (IMMS, 1957), na organização geral, mas difere bastante quanto à forma, ao tamanho e à relação topográfica dos órgãos constituintes. Por exemplo, apesar de outros autores (CALLAHAN & CHAPIN, 1960; RIEMANN, 1970) que analisaram os aparelhos reprodutores femininos de outras três espécies de noctuídeos, terem encontrado espermateca bilobada, com utrículo e lagena bem distintos, nós apenas observamos espermateca unilobada (somente utrículo) em *A. argillacea*, o que nos leva a crer que espermateca bilobada não é característica de todos os noctuídeos.

## II. Caracterização Ultra-Estrutural de Espermatozóides Eupirenes e Apirenes Intra-testiculares

### A. Organização Testicular dos Cistos Eupirenes e Apirenes

Como em todos os insetos, os testículos de lepidópteros são formados de folículos que contêm cistos, nos quais se desenvolvem os espermatozóides. Em Lepidoptera, distinguem-se 2 tipos de cistos: os eupirenes e os apirenes que são encontrados totalmente separados nos testículos, como já foi observado em diversas espécies (SADO, 1963; ZILBERBERG, 1963; HOLT & NORTH, 1970; PHILLIPS, 1971; LEVIATAN & FRIEDLÄNDER, 1979) e, inclusive, em *A. argillacea*. Como já havia sido observado por PHILLIPS (1971), em 18 diferentes espécies de mariposas e borboletas, verificamos o *arranjo ordenado* dos cistos testiculares de *Alabama*, os quais apresentam maior maturidade no centro do testículo, ao contrário do que foi observado por LEVIATAN & FRIEDLÄNDER (1979) que aparentemente encontraram cistos eupirenes e apirenes distribuídos ao acaso no testículo da mariposa *Ectomyelois ceratoniae*.

Nossas observações quanto ao *grau de maturidade* dos espermatozóides eupirenes e apirenes, concordam com as de VIRKKI (1963), HOLT & NORTH (1970) e GELBIČ & METWALLY (1981) que encontraram nos testículos das mariposas *Trichoplusia ni*, *Bombyx mori* e *Spodoptera littoralis*, respectivamente, a maioria dos espermatozóides maduros e espermátides completando seu desenvolvimento. PHILLIPS (1971) fez observações simila

res em diferentes espécies de lepidópteros. Entretanto, há observações discordantes como as de SHEN & BERRYMAN (1967) e CHAUDHURY & RAUN (1966) que afirmam ter encontrado todos os estágios da espermatogênese no testículo de mariposas jovens, das espécies *Rhyacionia buoliana* e *Ostrinia nubilalis*, respectivamente, apesar de a maioria dos cistos ser constituída de feixes de espermatozóides maduros.

Em relação ao número de cistos eupirenes e apirenes, ZYLBERBERG (1963) verificou que a distribuição dos mesmos, em *Pieris brassicae*, variava ao longo da primeira semana de vida dos imagos, sendo raros os cistos apirenes nos três primeiros dias e que, nos dias subseqüentes, o número de cistos apirenes aumentava enquanto os de eupirenes diminuía até que, após uma semana, a maioria dos cistos era apirene. Nossas observações em testículos de imagos, de 1-7 dias, de *Alabama* se assemelham às daquela autora.

Quanto ao tamanho dos cistos, os eupirenes, em geral, são maiores em extensão e diâmetro que os apirenes, como já foi observado em *Pieris* por ZYLBERBERG (1963). Porém, encontramos em testículos de imagos de *Alabama* com aproximadamente 1 semana de idade, cistos atípicos muito maiores, em diâmetro, que os típicos, enquanto que a autora anteriormente citada afirma que os cistos atípicos de *Pieris* são sempre menores que os típicos. Nós presumimos que os cistos apirenes volumosos (com cerca de 500-750 espermatozóides) de *Alabama* sejam resultantes da fusão de 2 a 3 cistos, o que poderia explicar não só a existência desses grandes cistos, mas também o fato de termos encontrado somente nesses cistos regiões flagelares de espermatozóides em diferentes alturas. A

pesar de considerarmos plausível essa hipótese, é preciso a ventar a idéia de que esses números maiores de espermatozói des apirenes poderiam resultar de um número de mitoses sin crônicas goniais superior a 6, que é o número mais freqüente em Lepidoptera.

O número de espermatozóides apirenes e eupirenes , por cisto, mais freqüentemente registrado foi 256 (6 mitoses sincrônicas seguidas pela divisão meiótica), que é o núme ro típico de espermatozóides por feixe em Lepidoptera (VIRKKI, 1969, 1973; PHILLIPS, 1970a, 1971, 1974). Contudo, VIRKKI (1973) afirma que números superiores a 512 espermatozóides por feixe não são encontrados em insetos holometábolos, com o qual discordamos no que se refere particularmente aos es permatozóides apirenes de *Alabama*, uma vez que observamos de terminados cistos atípicos com 523 a 732 espermatozóides por feixe.

De acordo com a literatura revisada, o alinhamento paralelo dos espermatozóides eupirenes e apirenes nos cistos de *Alabama* e o fato de que em cada cisto observam-se todos os espermatozóides no mesmo nível de maturação devem-se às di visões goniais sincrônicas. O empacotamento muito regular, num padrão de organização hexagonal, dos espermatozóides eu pirenes de *Alabama*, ao nível de porções anteriores e medianas de flagelos, já havia sido observado em cistos eupirenes de outros lepidópteros (PHILLIPS, 1971) e em cistos normais de *Drosophila melanogaster* (TOKUYASU, PEACOCK & HARDY, 1972). Nós presumimos que tal conformação geométrica, inclusive ob servada no próprio lúmen do cisto, seja conseqüência das re lações estruturais entre os flagelos dos espermatozóides eu pirenes e as células císticas adjacentes. Estas células, ao

nível de regiões mais posteriores dos flagelos, apresentam-se mais delgadas, deixando praticamente os espermatozoides livres no lúmen do cisto, como foi observado por PHILLIPS (1970, 1971), VIRKKI (1969, 1973) e CRUZ-LANDIM & FERREIRA (1981) e também por nós em cistos eupirenes e apirenes de *Alabama*.

Como já havia sido verificado em diversas espécies de lepidópteros (ŌURA, 1966; ZYLBERBERG, 1969; VIRKKI, 1969, 1973; PHILLIPS, 1970b, 1971), em ortóptero (CRUZ - LANDIM & FERREIRA, 1981) e em díptero ( TOKUYASU, PEACOCK & HARDY, 1972), encontramos também as cabeças de espermatozoides eupirenes e apirenes de *Alabama* envoltas por uma grande célula cística, em cada tipo de feixe. A presença de mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático no citoplasma dos pseudópodos da célula cística que envolvem as cabeças de espermátides eupirenes quase maduras de *Alabama*, já havia sido apontada em *B. mori* (YASUZUMI & ŌURA, 1964 b, 1965a,b; ŌURA, 1966) e em *Myogriillus* sp. (CRUZ-LANDIM & FERREIRA, 1981). Estes últimos autores detectaram também a presença de partículas semelhantes a glicogênio no citoplasma das células císticas da espécie supra citada. Entretanto, nós somente verificamos a presença de partículas semelhantes às rosetas de glicogênio no citoplasma das células foliculares adjacentes às células císticas, o que nos leva a crer que, pelo menos, tais células exerçam função nutritiva.

## B. Espermatozóides Apirenes

### B.1. Porções Anteriores

As publicações a respeito da estrutura fina de extremidades anteriores de espermatozóides apirenes de outros lepidópteros mostram apenas elétrôn-micrografias de cortes longitudinais. Grande parte das informações encontradas por nós e descritas nos resultados foram obtidas através da análise e comparação de porções anteriores de espermatozóides a típicos de *Alabama*, tanto em corte longitudinal quanto transversal.

Como já havia sido observado em *Bombyx mori* (FRIEDLÄNDER & WAHRMAN, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) e em diversas outras espécies de lepidópteros (PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER, 1983), a porção anterior de espermatozóide apirene de *Alabama*, desprovida de núcleo, consiste numa pequena estrutura com forma de um cone truncado elétrôn-denso em corte longitudinal, situado numa posição anterior a outra estrutura semelhante a um centríolo. ZILBERBERG (1969) afirmou ter encontrado 1 centríolo, envolto numa estrutura helicoidal, em segmentos iniciais de espermátides quase maduras de *Pieris brassicae* e os autores anteriormente citados, com exceção de PHILLIPS, também identificaram aquela estrutura como sendo um centríolo. Entretanto, todas as elétrôn-micrografias mostradas por esses autores ilustram apenas porções apicais de espermatozóides ou espermátides apirenes em cortes longitudinais, os quais, sozinhos, não favorecem a identificação do padrão organizacional típico do centríolo.

Nós comparamos secções longitudinais com transversais de extremidades anteriores de espermatozóides apirenes de *Alabama* e concluímos que não existe um centríolo típico naquelas regiões "cefálicas". Na realidade, o "centríolo" observado pelos citados autores é uma estrutura um pouco maior que um centríolo típico (tanto em extensão quanto em diâmetro), formada por uma coroa dupla de microtúbulos (9 acessórios + 9 duplos periféricos), como bem ilustram as figuras 5 e 6. Além disso nenhum dos autores citados anteriormente mencionou, como nós o fizemos para *Alabama*, que a extremidade apical da porção anterior é formada apenas por microtúbulos acessórios que se justapõem intimamente, bem como não descreveram a diferenciação morfológica (extensão e estrutura) apresentada pelo capuz elétron-denso que envolve a coroa de microtúbulos.

Ainda em relação ao segmento anterior de espermatozóides anucleados, FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971), ao analisarem publicações de outros autores, propuseram uma interpretação alternativa das secções transversais de espermatozóides da mariposa *Chambus* mostradas por PHILLIPS (1970a), com a qual nós concordamos plenamente, em função de havermos também comparado a figura nº 15, mostrada por PHILLIPS, com as nossas figuras nº 5 e 6. A referida figura (nº 15) ilustra porções anteriores de espermatozóides apirenes, mas a interpretação original as descreve como porções nucleadas de espermatozóides, sem mencionar entretanto, o tipo de espermatozóide correspondente.

## B.2. Flagelos

A estrutura semelhante a um centríolo, localizada na porção anterior de espermatozóides anucleados, se continua no *axonema*, o qual apresenta o padrão de organização tubular 9+9+2 (9 microtúbulos acessórios + 9 duplos periféricos + 2 centrais) já identificado em outros lepidópteros (ANDRÉ, 1961; YASUZUMI & ŌURA, 1965b) e Trichoptera - ordem irmã de Lepidoptera (BACCETTI, DALLAI & ROSATI, 1970), que é típico para a maioria das espécies de insetos já analisadas (KAYE, 1964; KESSEL, 1967; PEROTTI, 1969; BAIRATI & PEROTTI, 1970; PHILLIPS, 1970a, b; WARNER, 1971, 1982; BACCETTI, 1972); GAMA *et al.*, 1976; CRUZ-LANDIM, 1979a,b).

Os microtúbulos acessórios e centrais da porção principal do axonema de espermatozóides apirenes de *Alabama* apresentam, como em outros lepidópteros (PHILLIPS, 1971), certa elétrons-densidade, porém nunca igual àquela dos túbulos acessórios de espermatozóides eupirenes.

O número, o tamanho, a forma, a disposição topográfica e a estrutura dos *derivados mitocondriais* de *Alabama* são semelhantes àqueles descritos em outras espécies de Lepidoptera (PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; RIEMANN & GASSNER III, 1973). Os 2 derivados mitocondriais de espermatozóide atípico de *Alabama* apresentam áreas matriciais com organização estriada de natureza paracristalina, cuja periodicidade é facilmente observável em preparados de contrastação negativa. Tais regiões de conteúdo cristalóide não são observadas em derivados mitocondriais de espermatozóides nuclea

dos. Contudo, os derivados mitocondriais de espermatozoides anucleados de *Alabama* e de outras espécies de lepidópteros (FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) não apresentam nenhum padrão especial na disposição das cristas, como é verificado em flagelos de espermatozoides eupirenes, em cortes longitudinais e oblíquos, bem como em contrastação negativa.

A natureza química do material paracristalino matricial dos derivados mitocondriais de espermatozoides de insetos é ainda objeto de investigação e especulações. BACCETTI *et al.* (1977) verificaram que o material paracristalino de derivado mitocondrial de espermatozoide de *Notonecta glauca* contém 2 polipeptídeos principais, muito semelhantes entre si, com alta porcentagem de prolina e insolúveis em SDS (sódio-dodecil-sulfato) devido a pontes de dissulfeto (-S-S-), e os designaram de *cristalomitinas*, concluindo que tais substâncias podem estar largamente distribuídas em espermatozoides de insetos.

Quanto às funções que poderiam ser desempenhadas por tais inclusões cristalóides, BACCETTI & AFZELIUS (1976) compilaram algumas hipóteses: (a) reserva nutritiva para as atividades metabólicas dos espermatozoides nos ductos genitais do inseto fêmea; (b) reserva nutritiva e/ou agente ativador para o zigoto; (c) enzimas respiratórias empacotadas no sentido de obtenção do máximo de eficiência respiratória; (d) função elástica, devido às ligações -S-S-, semelhante à ação das parerginas dos espermatozoides de moluscos e mamíferos. Considerando que: (1) nos espermatozoides apirenes localizados na bursa copulatrix de imagos fêmeas

de *A. argillacea*, nós não encontramos nenhuma modificação aparente nos "cores" paracristalinos dos derivados mitocondriais; (2) esse material apresenta-se fortemente elêtron-denso em espermatozóides apirenes estocados no receptaculum seminis; (3) os espermatozóides anucleados não participam da fertilização dos óvulos permanecendo na espermateca das fêmeas, onde degeneram; nós tendemos a aceitar como mais plausível a hipótese de que o material paracristalino dos derivados mitocondriais exerça uma função elástica, uma vez que já foi comprovado em *Drosophila melanogaster* (PEROTTI, 1973), que esse material permanece imutável durante a transferência e estocagem de espermatozóides nos insetos fêmeas, e ainda não foi confirmada a presença de enzimas respiratórias nesse material (BIGLIARDI *et al.*, 1970 e PEROTTI, 1975 - apud BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

### C. Espermatozóides Eupirenes

#### C.1. Porção Cefálica

Como já havia sido observado em outras espécies de lepidopteros (ANDRÉ, 1961, YASUZUMI & ŌURA, 1964 a,b, 1965 a, b; ZYLBERBERG, 1969; RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971, 1974; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) a superfície externa da cabeça dos espermatozóides eupirenes intra-testiculares de *A. argillacea* está completamente recoberta por uma manta radial de apêndices laciniados os quais, de tão próximos uns dos outros na porção anterior do núcleo, assemelham-se a uma série concêntrica de anéis. O

termo laciniado foi criado por ANDRÉ (1961) ao descrever os apêndices radiais estriados do lepidóptero *Macroglossum stelatarum*. O número, a forma e o tamanho de tais apêndices variam entre as diferentes espécies de Lepidoptera e também com o nível da secção, tanto na altura da cabeça quanto da cauda dos espermatozóides eupirenes (PHILLIPS, 1971, 1974), mas há certa semelhança estrutural entre os apêndices laciniados dos espermatozóides típicos intratesticulares em todas as espécies de borboletas e mariposas (PHILLIPS, 1971). Sua estriação regular característica apresenta pequena variação de periodicidade (de 90 a 125 Å) entre os espermatozóides típicos de diversas espécies de Lepidoptera já examinadas (YASUZUMI & ŌURA, 1965 a e b; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; PHILLIPS, 1971, 1974) e a periodicidade que constatamos em *Alabama*, tanto ao nível de núcleo quanto de cauda dos espermatozóides, foi de aproximadamente 100 Å, como também foi verificado por RIEMANN (1970) em apêndices laciniados de *Trichoplusia ni*, outro noctuídeo, e por YASUZUMI & ŌURA (1965a e b) em *Bombyx mori*.

Quanto à origem dos apêndices laciniados, FRIEDLÄNDER (1976) analisando principalmente regiões nucleares de espermátides eupirenes da mariposa *Ephestia cautella*, em processo de alongação, concluiu que os referidos apêndices evoluem a partir de uma coroa de microtúbulos intracelulares transitórios (origem intra-celular) e explicou que aqueles apêndices aparecem na superfície externa de espermatozóides maduros porque a membrana plasmática original da espermátide em maturação se desorganiza, sendo substituída por outra definitiva de

derivada das cisternas do retículo endoplasmático liso (REL). Essa proposição se opõe àquela apresentada por YASUZUMI & ŌURA (1965a , b) que explicaram a origem extra-celular dos apêndices laciniados em espermátides eupirenes de *B. mori*. Para os últimos autores, os referidos apêndices são derivados de uma estrutura denominada "banda clara", a qual se localiza junto à superfície externa da membrana plasmática que envolve as cabeças das espermátides em processo de alongamento. Entretanto, YASUZUMI & ŌURA não ilustram de modo necessário e suficiente sua hipótese a respeito dos "derivados de banda clara". Para nós, a origem dos apêndices laciniados continua uma questão em aberto, pois não está suficientemente esclarecida, apesar de considerarmos a hipótese da origem intra-celular como bastante convincente, apesar de não ter sido ilustrada com elétrôn-micrografias que mostrassem estágios intermediários de transformação de coroa de microtúbulos transitórios em apêndices laciniados.

A função desses apêndices continua totalmente desconhecida e somente YASUZUMI & ŌURA (1965 a , b) sugeriram que a manta radial poderia facilitar a atividade dos espermatozóides eupirenes por estar presente ao longo de todo o comprimento dos espermatozóides, mas não indicaram o modo pelo qual os "derivados de banda clara" (segundo os próprios autores) exerceriam tal facilitação.

Além dos apêndices laciniados, ao nível da cabeça de espermatozóides eupirenes de *Alabama*, observa-se a presença de outro apêndice, o *reticular*, numa posição mais periférica que os anteriores e sem contato com a membrana plasmática

ca. Tal estrutura de origem extracelular (YASUZUMI & ŌURA, 1965b; FRIEDLÄNDER, 1976) já havia sido observada, tanto ao nível de cabeças quanto de flagelos, em espermatozóides típicos de outras espécies de lepidópteros (ANDRÉ, 1961; YASUZUMI & ŌURA, 1965b; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972). As mudanças de forma, posição e tamanho do apêndice reticular observadas ao longo da cabeça de espermatozóides eupirenes de *Alabama* não foram descritas em outras espécies de *Lepidoptera*, com exceção daquelas observadas por RIEMANN (1970) em *Trichoplusia ni*, na posição e forma do "corpo satélite" (designação usada para este apêndice pelo referido autor) na porção anterior ao núcleo de espermatozóides eupirenes e por PHILLIPS (1971) que apontou a variação do diâmetro do apêndice reticular apenas ao nível de flagelo.

O apêndice reticular ímpar é morfologicamente muito diferente dos laciniados (PHILLIPS, 1971, 1974), parecendo ser constituído por uma série de filamentos ou lamelas muito finas, elétron-densas (RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971) que também foram observados em cortes *longitudinais* de apêndices reticulares em espermatozóides eupirenes de *Alabama*. Em outros lepidópteros as descrições morfológicas do apêndice reticular em corte transversal, são bastante variáveis, como a de PHILLIPS (1971) (estrutura em "favo-de-mel") e as de YASUZUMI & ŌURA (1965b) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) que descreveram o apêndice reticular de *B. mori* como agregado de pequenas vesículas ou esférulas elétron-densas, respectivamente.

Quanto à *origem* do apêndice reticular, somente YA-

SUZUMI & ŌURA (1965a,b) levantaram a hipótese de o mesmo ser também "derivado de banda clara" como os laciniados. As evidências apenas sugerem que o referido apêndice é de origem extra-celular com a qual concorda FRIEDLÄNDER (1976). A função do apêndice reticular continua obscura, apesar de os autores anteriormente citados presumirem que essa estrutura possa representar um aparato para pinocitose ou exocitose, considerando a estrutura fina observada por eles em *B.mori*. Tal hipótese não foi ainda confirmada e nós a consideramos improvável, uma vez que a estrutura do apêndice reticular, de natureza extra-celular, observada por nós em inúmeras elétrono-micrografias, não apresenta nenhuma similaridade com as já conhecidas vesículas de endo e exocitose de natureza membranosa. Quanto à natureza química do apêndice reticular, nós presumimos que este seja composto de glicoproteínas e/ou mucopolissacarídeos ácidos (glicosaminoglicanas), em função de havermos verificado maior contraste no referido apêndice quando tratamos espermatozoides intratesticulares com vermelho de rutênio (ANDERSON, 1968; ANDERSON & PERSONNE, 1973; LUFT, 1971 a,b).

A membrana plasmática que envolve as cabeças de espermatozoides nucleados de *Alabama* apresenta-se, às vezes, bem separada do envelope nuclear como também foi observado por RIEMANN (1970) em outro noctuídeo. O referido autor, inclusive, afirmou que o plasmalema dos espermatozoides eupirenes da espécie examinada aparece como uma membrana unitária simples. RIEMANN & GASSNER III (1973) também afirmaram que, ao examinarem o plasmalema de 5 diferentes espécies de *Lepidoptera* (entre as quais 3 noctuídeos), nunca encontraram uma membrana unitária típica. Já BACCETTI & AFZELIUS (1976) contestaram tais assertivas ao dizerem que os espermatozoides maduros de insetos são circundados por membrana trilaminar típica assimétrica, cuja presença nós constatamos em espermatozoides nucleados de *Alabama*, particularmente ao nível

das caudas, apesar de não havermos verificado sua provável simetria.

Em espermatozoides eupirenes de *Alabama*, nós não observamos a presença de *acrosoma*. Igualmente, FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972), ao analisarem as cabeças de espermatozoides nucleados de *B. mori*, bem como FRIEDLÄNDER & MIESEL (1977) em *Ephestia cautella*, não descreveram a existência de acrosoma. Contudo, PHILLIPS (1971) descreveu brevemente a presença, forma, posição e morfologia de um pequeno acrosoma nas cabeças de espermatozoides eupirenes de todas as 18 espécies de Lepidoptera examinadas por ele, porém o referido autor não publicou nenhuma elêtron-micrografia, nem elaborou nenhum esquema que pudessem ilustrar e corroborar suas assertivas. RIEMANN (1970) também descreveu a presença de acrosoma junto ao núcleo de espermatozoides eupirenes de *Trichoplusia ni* afirmando porém que "detalhes da estrutura do acrosoma não têm sido explorados" em Lepidoptera. O referido autor, para ilustrar o acrosoma, mostra uma figura muito semelhante à *estrutura tubular* achatada e adjacente ao núcleo que foi detectada em cabeças de espermátides e espermatozoides de *Alabama* e de outros lepidópteros (YASUZUMI & ŌURA, 1964a ; b, 1965a , b; ZYLBERBERG, 1969; FRIEDLÄNDER & WAHRMAN, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972). Apenas YASUZUMI & ŌURA (1964b) sugerem que a referida estrutura tubular (restrita às cabeças dos espermatozoides eupirenes) seja um sistema destinado a conduzir material nutritivo das células adjacentes para as espermátides em desenvolvimento, mas esta idéia não foi ainda confirmada e poderíamos questio

nã-la em função da persistência da estrutura tubular nos espermatozóides eupirenes maduros.

As características morfológicas (forma, posição, estrutura, extensão, elétrón-densidade) do núcleo de espermatozóides eupirenes de *Alabama* são semelhantes àquelas já descritas para outros lepidópteros (RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & WAHRMAN, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; FRIEDLÄNDER & MIESEL, 1977). Numa posição adjacente ao núcleo e posterior à vesícula tubular, na base da cabeça de espermatozóides eupirenes de *Alabama*, observamos a presença de uma estrutura semelhante a um corpúsculo basal que se continua no axonema. Porém, não pudemos detectar devido à sua grande densidade, se tal corpúsculo cilíndrico apresenta uma organização centriolar típica. Entretanto, PHILLIPS (1970a) afirmou que espermatozóides maduros de insetos (Coleoptera, Ephemeroptera, Diptera, Trichoptera, Homoptera, Hemiptera e Lepidoptera) não possuem nenhum centríolo, já que os centríolos desaparecem durante a espermiogênese. Mas, o próprio PHILLIPS (1966) já havia descrito a existência de 1 centríolo em espermatozóides maduros de *Sciara coprophila* (Diptera). Em adendo, BACCETTI & AFZELIUS (1976) afirmam ser importante notar a ausência de 1 centríolo distal clássico em espermatozóides de insetos. Em contraposição, FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) afirmam ter constatado a presença de 1 centríolo verdadeiro em espermátides e espermatozóides intra e extra-testiculares, respectivamente, de *B. mori*. Os primeiros autores contestam a afirmação de BRELAND, BARKER & EDDLEMAN (1967) e BRELAND *et al.* (1968) que afirma-

ram ter encontrado 2 centríolos em espermatozóides de várias espécies de insetos. FRIEDLÄNDER & WAHRMAN (1971) afirmam, inclusive, ser muito difícil aceitar a idéia de PHILLIPS (1970a) sobre a ausência de centríolo em todos os espermatozóides maduros de insetos, porque esses autores observaram centríolos em espermatozóides maduros de diferentes espécies de Lepidoptera, Neuroptera, Orthoptera e Mantodea. Em adendo, afirmaram haver dificuldade no reconhecimento do centríolo quando sua organização típica se torna obscura durante a espermioogênese, o que poderia ser o caso em espermatozóides eupirenes de *Alabama*.

#### C.2. Flagelo

Ao longo da superfície flagelar de espermatozóides eupirenes de Lepidoptera, incluindo *Alabama*, nota-se também a presença de apêndices laciniados, porém estes diminuem gradualmente de número, forma e tamanho, modificando igualmente sua posição em relação ao axonema e derivado mitocondrial maior ao longo do flagelo (RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971). Já FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) afirmaram que os apêndices laciniados de espermatozóides nucleados de *B. mori* não se dispõem ao redor do axonema, o que não confirmamos em *Alabama*, pois, em níveis mais anteriores do flagelos, os apêndices laciniados se dispõem ao redor de toda a periferia flagelar. Ao contrário de ANDRÉ (1961), nós verificamos a presença de apêndices laciniados em grande parte da extensão flagelar, apesar de bastante reduzidos em número e tamanho em regiões mais posteriores da cauda. Inclusive, não encontramos na literatura

consultada os detalhes morfológicos (descritos por nós) relativos a vários aspectos (número, forma, extensão, posição) dos apêndices laciniados ao longo do flagelo de espermatozoides eupirenes.

A posição do apêndice reticular é constante em relação ao axonema (ANDRÉ, 1961; PHILLIPS, 1971, 1974; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) e, em *Alabama*, a sua posição típica é sempre junto à dupla de microtúbulos periféricos nº 1 (notação de AFZELIUS, 1959), como também foi apontado em *Macroglossum* (ANDRÉ, 1961). Como PHILLIPS (1971), nós também observamos a gradual diminuição de diâmetro do apêndice reticular ao longo do flagelo. Particularmente em porções medianas de flagelos de espermatozoides eupirenes de *Alabama*, verificamos a presença de septos ligando o apêndice reticular à membrana plasmática. Tais pontes já haviam sido descritas em outros *Lepidoptera* (YASUZUMI & ŌURA, 1965b; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971).

O axonema flagelar de espermatozoides típicos de *Alabama* apresenta o típico padrão de organização 9+9+2, já anteriormente discutido, muito semelhante estruturalmente aos filamentos axiais de outros *Lepidoptera* (ANDRÉ, 1961, 1962; ZYLBERBERG, 1969; RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971, 1974; RIEMANN & GASSNER III, 1973), nos quais os 2 microtúbulos centrais e os 9 acessórios apresentam lúmenes elétron-densos. Porém, os túbulos acessórios (maior  $\emptyset$ ) são preenchidos por conteúdo fortemente elétron-denso, que aumenta mais de contraste quando tratados com vermelho de rutênio, evidenciando a provável presença de glicoproteínas e/ou glicosaminoglicanas (ANDERSON, 1968; LUFT, 1971 b). A função dos microtúbulos

acessórios não está ainda esclarecida. Apesar de certos autores (ANDERSON & PERSONNE, 1973) suporem que sejam elementos motores adicionais, BACCETTI & AFZELIUS (1976) duvidam de tal su posição pois os túbulos acessórios não são contráteis. Em função de havermos verificado que, ao nível da espermateca da fêmea de *Alabama*, os microtúbulos acessórios se apresentam to talmente elétron-transparentes, nós sugerimos que seu conteúdo mucopolissacarídico tenha sido utilizado como reserva nutritiva para o transporte dos espermatozóides eupirenes da bursa copulatrix até a espermateca. Nas *porções terminais* dos flagelos, há diferenças quanto à seqüência de desorganização dos microtúbulos entre as diversas espécies de lepidópteros (ANDRÉ, 1961, 1962; ZYLBERBERG, 1969; BACCETTI & AFZELIUS, 1976).

A existência de 2 *derivados mitocondriais*, de tamanhos diferentes, que correm paralelamente ao axonema, em espermatozóides típicos de *Alabama*, já havia sido descrita para outros lepidópteros, inclusive noctuídeos (ANDRÉ, 1961; ZYLBERBERG, 1969; RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971, 1974; RIEMANN & GASSNER III, 1973). De acordo com a classificação proposta por ANDRÉ (1962), podemos incluir os derivados mitocondriais de flagelos de espermatozóides típicos de *Alabama* no grupo 3, pois sua arquitetura original é completamente modificada (ver verdadeira "metamorfose"), resultando na estrutura periódica de sua camada cortical. A organização regular e típica dessa ca mada dos derivados mitocondriais de espermatozóides eupirenes de *Alabama*, evidenciada em cortes longitudinais e oblíquos e por contrastação negativa, se assemelha àquela descrita para derivados de outros lepidópteros (ANDRÉ, 1962; ZILBERBERG, 1969; RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971; RIEMANN & GASSNER III,

1973). Entretanto, na *camada medular* não observamos a mesma organização lamelar descrita por ANDRÉ (1962) nos derivados mitocondriais de *Pieris* e *Macroglossum*, pois o conteúdo medular observado em derivado de *Alabama* apresenta-se aparentemente amorfo, tanto em corte transversal quanto longitudinal, semelhante ao que foi descrito por PHILLIPS (1971).

### III. Espermatozóides Eupirenes e Apirenes Extra-testiculares ao nível do trato genital masculino de *A. argillacea*.

Existe um número muito reduzido de publicações a respeito de modificações apresentadas pelos espermatozóides eupirenes e apirenes ao nível de determinados órgãos do trato genital masculino e feminino de lepidópteros (PHILLIPS, 1970a, 1971; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; RIEMANN & GASSNER III, 1973). As descrições mais detalhadas a respeito de espermatozóides extra-testiculares no trato genital masculino e feminino de Lepidoptera foram elaboradas por RIEMANN (1970) e RIEMANN & THORSON (1971), respectivamente, em *Trichoplusia ni* (Noctuidae) e *Anagasta kuhniella* (Pyralididae), e por RIEMANN & GASSNER III (1973) em espermateca de 5 espécies de mariposas praga de plantações, entre as quais 3 noctuídeos (*Heliothis zea*, *H. virescens* e *Spodoptera frugiperda*).

Comparando nossas observações em *Alabama* com as dos autores acima citados, encontramos similaridades e diferenças que passaremos a discutir.

#### A. Espermatozóides Eupirenes

Como já havia sido observado em espermatozóides eupirenes extra-testiculares de *Bombyx mori* (FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972), *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970; HOLT & NORTH, 1970), *Anagasta kllhniella* (RIEMANN & THORSON, 1971) e de várias outras espécies de lepidópteros analisados por PHILLIPS (1971), os espermatozóides eupirenes de *A. argillacea* também permanecem organizados em feixes ordenados ao longo de todo o trato genital masculino de imagos até serem transferidos à bursa copulatrix.

Em relação ao material denso filamentoso ou aparentemente amorfo que envolve totalmente as cabeças e parcialmente os flagelos de espermatozóides eupirenes localizados na vesícula seminal e no duplex de *Alabama*, há certa semelhança morfológica com o material elétron-denso descrito em feixes eupirenes de *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970) e *A. kllhniella* (RIEMANN & THORSON, 1971), localizados na vesícula seminal e também no duplex. Esses autores, inclusive, sugerem que pela aparência dos filamentos espessos, estes poderiam ser derivados das membranas das células císticas que se desagregaram ao nível do testículo, mas afirmam também que a real origem de tal matéria intercelular não foi ainda determinada. Nós presumimos, baseados igualmente no aspecto de tal material elétron-denso, que este poderia ter se originado a partir do próprio material secretado pela vesícula seminal e pelo duplex, inclusive, em função da presença de freqüentes grânulos de secreção ao redor dos feixes eupirenes e entre os espermatozóides apirenes. PHILLIPS (1971) apenas se refere a

um "material extra-celular amorfo" localizado entre as células dos feixes eupirenes, ao nível do *vas deferens* de lepidópteros analisados, sem contudo se reportar a detalhes morfológicos mais específicos ou à possível origem do mesmo.

FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) e PHILLIPS (1970a) nem sequer mencionam a existência de qualquer tipo de material extra-celular que mantenha os espermatozoides eupirenes extra-testiculares agregados em feixes. Em relação ao significado funcional da reorganização e manutenção dos feixes eupirenes até depois de sua transferência para a bursa copulatrix das fêmeas, RIEMANN (1970) afirma que pode estar relacionado com o papel dos espermatozoides apirenes, pois supõe que deva existir "algum tipo de interação entre os 2 tipos de espermatozoides" e que isto poderia explicar a manutenção em feixes dos espermatozoides eupirenes.

Como todas as espécies de Lepidoptera já analisadas (PHILLIPS, 1970a, 1971; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; FRIEDLÄNDER, 1983) os espermatozoides eupirenes extra-testiculares de *Alabama argillacea* também não mais apresentam a típica coroa radial de apêndices laciniados que cobriam sua superfície celular ao nível do testículo. Ao invés dessa cobertura de apêndices radiais, os espermatozoides típicos são agora circundados por um material elétron-denso (PHILLIPS, 1971) ou matriz elétron densa (FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) que adere à superfície celular e que é totalmente coberto por um novo envoltório cilíndrico (PHILLIPS, 1970a, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972), os quais correspondem, respectivamente, às bainhas interna e externa descritas por RIEMANN (1970) e RIEMANN & THORSON (1971).

Existe certa similaridade morfológica entre a capa envoltória de estrutura estriada e anelar de espermatozoides eupirenes extra-testiculares de *Alabama* e a bainha externa de aspecto estriado de espermatozoides típicos de *Anagasta* (RIEMANN & THORSON, 1971), localizados ao nível da vesícula seminal e do ducto ejaculador duplo. Contudo, nenhum dos autores já citados fez qualquer referência à diferenciação morfológica da matriz elétron-densa (bainha interna) dos espermatozoides nucleados analisados em diferentes espécies de *Lepidoptera*, como aquela que foi descrita por nós em *Alabama*, ao nível da vesícula seminal, do duplex e do simplex.

Quanto à origem dessa complexa bainha envoltória que recobre todos os espermatozoides eupirenes extra-testiculares de *Lepidoptera*, há alguma controvérsia a respeito. PHILLIPS (1971) sugere que os apêndices laciniados presentes na superfície de espermatozoides típicos intra-testiculares, se desagregam na entrada do *vas deferens* e, então, se reagregam para formar uma bainha de material elétron-denso ao redor tanto dos espermatozoides eupirenes quanto dos apirenes, contribuindo, inclusive, para a formação do material extracelular amorfo que mantém em feixes os espermatozoides eupirenes nos *vasa deferentia*. FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) concordam parcialmente com PHILLIPS, pois também encontraram na matriz elétron-densa de espermatozoides típicos restos de apêndices laciniados, porém discordam ao alegarem que não encontraram nenhuma indicação de que as capas envoltórias fossem derivadas daqueles apêndices. Em adendo, RIEMANN (1970) afirma que não se sabe de que modo os apêndices laciniados que ele chama de "derivados de banda clara" de acordo com a

denominação proposta por YASUZUMI & ŌURA (1964 a, b , 1965a, 1965b) contribuem realmente para a formação do novo material circundante. Entretanto, RIEMANN & THORSON (1971) afirmam que já é sabido que os apêndices laciniados "não são convertidos *in situ* na bainha, porque eles se tornam destacados das células antes da formação da bainha", mas consideram igualmente que seria possível uma participação indireta dos "derivados de banda clara" na formação da bainha envoltória dos espermatozóides eupirenes. Das assertivas anteriores, pode-se inferir que a origem das bainhas envoltórias permanece sem conclusões definitivas, mas apenas especulativas. Nós podemos presumir, em adendo às colocações anteriores, que a formação das bainhas envoltórias pode estar relacionada não somente à desorganização estrutural dos apêndices laciniados, como também com o lisado resultante da desagregação das células císticas durante a liberação dos espermatozóides do testículo, ou, até mesmo, com o material secretado ao nível dos ductos genitais masculinos.

Quanto ao possível papel que as bainhas envoltórias possam desempenhar, FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) propõem que "elas possam funcionar na proteção de ambos os tipos de espermatozóides durante sua passagem para a espermateca da fêmea", onde sua função aparentemente termina, uma vez que os espermatozóides típicos abandonam seus envoltórios antes de deixarem o receptaculum seminis. Já RIEMANN & THORSON (1971) afirmam que "a função da bainha envoltória de espermatozóides eupirenes em *Anagasta* é inteiramente especulativa". Consideram que o desenvolvimento gradual de uma estrutura altamente ordenada na bainha de espermatozóides típicos no espermatófo

ro da bursa copulatrix de *Anagasta* parece indicar um papel metabólico, uma vez que este desenvolvimento parece estar relacionado com o início da motilidade daquele tipo de espermatozoides algumas horas após a desorganização dos feixes. Lembrem, contudo, que ainda é preciso determinar se realmente os dois fenômenos são correlatos. Como em *Alabama*, não se desenvolve na matriz elêtron-densa amorfa de espermatozoides eupirenes na bursa, uma estruturação altamente ordenada como a de *Anagasta*, nós concordamos com FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) e supomos que o papel básico da matriz juntamente com o envoltório externo esteja realmente relacionado com a proteção dos espermatozoides eupirenes no seu trânsito ao longo dos tratos genitais masculino e feminino.

Em resumo, se compararmos morfologicamente as bainhas envoltórias de espermatozoides eupirenes extra-testiculares de *A. argillacea* com as descritas em outras espécies de lepidópteros, nós podemos afirmar que apesar de haver consideráveis diferenças na complexidade organizacional dessas bainhas, existe muita similaridade, o que nos leva a afirmar como RIEMANN & THORSON (1971) quando concluíram que "a formação de espermatozoides eupirenes com bainhas complexas ao redor da membrana plasmática é provavelmente característica de Lepidoptera".

A presença do *apêndice reticular* - "corpo satélite" para RIEMANN (1970) e RIEMANN & THORSON (1971) - ainda associado a um determinado local (placa densa) do envoltório de espermatozoides eupirenes, foi detectada em várias espécies de Lepidoptera (PHILLIPS, 1970a, 1971; RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) e nós, i-

gualmente, observamos sua persistência nos envoltórios exter nos de espermatozóides típicos extra-testiculares de *Alabama*, principalmente ao nível da vesícula seminal. No duplex e sim plex, ao nível dos flagelos, o apêndice reticular não era mais detectado ou sua presença era apenas vestigial. Tal si tuação do apêndice reticular não foi apontada pelos autores anteriormente citados, os quais também não registraram qual- quer observação relativa a desvios da posição original do re ferido apêndice, acompanhando uma provável rotação de envol- tório, como aquela que foi detectada em espermatozóides eupi- renes de *Alabama* na vesícula seminal. Esse efetivo desvio po sicional do apêndice reticular não nos parece artefato de técnica, contudo sua razão ainda é desconhecida.

#### B. Espermatozóides Apirenes

Os espermatozóides apirenes localizados ao nível da vesícula seminal, do duplex e do simplex de *Alabama*, apresen- tam-se dispersos ao redor dos feixes eupirenes e envoltos por capas concêntricas, contínuas e estruturalmente similares à- aquelas descritas em outras espécies de Lepidoptera (RIEMANN, 1970; HOLT & NORTH, 1970; PHILLIPS, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972). Há diferenças, contudo, quanto ao número de ca pas concêntricas que varia de acordo com a espécie, com o nível no trato genital masculino e com o nível de corte dos espermato- zóides apirenes (PHILLIPS, 1971).

Em *Alabama*, nós também observamos, em concordância com PHILLIPS, um maior número de capas concêntricas em níveis mais posteriores de flagelos. A capa mais externa do envol-

tório de espermatozóides atípicos de *A. argillacea* ao nível do *vas deferens*, da vesícula seminal e do duplex, apresenta uma organização estrutural semelhante àquela mais externa dos espermatozóides eupirenes, como também já havia sido observado em *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970), na vesícula seminal, e em *Bombyx mori* (FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972), no ducto ejaculador.

Apesar de RIEMANN (1970) haver somente detectado "a presença de numerosas projeções finas se estendendo para fora e ao redor da bainha" dos espermatozóides apirenes, ao nível do duplex, nós observamos tais projeções filamentosas em espermatozóides apirenes de *Alabama*, tanto na vesícula seminal quanto no ducto ejaculador duplo. Concordamos com RIEMANN (1970) quando afirma que tais "projeções não puderam ser detectadas ao redor de espermatozóides apirenes após terem deixado o duplex e possivelmente representam o resultado de interações superficiais entre os espermatozóides e o material secretado circundante".

Como PHILLIPS (1970a), RIEMANN (1970) e FRIEDLÄNDER & GITAY (1972), nós também não observamos nenhum material elétron-denso (similar à matriz amorfa dos eupirenes) extracelular localizado abaixo das capas envoltórias (diretamente em contato com a membrana plasmática) dos espermatozóides apirenes.

Em *Trichoplusia ni* (Noctuidae), RIEMANN (1970) encontrou entre os espermatozóides apirenes, ao nível da vesícula seminal, filamentos espessos como aqueles envolvidos na reorganização dos feixes eupirenes. Contudo, entre os esper

matozóides apirenes de *Alabama*, observados na vesícula seminal, nós apenas detectamos a presença de material filamentosso fino, de aspecto bem diferente daquele localizado entre os espermatozóides eupirenes, além de inúmeros grânulos de secreção elétron-densos e de variados tamanhos.

#### IV. Espermatozóides Eupirenes e Apirenes no Trato Genital Feminino de *Alabama argillacea*

Nós não observamos mais a persistência de feixes eupirenes até depois de os espermatozóides serem transferidos à bursa copulatrix do trato genital feminino de *Alabama*. Contudo, em fêmeas recém-inseminadas de *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970), *Anagasta kühniella* (RIEMANN & THORSON, 1971) e *Bombyx mori* (FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972) foram ainda observados feixes de espermatozóides eupirenes que se desorganizaram rapidamente após a cópula. Nossas observações em espermatóforo contido na bursa copulatrix de fêmeas inseminadas de *A. argillacea*, conferem com as de PHILLIPS (1971) que também não encontrou feixes eupirenes no espermatóforo das 4 espécies de Lepitoptera que examinou. Contudo, como não determinamos o tempo decorrido após a cópula, o que igualmente não foi feito por PHILLIPS, provavelmente os feixes eupirenes já estivessem desorganizados, considerando que os mesmos perdem sua organização logo após a transferência dos espermatozóides eupirenes para as fêmeas (RIEMANN, 1970; HOLT & NORTH, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; RIEMANN & GASSNER III, 1973).

Tanto ao nível de bursa copulatrix, como de esper-

mateca de fêmeas de lepidópteros, encontram-se espermatozoides eupirenes e apirenes dispersos entre si e em grupos de tamanhos variados, como já foi observado pelos autores anteriormente citados e por PHILLIPS (1970a, 1971). Em *Alabama*, nós detectamos grupos mistos de espermatozoides eupirenes e apirenes, tanto ao nível de bursa quanto de espermateca, contudo os grupos eram menos densos na bursa que no receptaculum seminis, onde os espermatozoides eupirenes formavam densos agrupados com esparsas células apirenes intercaladas.

Os espermatozoides *apirenes* de *Alabama* observados na *bursa copulatrix*, apresentam-se envoltos por capas com estrutura similar àquela dos apirenes observados nos ductos genitais masculinos e as capas externas são igualmente semelhantes à bainha externa que envolve os espermatozoides eupirenes. Tal similaridade já havia sido apontada em espermatozoides apirenes localizados no trato genital feminino de outras espécies de Lepidoptera (RIEMANN, 1970; PHILLIPS, 1971; RIEMANN & THORSON, 1971; FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972; RIEMANN & GASSNER III, 1973). Quanto à ausência de filamentos ao longo das capas externas dos espermatozoides apirenes, isto poderia ser consequência da ausência de grânulos de secreção do tipo detectado ao nível da vesícula seminal e do ducto ejaculador duplo, indicando uma provável correlação entre tais grânulos e os filamentos superficiais. A ausência de tais filamentos não nos parece sinal de degeneração dos espermatozoides apirenes, uma vez que, ao nível da bursa copulatrix, esses espermatozoides não apresentam sinais aparentes de alterações morfológicas e tanto espermatozoides eupirenes como a

pirenes migram da bursa copulatrix à espermateca, como já foi apontado em outro noctuídeo, *Trichoplusia ni* (HOLT & NORTH, 1970; RIEMANN, 1970). Além disso, segundo IRIKI (1941—apud FRIEDLÄNDER & GITAY, 1972), os espermatozóides apirenes são essenciais ao transporte dos eupirenes da bursa copulatrix até o receptaculum seminis. Por conseguinte, é lógico presumir que os espermatozóides apirenes degenerem somente ao nível da espermateca, uma vez que os mesmos não participam do processo de fertilização propriamente dito.

Os espermatozóides *apirenes*, localizados no *receptaculum seminis* de *Alabama*, apresentam seus envoltórios bastante dilatados, como já havia sido observado em espermatozóides atípicos na espermateca de outra mariposa noctuídea *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970). Em relação a esse fenômeno, nós tendemos a concordar com RIEMANN que presumiu ser essa dilatação de envoltório "um artefato de técnica relacionado à alta concentração de material de secreção na espermateca". Mas nós presumimos também que, em função de modificações observadas na forma e elétrion-densidade dos derivados mitocondriais (volume bastante reduzido com eixo paracristalino muito denso) e no aspecto pouco nítido do axonema, os espermatozóides apirenes poderiam estar em processo de degeneração. Tal idéia é reforçada pelo fato de os espermatozóides apirenes de outros lepidópteros, como *Trichoplusia ni* (HOLT & NORTH, 1970), aparecerem inativos na espermateca de fêmeas inseminadas.

Quanto aos espermatozóides *eupirenes* detectados na espermateca de *Alabama*, notamos semelhanças e diferenças com

aqueles observados em outras espécies de Lepidoptera. A bainha externa (ou capa envoltória) é muito semelhante àquela descrita em espermatozóides eupirenes na spermateca de *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970), de *Anagasta kuhniella* (RIEMANN & THORSON, 1971) e de outras 5 espécies de mariposas - peste de plantações, incluindo 2 noctuídeos (RIEMANN & GASSNER III, 1973). PHILLIPS (1971) já havia encontrado similaridade entre a capa externa de espermatozóides eupirenes, encontrados no trato genital feminino de 4 espécies de Lepidoptera, com a bainha envoltória de espermatozóides de gafanhoto (KESSEL, 1967; BACCETTI *et al.*, 1971). Nós também achamos certa semelhança na estrutura e espessura ( $\approx 400 \text{ \AA}$ ) das capas envoltórias de espermatozóides de *Aiolopus strepens* (Orthoptera) (RENIERI & TALLURI, 1974) e *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptera) (SZÖLLÖSI, 1975), em corte transversal, com a bainha externa do complexo envoltório de espermatozóides eupirenes de *A. argillacea*. Contudo, RIEMANN & GASSNER III (1973) afirmam que essa aparente similaridade se restringe às secções transversais de espermatozóides eupirenes e nós concordamos com esses autores, pois em cortes longitudinais de capas de espermatozóides eupirenes localizados na spermateca de *Alabama*, encontramos estrutura semelhante àquela observada pelos últimos autores nas 5 espécies de mariposas examinadas. Em todas as bainhas externas de espermatozóides eupirenes de lepidópteros examinados pelos autores já citados e de *Alabama*, notou-se a ausência do apêndice reticular (já notada ao nível do duplex de *Alabama*) e, na região em que o referido apêndice se situava na capa, a evidência de uma placa densa, que parece atuar como uma espécie

de sutura. Considerando-se a posição da placa densa no envoltório externo de espermatozóides eupirenes, na *bursa copulatrix*, em relação à posição anterior do apêndice reticular ao nível do trato genital masculino, RIEMANN (1970) registrou uma rotação do envoltório de cerca de  $120^{\circ}$  em *Trichoplusia ni* e RIEMANN & THORSON (1971) observaram uma rotação de apenas  $30^{\circ}$  em *Anagasta*, durante a desorganização dos feixes eupirenes. Nós já havíamos observado um desvio anterior de aproximadamente  $20^{\circ}$  em *Alabama* ao nível da vesícula seminal e detectamos na bursa copulatrix uma maior rotação do envoltório de cerca de  $70-80^{\circ}$ , em relação à posição original do apêndice reticular em espermatozóides eupirenes intra-testiculares. RIEMANN & THORSON (1971) afirmaram que "o significado dessa rotação é desconhecido", apesar de RIEMANN (1970) ter sugerido que tal rotação poderia ser um tipo de ativação dos espermatozóides eupirenes ou de interação com os apirenes.

Na matriz elétron-densa (bainha interna) de espermatozóides localizados no receptaculum seminis de 5 espécies de Lepidoptera, foi detectada a presença de um bastão longitudinal mais elétron-denso, próximo à placa densa do envoltório externo (RIEMANN, 1970; RIEMANN & THORSON, 1971; RIEMANN & GASSNER III, 1973). Esta formação cilíndrica diferenciada não foi observada na matriz elétron-densa de espermatozóides eupirenes de *Spodoptera* (Noctuidae), localizados no receptaculum seminis (RIEMANN & GASSNER III, 1973), bem como não foi detectada em *Alabama*. Contudo, há regiões diferenciadas na matriz elétron-densa de espermatozóides eupirenes de ambas as espécies, que poderiam corresponder aos bastões elétron-den-

sos da matriz de espermatozóides das outras espécies de lepidópteros examinados. Quanto ao significado funcional desse cilindro axial mais denso no interior da bainha interna, RIEMANN (1970) supõe que esteja possivelmente envolvido no metabolismo de materiais que entram nos espermatozóides eupirenes, devido à íntima associação daquele bastão denso com a placa densa do envoltório externo. Nós achamos que, se a placa densa funcionasse realmente como uma sutura no envelope externo de espermatozóides eupirenes, ela atuaria mais como uma barreira para a entrada de materiais e, nesse caso, a presença de um bastão denso junto a essa região serviria como barreira auxiliar. Porém, assim como a sugestão de RIEMANN, esta nossa suposição é meramente especulativa.

RIEMANN & THORSON (1971) encontraram na matriz elétron-densa de espermatozóides eupirenes de *Anagasta*, ao nível da espermateca, uma evidente estrutura paracristalina, que não foi detectada no noctuídeo *Trichoplusia ni* (RIEMANN, 1970), nem em *Alabama*, outro noctuídeo. Quanto ao possível papel metabólico que seria desempenhado por esse material paracristalino, é ainda especulativo.

RIEMANN & GASSNER III (1973) observaram que em 3 espécies de mariposas noctuídeas (*Heliothis zea*, *H. virescens* e *Spodoptera frugiperda*), bem como em *Manduca sexta* (Sphingidae), a membrana plasmática situada mais internamente à matriz elétron-densa, frequentemente apresenta-se corrugada na área próxima aos derivados mitocondriais. Em *Alabama*, outro noctuídeo, nós observamos que a membrana plasmática apresenta corrugação não somente na região próxima ao(s)

derivado(s) mitocondrial(is), quanto próxima ao axonema também. Os autores não discutem o significado funcional desse aspecto tão peculiar da membrana plasmática.

Somente RIEMANN & GASSNER III (1973) mostram, em secções transversais e longitudinais de flagelos de espermatozóides eupirenes, a existência de espaços aparentemente vazios nos derivados mitocondriais de algumas das 5 espécies de mariposas analisadas. Em *Alabama*, nós também observamos no derivado mitocondrial maior de espermatozóides eupirenes, a existência de espaços elétron-transparentes no lugar anteriormente ocupado pelos eixos corticais elétron-densos. Os autores, acima citados, interpretaram tais espaços como aparentes separações e canais entre as membranas das cristas mitocondriais. Para nós, a existência daquele espaço aparentemente vazio no derivado mitocondrial de espermatozóide eupirene extra-testicular de *Alabama*, pode indicar que o eixo cortical elétron-denso, que ocupava anteriormente o referido espaço, poderia conter determinadas substâncias que seriam utilizadas pelos espermatozóides no seu deslocamento até o trato genital feminino, inclusive. Somente análises experimentais específicas poderão ou não confirmar tal suposição.

Quanto ao axonema dos espermatozóides eupirenes ao nível da espermateca, RIEMANN & GASSNER III (1973) afirmam que "microtúbulos acessórios e centrais contêm material elétron-denso" em espermatozóides das 5 espécies de mariposas por eles analisadas, incluindo 3 noctuídeos. Entretanto, em *Alabama*, nós verificamos que os microtúbulos acessórios e centrais não mais apresentavam-se elétron-densos. Tal fato, as-

sociado à baixa elétron-densidade da camada cortical dos derivados mitocondriais e à elétron-transparência do eixo cortical, poderia indicar a presença de substâncias de reserva disponíveis para o metabolismo celular. Utilizando vermelho de rutênio (ANDERSON, 1968; LUFT, 1971a), nós verificamos que os microtúbulos acessórios e centrais do axonema, bem como a camada cortical e o eixo elétron-denso do derivado mitocondrial maior coram-se intensamente, o que poderia nos indicar a presença de glicoproteínas e/ou glicosaminoglicanas disponíveis para metabolismo celular. Contudo, não podemos descartar a hipótese de que os sinais morfológicos anteriormente citados poderiam indicar também um processo de degeneração celular nos espermatozóides eupirenes estocados na espermateca, como já foi observado em espermatozóides de outras espécies de insetos (BRELAND, EDDLEMAN & BIESELE, 1968).

Quanto à saída dos espermatozóides eupirenes de seus envoltórios, na espermateca, RIEMANN & THORSON (1971), FRIEDLÄNDER & GITAY (1972) e RIEMANN & GASSNER III (1973) afirmaram que as capas externas se rompem ao longo das placas densas, liberando assim os espermatozóides. Entretanto, em *Alabama*, nós observamos que os envoltórios se rompem ao nível das saliências próximas ao axonema, as quais já são detectadas em espermatozóides eupirenes ao nível da bursa e no lado oposto das placas densas. Mas, em alguns agrupados de envelopes vazios de espermatozóides eupirenes de *Alabama*, ainda na espermateca, nós notamos que as capas externas pareciam também rompidas ao nível das placas densas, bem como a matriz elétron-densa interna parecia rompida na região que anterior-

mente se localizava entre o axonema e a capa externa. Contudo, tais observações não são suficientemente claras em termos de detalhes, o que nos leva a crer que, pelo menos em *Alabama*, a saída dos espermatozóides eupirenes de seus envoltórios ocorre ao nível das protuberâncias próximas aos axonemas dos flagelos e não ao nível das placas densas.

Concluindo, nós podemos afirmar que todas as complexas modificações ocorridas nos espermatozóides eupirenes e apirenes de *A. argillacea*, ao longo do trato genital masculino e feminino, deverão estar relacionadas, direta ou indiretamente, com o papel desempenhado por aqueles 2 tipos de espermatozóides, que de alguma forma interagem no sentido de que ocorra a fertilização.

## RESUMO

Imagos machos e fêmeas de *Alabama argillacea* foram dissecados para o estudo da morfologia de seus aparelhos reprodutores. Os espermatozóides nesses aparelhos foram submetidos ao processo de contrastação negativa e a diferentes métodos de fixação para microscopia eletrônica de transmissão.

Os objetivos básicos de nosso trabalho foram:

- a) caracterizar ultra-estruturalmente, ao nível do testículo, os 2 tipos normais de espermatozóides (eupirenes e apirenes);
- b) descrever, ao nível de órgãos extra-testiculares dos tratos genitais de mariposa macho e fêmea, a estrutura fina das modificações sofridas pelos espermatozóides típicos e atípicos.

Ao nível do testículo, os espermatozóides eupirenes (nucleados) e apirenes (anucleados) apresentam-se dispostos paralelamente em feixes organizados no interior de cistos separados e bem distintos entre si. Os espermatozócitos possuem, em geral,  $256 \pm 1$  espermatozóides, porém há cistos apirenes com 2 a 3 vezes mais espermatozóides que os eupirenes.

Os espermatozóides apirenes intra-testiculares, menores que os eupirenes, são verdadeiros aparatos flagelares. Suas porções anteriores anucleadas apresentam-se sob a forma de um tronco de cone, com um capuz elétron-denso diferenciado que envolve 1 a 2 coroas de microtúbulos. O flagelo dos espermatozóides anucleados é constituído por:

- a) axonema do tipo 9+9+2', típico de insetos em geral, com mi

crotúbulos acessórios e centrais de conteúdo pouco elétron-denso;

b) 2 pequenos derivados mitocondriais dispostos ao longo da cauda, de tamanho e estrutura semelhantes (região medular com área de natureza paracristalina), que terminalizam juntos antes da porção terminal;

c) membrana plasmática trilaminar envoltória.

Cada um dos espermatozóides eupirenes (nucleados) intra-testiculares é recoberto, total ou parcialmente, por uma coroa radial de apêndices laciniados, desde a cabeça até porções mais posteriores da cauda. Ao longo de todo espermatozóide, existe um outro tipo de apêndice, bem diferenciado dos anteriores, chamado reticular ou corpo satélite.

A porção cefálica dos espermatozóides típicos é composta de:

a) um núcleo longo, delgado e muito elétron-denso;

b) uma estrutura tubular de paredes elétron-densas adjacente ao núcleo; e

c) um corpúsculo basal atípico abaixo da vesícula tubular e adjacente à porção basal do núcleo. Não foi identificada nenhuma estrutura acrosômica. O flagelo de espermatozóides eupirenes é formado por um axonema de padrão organizacional 9+9+2, como o dos apirenes, porém os 2 microtúbulos centrais são mais elétron-densos que aqueles do axonema de espermatozóides atípicos, e os 9 microtúbulos acessórios apresentam conteúdo fortemente elétron-denso que se cora mais intensamente com vermelho de rutênio, o que indica a presença de glicoproteínas e/ou glicosaminoglicanas. Ao longo do axonema, dispõem-se 2 derivados mitocondriais de tamanhos di

ferentes com arranjo periódico de "cristas" na camada cortical. O maior se estende por quase todo o flagelo, enquanto que o menor é encontrado somente em regiões mais posteriores e terminaliza antes do maior. Na porção terminal, sem a presença de derivados mitocondriais, o axonema se desorganiza completamente. A membrana plasmática envoltória possui estrutura trilaminar típica.

Ao serem liberados do testículo para os ductos genitais, os espermatozoides eupirenes são mantidos em feixes, ao redor dos quais se dispõem os apirenes. Os apêndices laciniados não são mais detectados ao redor dos espermatozoides típicos, mas persiste o reticular situado por fora de uma complexa bainha envoltória. Os espermatozoides apirenes extra-testiculares também apresentam bainha envoltória com número variado de camadas, recoberta por pequenos filamentos e mais simples que a dos eupirenes.

Em órgãos (bursa copulatrix e espermateca) do trato genital de fêmeas inseminadas, os espermatozoides anucleados apresentam estrutura semelhante àquela observada nos ductos genitais do macho, mas os nucleados não mais se dispõem em feixes e nota-se a total ausência do apêndice reticular na região da placa densa na bainha externa, bem como evidente desvio de todo envoltório em relação ao espermatozoide. Os espermatozoides apirenes permanecem ao nível da espermateca, onde degeram, sem sair de seus envoltórios. Os eupirenes abandonam suas bainhas e saem da espermateca para fertilizar os óvulos. O papel dos espermatozoides apirenes parece estar relacionado com o transporte dos eupirenes nos ductos genitais masculinos e da bursa copulatrix até a espermateca da fêmea.

## SUMMARY

Male and female moths of *Alabama argillacea* were dissected out for studying the reproductive systems morphology. The spermatozoa were negative stained and fixed by different methods to transmission electron microscopy.

The basic aims of our study were the ultrastructure description of the two normal morphological types of spermatozoa - eupyrene and apyrene - in the testes and the differentiation of the both types of sperm during the passage through the male and female ducts.

In the testis, the eupyrene and apyrene spermatozoa are closely associated and aligned in bundles into distinct cysts. The spermatocyst have, in general,  $256 \pm 1$  spermatozoa, but some apyrene cysts have a double or triple number of sperm.

The intratesticular atypical spermatozoa are smaller than the typical ones. Their anucleated anterior regions seem like truncated cones with a most anterior electron dense cap involving one or two concentric microtubules rows. The flagellum of anucleated sperm shows an insect typical axoneme 9+9+2 which central and accessory microtubules have a slighter electron dense lumen. The two small mitochondrial derivatives along the tail have similar size and structure and finish together before the endpiece tail. A typical unit membrane is observed around the axoneme.

The eupyrene testicular spermatozoa are surrounded by a radial mantle of laciniate appendages along almost all their length. There is another type of appendage that runs along the nucleated sperm denominated reticular appendage or satellite body. The head region of the eupyrene sperm has a long, slender and very electron dense nucleus, a tubular structure with electron dense wall lying near to the nucleus and an atypical basal body below the tubular structure and adjacent to the nucleus basal region. None acrosome structure was observed. The eupyrene flagellum has an axoneme 9+9+2 like that one from apyrene sperm. The two axoneme central tubules have more electron dense lumina than the ones of the atypical sperm and the electron dense cores of the nine accessory microtubules stain strongly with ruthenium red, probably indicating the presence of glycoproteins and/or glycosaminoglycans. There are two mitochondrial derivatives along the axoneme with different sizes and lengths which show periodic arranged and modified cristae in their cortical region. One of mitochondrial derivatives is larger and extends further posteriorly than the other. In the endpiece tail, without mitochondrial derivatives, the axoneme is completely disorganized. The plasma membrane has a typical trilaminar organization.

After releasing from the testis to the genital ducts, the eupyrene spermatozoa of the same cyst remain associated in bundles. The apyrene sperm are randomly arranged between the eupyrene bundles. The laciniate appendages are lacking, but the reticular one is still observed along

a new complex sheath around the nucleated sperm. The anucleated spermatozoa are surrounded by a less elaborated sheath with different number of concentric rings of material recovered by small filamentous extensions.

In the bursa copulatrix and receptaculum seminis of inseminated females, the anucleated spermatozoa are similar to those ones observed in the male genital tract. The nucleated sperm are now disassociated and the reticular appendage is completely lacking on the dense region in the outer sheath, which has undergone a rotation from its previous position in regard to the internal components of the typical sperm. The atypical spermatozoa remain in the spermatheca where they degenerate, without leaving their own sheaths. The typical ones hatch from their sheaths and fertilize the eggs. The role of apyrene spermatozoa seems to be related with the transport of the eupyrene sperm in the male genital ducts and from copulatory pouch to the female spermatheca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZELIUS, B. Electron microscopy of the sperm tail. Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5 (2): 269-78, 1959.
- ANDERSON, W. A. Cytochemistry of sea urchin gametes; II Ruthenium red staining of gamete membranes of sea urchins. *J. Ultrastruct. Res.*, 24: 322-33, 1968.
- ANDERSON, W. A. & PERSONNE, P. The form and function of spermatozoa; a comparative view. In: AFZELIUS, B. A., ed. *The functional anatomy of the spermatozoon*. Stockholm, Pergamon, 1973. v. 23, p. 3-14.
- ANDRADE, C. F. S. Estudos ecológicos e patológicos da polidrose nuclear de *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lep., Noctuidae). Campinas, 1981. 153p. Tese (mestrado). UNICAMP.
- ANDRÉ, J. Sur quelques détails nouvellement connus de l'ultrastructure des organites vibratiles. *J. Ultrastruct. Res.*, 5: 86-108, 1961.
- ANDRÉ, J. Contribution à la connaissance du chondriome. Étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultrastruct. Res.*, 6 (suppl. 3): 1-185, 1962.
- BACCETTI, B. Insect sperm cells. *Adv. Insect Physiol.*, 9: 315-97, 1972.
- BACCETTI, B. & AFZELIUS, B. A. The biology of the sperm cell. *Monographs in developmental biology*, 10: 1-254, 1976.

- BACCETTI, B.; DALLAI R. & ROSATI, F. The spermatozoon of Arthropoda; VII Plecoptera and Trichoptera. *J. Ultrastruct. Res.*, 31: 212-28, 1970.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E. & ROSATI, F. The spermatozoon of Arthropoda; XIII the cell surface. *J. Ultrastruct. Res.*, 35: 582-605, 1971.
- BACCETTI, B. *et alii*. Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. *J. Cell Biol.*, 73: 594-600, 1977.
- BAIRATI, A. & PEROTTI, M. E. Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: BACCETTI B. ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970. p. 333-45.
- BRADLEY, D. E. The preparation of specimen support films. In: KAY, D. H. *Techniques for electron microscopy*. 2.ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1965. p.58-74.
- BRELAND, O. P.; BARKER, K. R. & EDDLEMAN, D. Centrioles in the spermatids of insects. *J. Cell Biol.*, 35: 162A, 1967.
- BRELAND, O. P.; EDDLEMAN, C. D. & BIESELE, J. J. Studies of insect spermatozoa; I. *Ent. News*, 79 (8): 197-216, 1968.
- BRELAND, O. P. *et alii*. Centrioles in the spermatids of insects. *Ann. ent. Soc. Am.*, 61 (4): 1037-9, 1968.
- CALLAHAN, P. S. & CHAPIN, J. B. Morphology of the reproductive systems and mating in two representative members of the family Noctuidae, *Pseudaletia unipuncta* and *Peridroma margaritosa*, with comparison to *Heliothis zea*. *Ann. ent. Soc. Am.*, 53: 763-82, 1960.

- CHAUDHURY, M. F. B. & RAUN, E. S. Spermatogenesis and testicular development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyraustidae). *Ann. ent. Soc. Am.*, 59 (6): 1157-9, 1966.
- CRUZ-LANDIM, C. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Myogryllus* sp. (Orthoptera, Gryllidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 39 (4): 783-91, 1979a.
- CRUZ-LANDIM, C. Flagellar organization in *Myogryllus* sp. (Orthoptera, Gryllidae). *Dusenía*, 11 (3): 161-4, 1979b.
- CRUZ-LANDIM, C. & FERREIRA, A. Studies on the fine structure of cyst cells and its relationships with the spermatids on *Myogryllus* sp. (Orthoptera). *Rev. Brasil. Biol.*, 41 (2): 401-6, 1981.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morph.*, 164 (3): 301-9, 1980.
- DUMSER, J. B. The regulation of spermatogenesis of insects. *Ann. Rev. Ent.*, 25: 341-69, 1980.
- FAIN-MAUREL, M. A. Acquisitions récentes sur les spermatogénèses atypiques. *Ann. Biol.*, 5 (11-12): 513-64, 1966.
- FAVARD, P. & ANDRÉ, J. The mitochondria of spermatozoa. In: BACCETTI, B. ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970. p. 415-29.

- FRANZÉN, Å. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In: BACCETTI, B. *Comparative Spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970. p. 29-46.
- FRIEDLÄNDER, M. The role of transient perinuclear microtubules during spermiogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. *J. Submicr. Cytol.*, 8 (4): 319-26, 1976.
- FRIEDLÄNDER, M. Phylogenetic branching of Trichoptera and Lepidoptera; an ultrastructural analysis on comparative spermatology. *J. Ultrastruct. Res.*, 83: 141-7, 1983.
- FRIEDLÄNDER, M. & BENZ, G. The eupyrene - apyrene dichotomous spermatogenesis of Lepidoptera. Organ culture study on the timing of apyrene commitment in the codling moth. *Int. J. Invert. Reprod.*, 3: 113-20, 1981.
- FRIEDLÄNDER, M. & BENZ, G. Control of spermatogenesis resumption in post-diapausing larvae of the codling moth. *J. Insect Physiol.*, 28 (4): 349-55, 1982.
- FRIEDLÄNDER, M. & GITAY, H. The fate of the normal-anucleated spermatozoa in inseminated females of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Morph.*, 138: 121-30, 1972.
- FRIEDLÄNDER, M. & HAUSCHTECK-JUNGEN. The regular divisions of the spermatocytes as related to a meiotic lysine-rich protein fraction. *Chromosoma*, 85 (1): 109-18, 1982a.
- FRIEDLÄNDER, M. & HAUSCHTECK-JUNGEN. Differential basic nucleoprotein kinetics in the two kinds of Lepidoptera spermatids: nucleate (eupyrene) and anucleate (apyrene). *Chromosoma*, 85 (3): 387-98, 1982b.

- FRIEDLÄNDER, M.; JANS, P. & BENZ, G. Precocious reprogramming of eupyrene-apyrene spermatogenesis commitment induced by allatectomy of the penultimate larval instar of the moth *Actias selene*. *J. Insect Physiol.*, 27 (4): 267-9, 1981.
- FRIEDLÄNDER, M. & MIESEL, S. Spermatid anucleation during the normal atypical spermiogenesis of the warehouse moth *Ephestia cautella*. *J. Submicr. Cytol.*, 9 (2-3): 173-85, 1977.
- FRIEDLÄNDER, M. & WAHRMAN, J. The spindle as a basal body distributor. A study in the meiosis of the male silkworm moth, *Bombyx mori*. *J. Cell Sci.*, 7: 65-89, 1970.
- FRIEDLÄNDER, M. & WAHRMAN, J. Number of centrioles in insect sperm; study in two kinds of differentiating silkworm spermatids. *J. Morphol.* 134: 383-98, 1971.
- GAMA, V. *et alii*. Ultraestrutura da espermiogênese e do espermatozôide de *Enallagma chelifera* Selys, 1875 (Coenagrionidae: Odonata). *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 48 (2): 313-24, 1976.
- GARBINI, C. P. & IMBERSKI, R. B. Spermatogenesis in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralididae). *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 96 (2): 189-203, 1977.
- GELBIČ, I. & METWALLY, M. M. Changes in the development of male germinal cells in *Spodoptora littoralis* caused by the effects of juvenoids (Lepidoptera, Noctuidae). *Acta Ent. bohemoslov.*, 78: 10-7, 1981.

- GLAUERT, A. M. *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. Amsterdam, North-Holland, 1975. V.3, part. 2, p. 1-207.
- HABIB, M. E. M. *Estudos biológicos e anatômicos sobre Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). Campinas, 1976. 117p. Tese (doutorado). UNICAMP.
- HABIB, M. E. M. Contribution to the biology of the American cotton leafworm *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepid., Noctuidae). *Z. ang. Ent.*, 84: 412-8, 1977.
- HABIB, M. E. M. Effects of various larval and adult diets on the American cotton leafworm, *Alabama argillacea* (Hbn.) (Lep., Noctuidae). *Z. ang. Ent.*, 85: 219-24, 1978.
- 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, 1972. v.2, cap. 3, p. 101-47.
- HAYAT, M. A. *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications*. New York, Van Nostrand Reinhold, 1970. v.1. p. 323-31.
- HOLT, G. G. & NORTH, D. T. Spermatogenesis in the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae). *Ann. ent. Soc. Am.*, 63 (2): 501-7, 1970.
- HORNE, R. W. Negative staining methods. In: KAY, D. ed. *Techniques for electron microscopy*. Oxford, Blackwell Scientific, 1967. p.328.
- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae); I the intratesticular behaviour of the spermatozoa at various stages from the 5th-instar to the adult. *App. Ent. Zool.*, 12(2): 142-53, 1977a.

- KATSUNO, S. Studies on eupyrene and apyrene spermatozoa in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae); IV the behaviour of the spermatozoa in the internal reproductive organs of female adults. *App. Ent. Zool.*, 12 (4): 352-9, 1977b.
- KAYE, J. S. The fine structure of flagella in spermatids of the house cricket. *J. Cell Biol.*, 22 (3): 710-4, 1964.
- KAYE, J. S. & McMASTER-KAYE, R. The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket; I initial stages of differentiation and the loss of nonhistone protein. *J. Cell Biol.*, 31: 159-79, 1966.
- KESSEL, R. G. An electron microscope study of spermiogenesis in the grasshopper with particular reference to the development of microtubular systems during differentiation. *J. Ultrastruct. Res.*, 18: 677-94, 1967.
- IMMS, A. D. *A general textbook of entomology*. 9.ed. London, Buttler & Tanner, 1957.
- LEVIATAN, R. & FRIEDLÄNDER, M. The eupyrene-apyrene dichotomous spermatogenesis of Lepidoptera. *Develop. Biol.*, 68: 515-24, 1979.
- LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 409-14, 1961.
- LUFT, J. H. Ruthenium red and violet: I chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, 171: 347-68, 1971a.
- LUFT, J. H. Ruthenium red and violet; II fine structural localization in animal tissues. *Anat. Rec.*, 171: 369-416, 1971b.

- MEDEIROS, M. & DOLDER, H. Ultra-estrutura de espermatozoides eupirenes e apirenes de *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) ao longo do aparelho genital do macho. *Ciênc. Cult. S. Paulo*, 37 (7): 649, 1985a.
- MEDEIROS, M. & DOLDER, H. Modificações ultra-estruturais em espermatozoides eupirenes e apirenes de um Noctuidae (Lepidoptera), desde o testículo e ductos genitais do macho até a espermateca da fêmea. In: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 10. Colóquio, São Paulo, 1985b. Resumos p. 50.
- MIZUHIRA, V. & FUTAESAKU, Y. New fixation for biological membranes using tannic acid. *Acta Histochem. Cytochem.*, 5: 233-6, 1972.
- ŌURA, C. Electron microscope studies on the fine structure of nutritive cells in the testis of the silkworm, *Bombyx mori*, L. *Okajimas Fol. anat. jap.*, 42: 171-87, 1966.
- PEROTTI, M. E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. *J. Submicrosc. Cytol.*, 1: 171-96, 1969.
- PEROTTI, M. E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *J. Ultrastruct. Res.*, 44: 181-98, 1973.
- PHILLIPS, D. M. Fine structure of *Sciara coprophila* sperm. *J. Cell Biol.*, 30: 499-517, 1966.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44: 243-77, 1970a.

- PHILLIPS, D. M. Insect flagellar tubule patterns; theme and variations. In: BACCETTI, B. ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970b. p. 263-73.
- PHILLIPS, D. M. Morphogenesis of the laciniate appendages of lepidopteran spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.*, 34: 567-85, 1971.
- PHILLIPS, D. M. *Spermiogenesis*. New York, Academic, 1974. 68p.
- REID, N. Ultramicrotomy. In: GLAUERT, A. M. *Practical methods in electron microscopy*. Amsterdam, North-Holland, 1975. v.3, part 2, p. 215-353.
- RENIERI, T. & TALLURI, M. V. Sperm modification in the female ducts of a grasshopper. *Monitore Zool. Ital.*, 8: 1-9, 1974.
- RIEMANN, J. G. Metamorphosis of sperm of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during passage from the testes to the female spermatheca. In: BACCETTI, B., ed. *Comparative spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei, New York, Academic, 1970. p. 321-31.
- RIEMANN, J. G. Ultrastructure of sperm in F<sub>1</sub> progeny of irradiated males of the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella*. *Ann. ent. Soc. Am.*, 66 (1): 147-53, 1973.
- RIEMANN, J. G. & THORSON, B. J. Sperm maturation in the male and female genital tracts of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralididae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 1 (1): 11-19, 1971.

- RIEMANN, J. G. & GASSNER III, G. Ultrastructure of lepidopteran sperm within spermathecae. *Ann. ent. Soc. Am.*, 66 (1): 154-9, 1973.
- SEBATINI, 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.
- SADO, T. Spermatogenesis of the silkworm and its bearing on radiation induced sterility. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 12 (4): 359-85, 1963.
- SHEN, S. K. & BERRYMAN, A. A. The male reproductive system and spermatogenesis of the European pine shoot moth, *Rhyacionia buoliana* (Lepidoptera: Olethreutidae), with observations on the effects of gamma irradiation. *Ann. ent. Soc. Am.*, 60 (4): 767-74, 1967.
- SILBERGLIED, R. E., SHEPHERD, J. G. & DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *Am. Nat.*, 123 (2): 255-65, 1984.
- SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy; I procedure, and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 608-21, 1976a.
- SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy; II the moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 622-33, 1976b.

- SPENCER, M. The preparation of carbon films for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6 (1): 125-6. 1959.
- " " SZÖLLOSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect Orthoptera). *J. Ultrastruct. Res.*, 50: 322-46, 1975.
- TOKUYASU, K. T.; PEACOCK, W. J. & HARDY, R. W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*; II coiling process. *Z. Zellforsch.*, 127: 492-525, 1972.
- VENABLE, J. H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-8, 1965.
- VIRKKI, N. Gametogenesis in the sugarcane borer moth, *Diatraea saccharalis* (F.) (Crambidae). *J. Agr. Univ. Puerto Rico*, 47 (1): 57-9, 1963a.
- VIRKKI, N. Gametogenesis in the sugarcane borer moth, *Diatraea saccharalis* (F.) (Crambidae). *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, 47: 102-37, 1963b.
- VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. *Z. Zellforsch.*, 101: 13-27, 1969.
- VIRKKI, N. Evolution of sperm cell number per bundle in insects. *An. Escuela Nac. Ciên. Biol.*, 20 (1-4): 23-34, 1973.

- WARNER, F. D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J. Ultrastruct. Res.*, 35: 210-32, 1971.
- WARNER, F. D. The fine structure of the ciliary and flagellar axoneme. In: *Prokaryotic and eukaryotic flagella*. Cambridge, Cambridge University, 1982. v. 35, cap. 2, p. 11-37.
- WATSON, M. L. The use of carbon films to support tissue sections of electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1 (2): 183, 1955.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4 (4): 475-8, 1958.
- WIGGLESWORTH, M. B. *The principles of insect physiology*. 6.ed. London, Methuen, 1965. p.636-8.
- YASUZUMI, G. & ŌURA, C. Differential analysis by various staining techniques of structures present in developing spermatids of the silkworm. *Nature*, 4964: 1.197-8, 1964a.
- YASUZUMI, G. & ŌURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XIII formation of a tubular structure and two bands in the developing spermatid of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, 64: 210-26, 1964b.
- YASUZUMI, G. & ŌURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XIV the fine structure of the clear band and tubular structure in late stages of development of spermatids of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, 66: 182-96, 1965a.

YASUZUMI, G. & ŌURA, C. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy; XV the fine structure of the middle piece in the developing spermatid of the silkworm, *Bombyx mori* Linné. *Z. Zellforsch.*, 67: 502-20, 1965b.

ZYLBERBERG, L. Évolution d'une lignée de spermatozoides atypiques au cours de la spermatogenèse chez *Pieris brassicae* L. (Lépidoptère). *Ann. Sci. Nat., Zool.*, Paris, 5: 491-500, 1963.

ZYLBERBERG, L. Contribution a l'étude de la double espermatogenèse chez un lépidoptère (*Pieris brassicae* L., Pieridae). *Ann. Sci. Nat. Zool.*, Paris, 11: 569-626, 1969.

VOLUME II  
ILUSTRAÇÕES

## ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS NAS FIGURAS

a	- subunidade "a" da dupla periférica de microtúbulos do axonema	cp	- cilindro periférico formado por microtúbulos acessórios e duplas periféricas nos espermatozóides apirenes
al	- apêndices laciniados	d	- desmosoma
ap	- espermatozóides e/ou espermátides apirenes	dm	- derivado mitocondrial
ar	- apêndice reticular	dp	- dupla periférica de microtúbulos do axonema
ax	- axonema	en	- envoltório nuclear
b	- subunidade "b" da dupla periférica de microtúbulos do axonema	eup	- espermatozóides e/ou espermátides eupirenes
BC	- Bursa Copulatrix	ev	- envoltório vazio de espermatozóides eupirenes
c	- citoplasma	f	- flagelo
ca	- capuz elétron-denso localizado na porção anterior dos espermatozóides apirenes	fd	- fibras elétron-densas do axonema
cb	- corpúsculo basal do axonema de espermatozóides eupirenes	fr	- fibras radiais de axonema
ce	- capa externa que envolve os espermatozóides eupirenes e apirenes extra-testiculares	G	- vesículas e cisternas do complexo de Golgi
ci	- célula cística	GA	- Glândula Acessória
cm	- cristas modificadas dos derivados mitocondriais	gl	- partículas de glicogênio
		gr	- grânulos de secreção
		jc	- junções celulares

- |     |   |     |   |
|-----|---|-----|---|
| js  | - junção celular do tipo septada  | mt  | - microtúbulos  |
| md  | - material elétron-denso que envolve os espermatozóides eupirenes e apirenes extra-testiculares               | mv  | - microvilosidades  |
| mf  | - material elétron-denso filamentososo que envolve os espermatozóides eupirenes e apirenes extra-testiculares | n   | - núcleo  |
| mi  | - mitocôndria   | ng  | - "nuage"   |
| mp  | - membrana plasmática dos espermatozóides e/ou espermátides   | nu  | - nucléolo  |
| mpc | - membrana plasmática da célula cística   | p   | - pontes que ligam o apêndice reticular à membrana plasmática |
|     |   | pa  | - porção anterior de espermatozóide apirene                   |
|     |   | REG | - Retículo Endoplasmático Granular                            |
|     |   | RS  | - Receptaculum Seminis ou espermateca                         |
|     |   | VS  | - Vesícula Seminal  |

- ⊗ - matriz amorfa elétron-densa que recobre individualmente os espermatozóides eupirenes extra-testiculares
- \* - capas internas que envolvem individualmente os espermatozóides apirenes extra-testiculares
- ⊙ - eixo cortical elétron-denso dos derivados mitocondriais de flagelos de espermatozóides eupirenes
- \* - eixo medular de natureza paracristalina dos derivados mitocondriais de flagelos de espermatozóides apirenes

FIGURAS "a" E "b" - Aparelhos Reprodutores de *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae).

Fig. "a" - Desenho esquemático do aparelho reprodutor de imago macho de *A. argillacea*, no qual destacam-se: o testículo (t) único; os vasos deferentes (vd); as vesículas seminais (vs); as glândulas acessórias (ga); o ducto ejaculador duplo (ded) e o simples (des); o bulbo ejaculador (be) e o "aedeagus" (ae).

Fig. "b" - Desenho esquemático do aparelho reprodutor de imago fêmea de *A. argillacea*, no qual destacam-se: os ovaríolos (ov) com o respectivo oviduto (od); a espermateca ou "receptaculum seminis" (rs) com sua glândula anexa (g.rs); as glândulas coleteriais (gc); a "bursa copulatrix" (bc) com seu respectivo canal (cb); o ducto seminal (ds) e o vestíbulo (v).

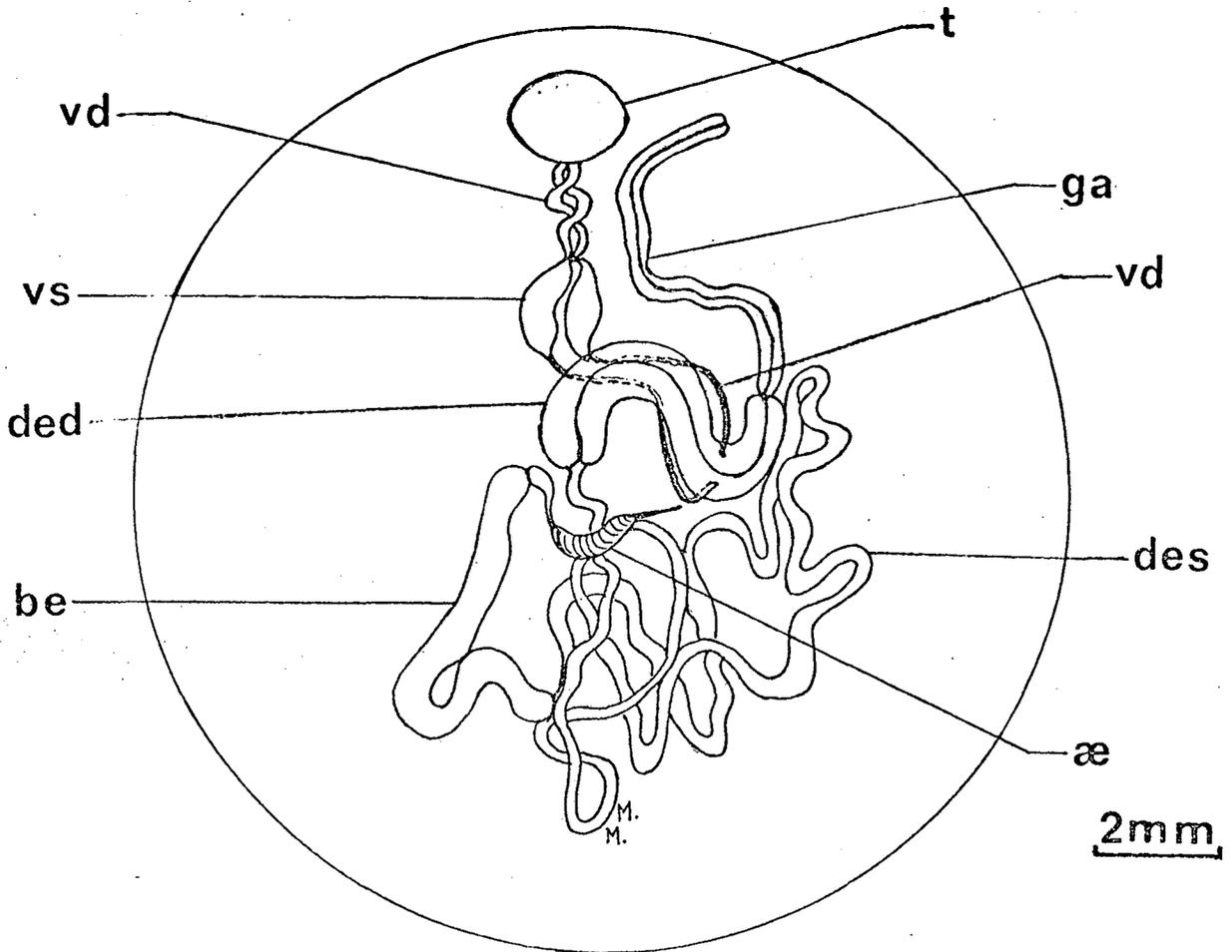


figura "a"

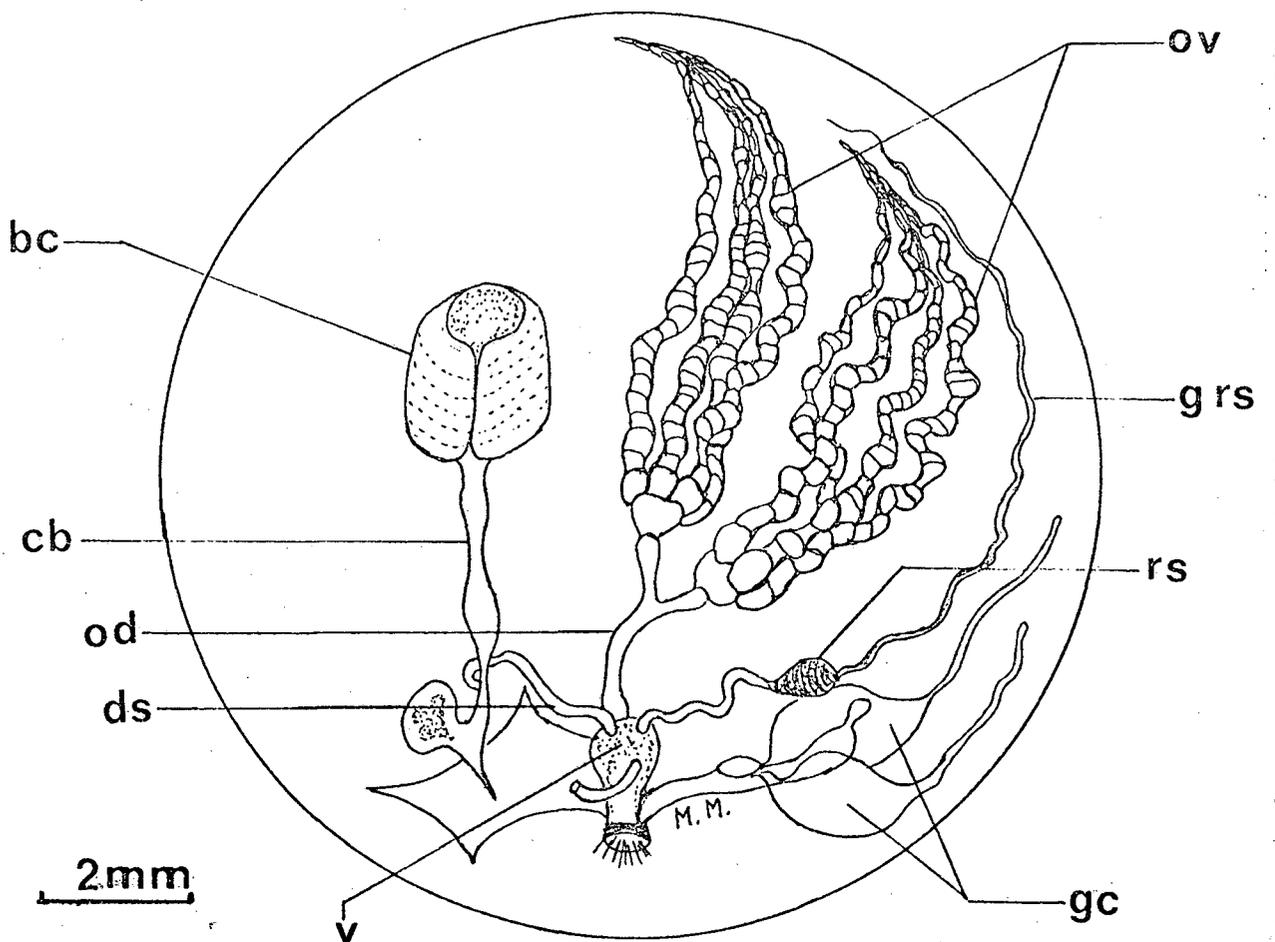
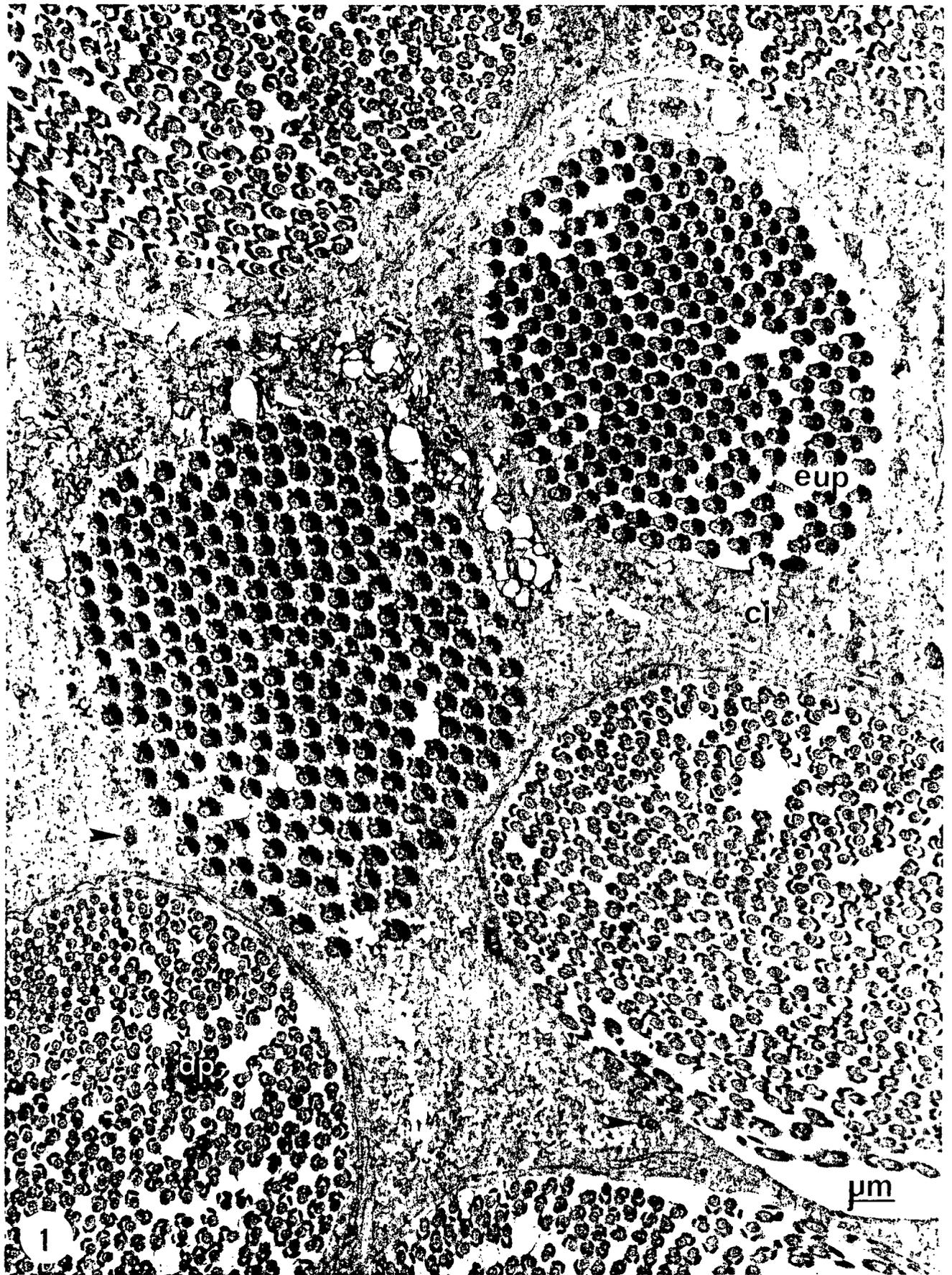


figura "b"

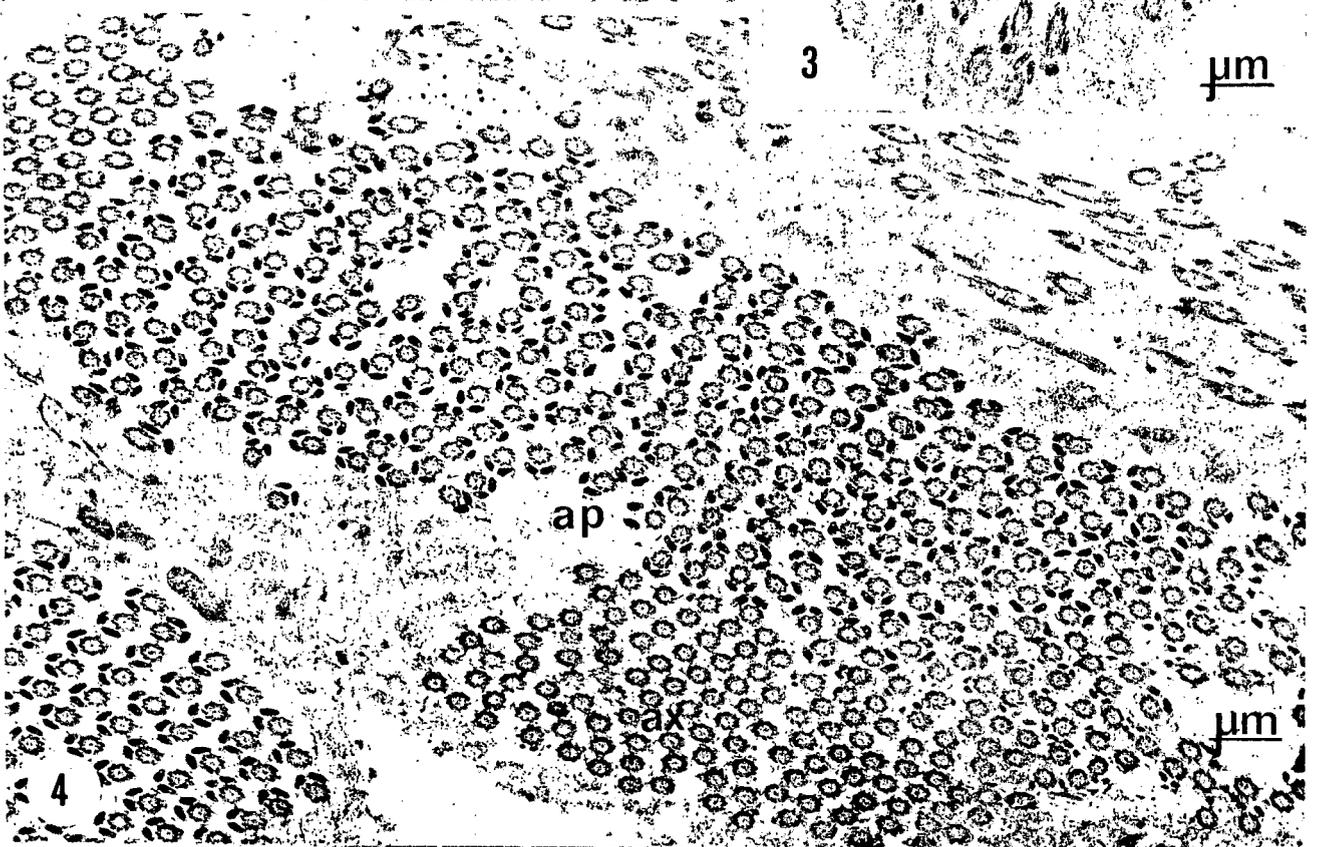
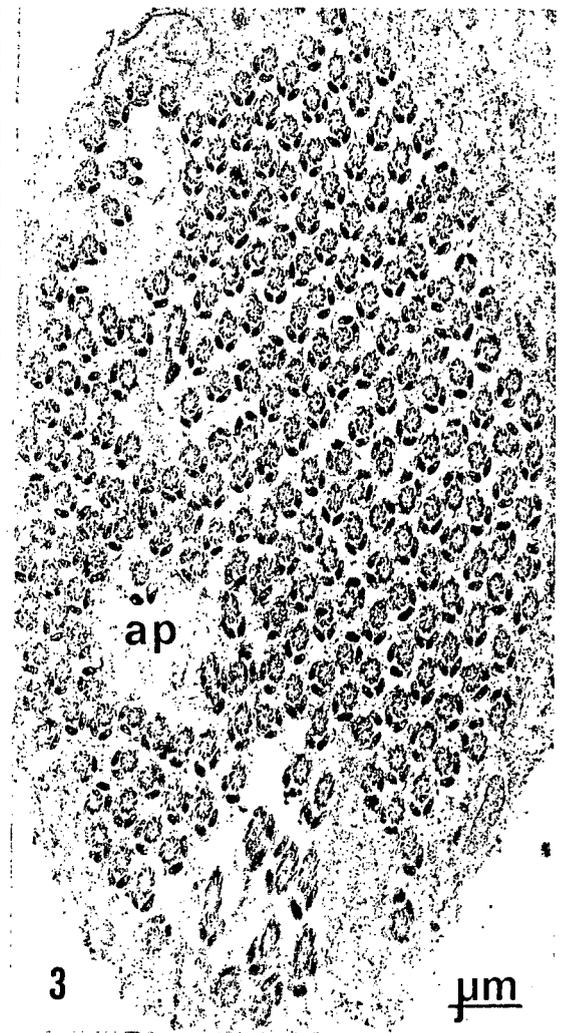
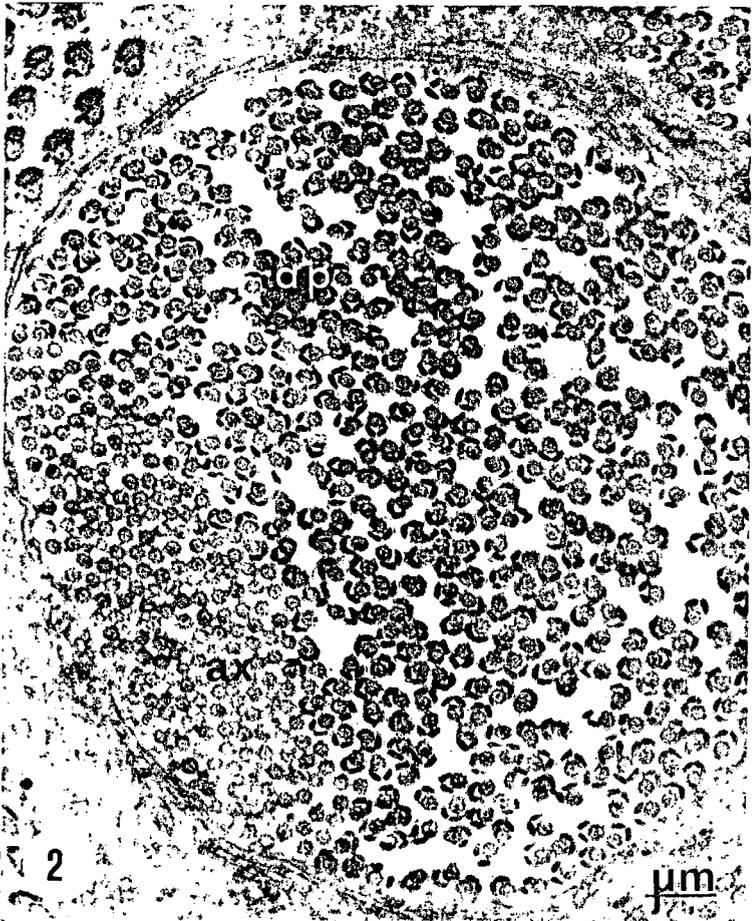
FIGURA 01 - ESPERMATOZÓIDES EUIPIRENES E APIRENES NO TESTÍCULO

Fig. 01 - Dois cistos com  $256 \pm 1$  espermatozóides eupirenes (eup), rodeados por 5 cistos de espermatozóides apirenes (ap), em corte transversal, ao nível dos flagelos, envoltos por células císticas (ci). Dois espermatozóides apirenes isolados (  $\blacktriangleright$  ). Material fixado em glutaraldeído 2%, ácido tânico 2%, seguido de tetróxido de ósmio 1%. Sem pós-contrastação do corte. 8.200x.



FIGURAS 02 a 04 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NO TESTÍCULO

Fig. 02 a 04 - Três cistos apiranes (ap), em corte transversal ao nível dos flagelos, com diferentes n $\bar{u}$ meros de espermatoz $\bar{o}$ ides. Fig. 02 - Cisto com  $732 \pm 1$ . Fig. 03 - Cisto com  $254 \pm 1$ . Fig. 04 - Cisto com  $523 \pm 1$ . Nota-se que, nos cistos das fig. 02 e 04, h $\bar{a}$  regi $\bar{o}$ es que cont $\bar{e}$ m somente axonema (ax). Fig. 02 - Material fixado em glutaralde $\bar{i}$ do 2%,  $\bar{a}$ cido t $\bar{a}$ nicco 2%, seguido de tetr $\bar{o}$ xido de  $\bar{o}$ smio 1%. Sem p $\bar{o}$ s-contrast $\bar{a}$ o do corte. Fig. 03 e 04 - Material fixado em glutaralde $\bar{i}$ do 2%, tetr $\bar{o}$ xido de  $\bar{o}$ smio 2%, seguido de  $\bar{a}$ cido t $\bar{a}$ nicco 1%. Fig. 02 - 8.900x; Fig. 03 e 04 - 9.400x.

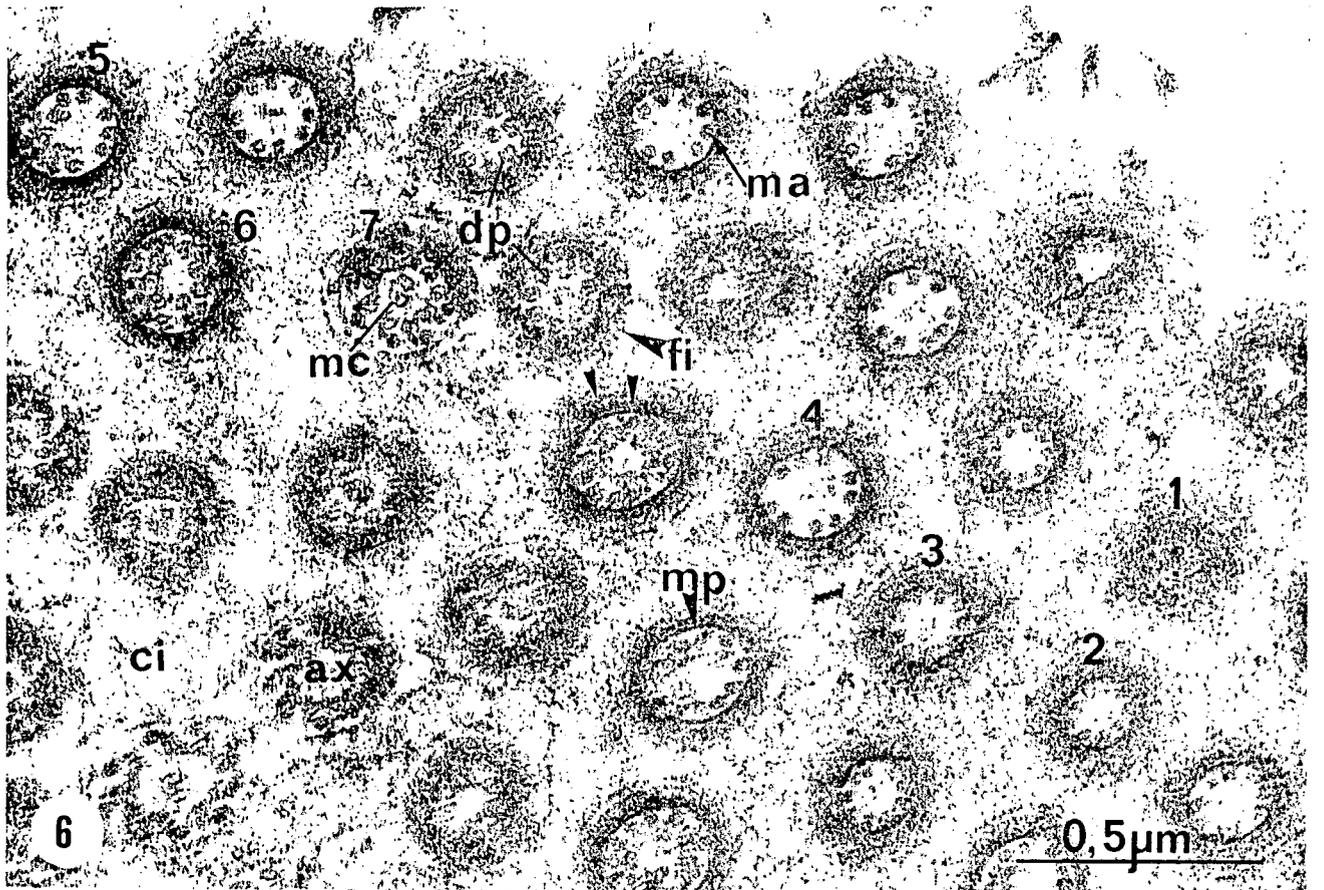
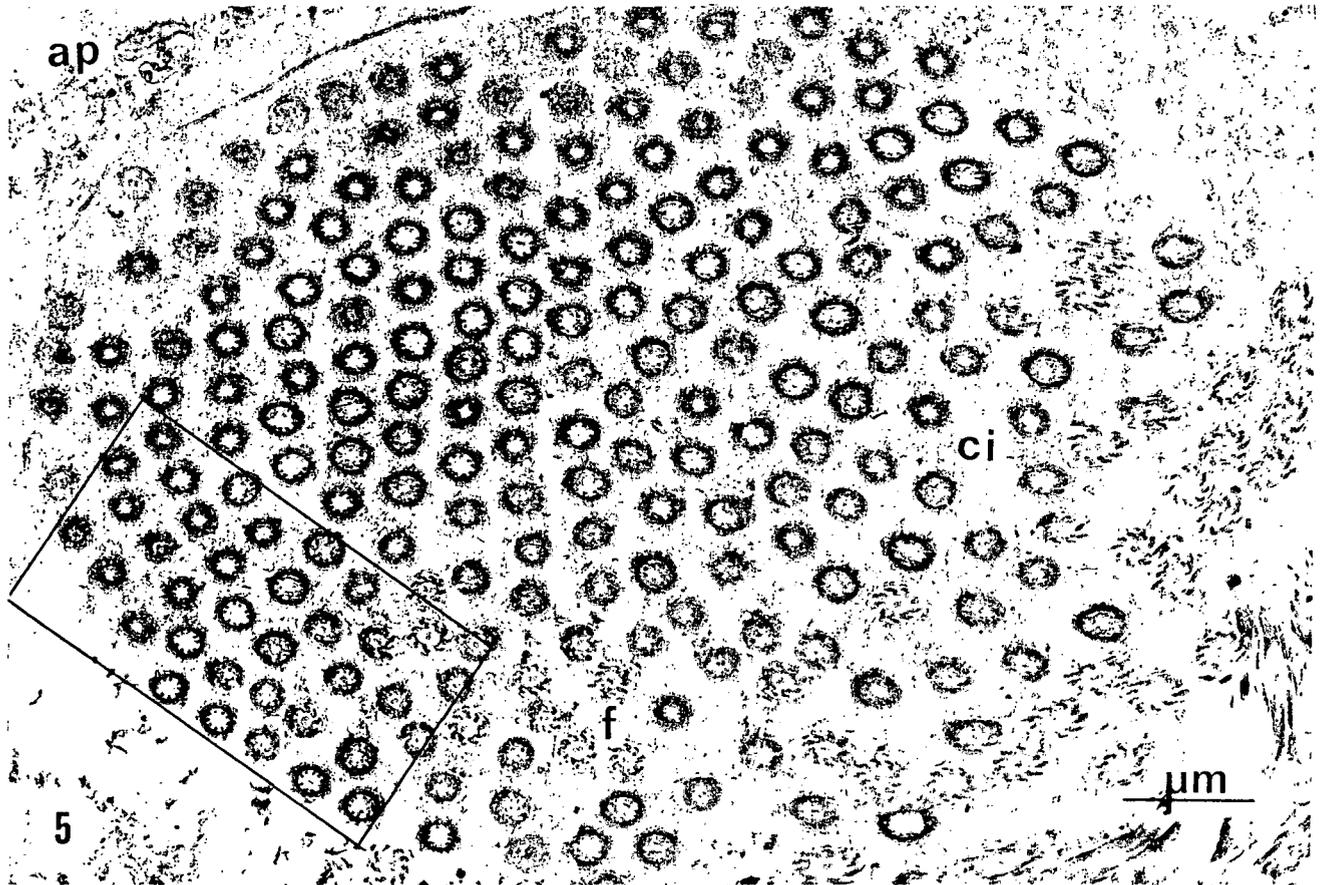


FIGURAS 05 e 06 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 05 - Secções transversais ao nível de porções cefálicas e de flagelos (f), em suas regiões iniciais, de espermatozóides apirenes (ap) imersos no citoplasma da célula apical cística (ci). Observam-se diferentes níveis de corte dos espermatozóides. 17.000x.

Fig. 06 - Visão ampliada dos espermatozóides apirenes contidos no retângulo da fig. 05, com destaque para vários níveis de corte (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), desde a região apical (1) até o início do axonema (ax) (7), no qual observam-se: os 2 microtúbulos centrais (mc); as 9 duplas periféricas (dp) de microtúbulos e os 9 microtúbulos acessórios (ma), rodeados pela membrana plasmática (mp). Notam-se, também, camadas externas (►) com diferentes elêtron densidades e, às vezes, com aspecto filamentosos (fi) 63.000x.

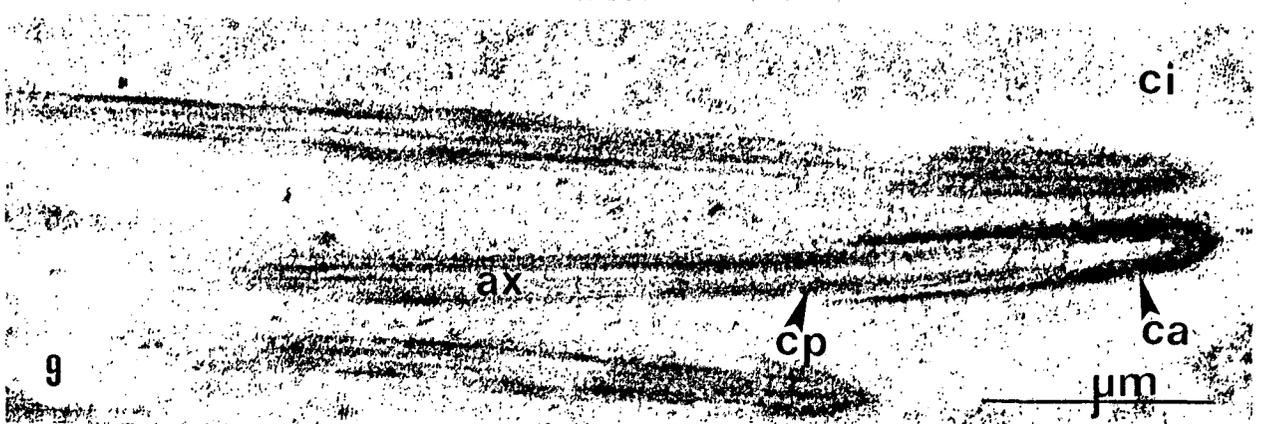
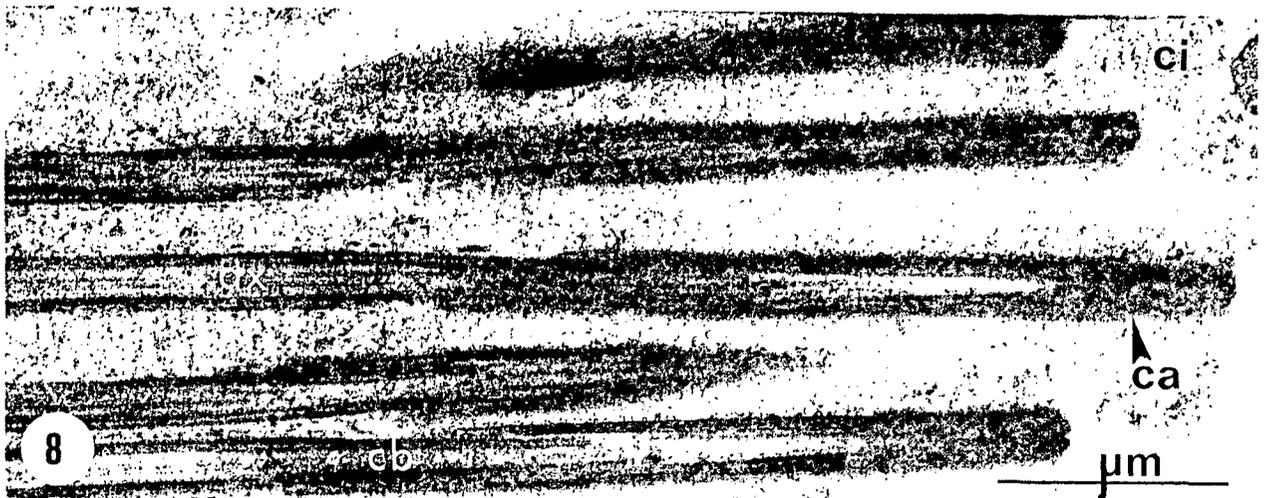
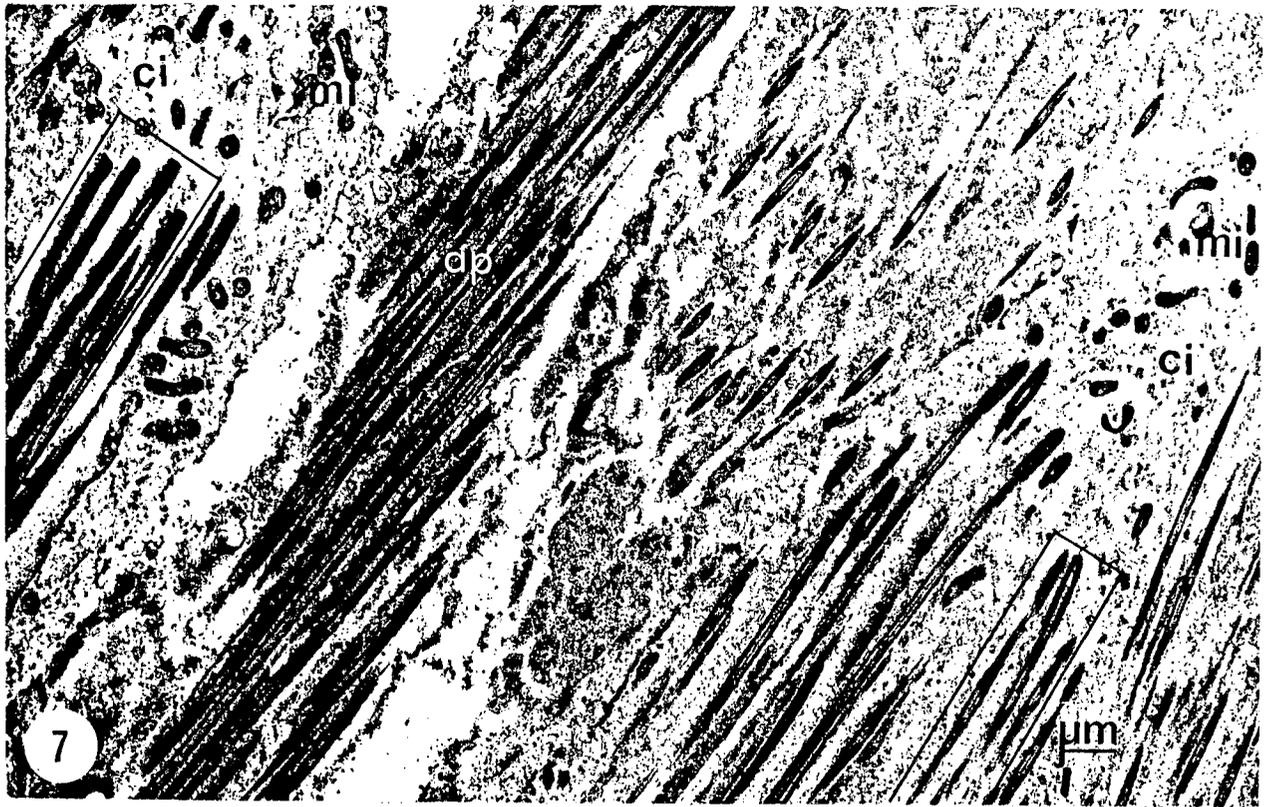


FIGURAS 07 a 09 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 07 - Aspecto geral de feixes de espermatozóides apirenes (ap), em secções longitudinais e oblíquas. As porções anteriores se encontram imersas nas células císticas (ci), em cuja região apical, notam-se ainda várias mitocôndrias (mi). 6.700x.

Fig. 08 e 09 - Destaques ampliados das áreas com feixes de espermatozóides apirenes inscritos nos retângulos da fig. 07. Observam-se: a presença de um capuz (ca) na porção anterior dos espermatozóides, com uma região apical elétrondensa e a presença de um cilindro periférico (cp), localizado no início do axonema (ax). Fig. 08 29.800x; Fig. 09 - 30.500x.



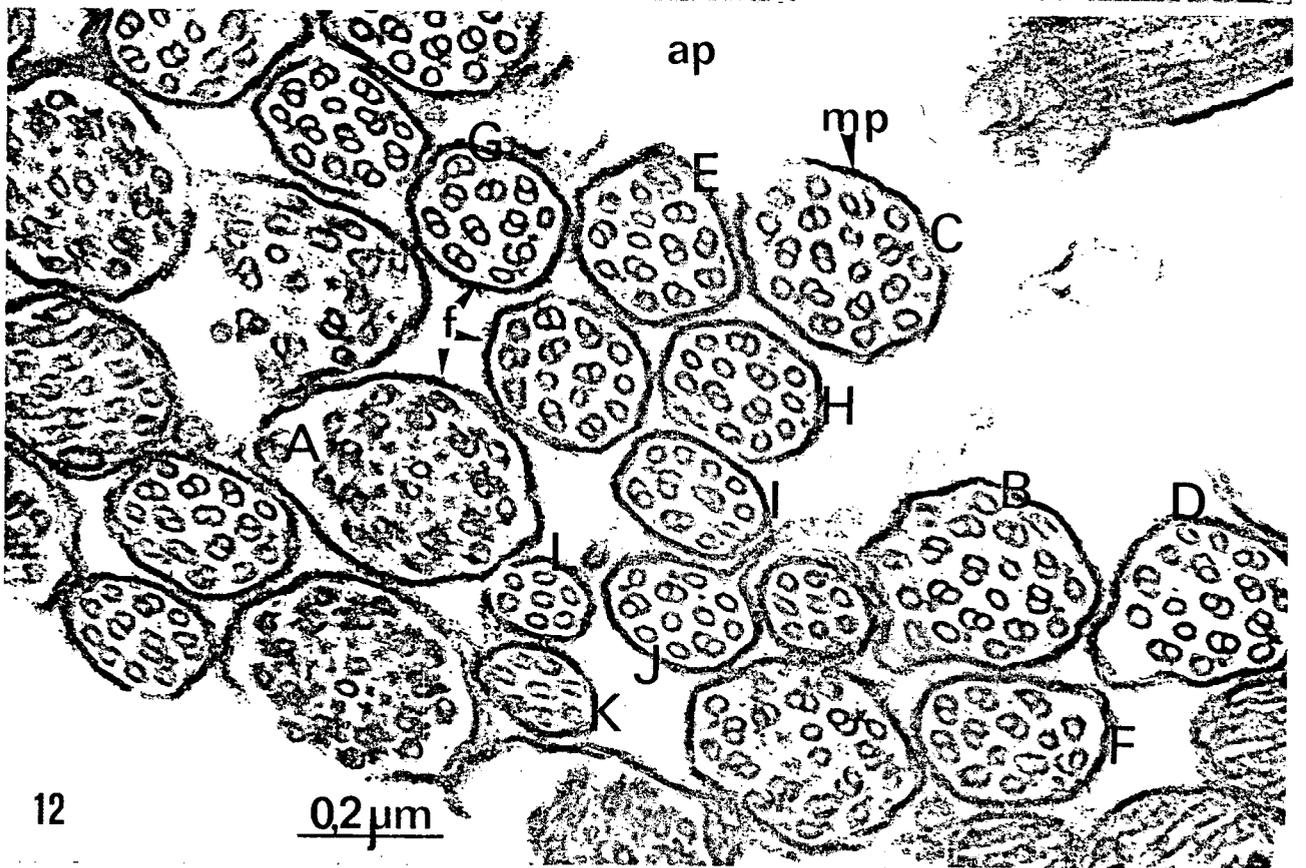
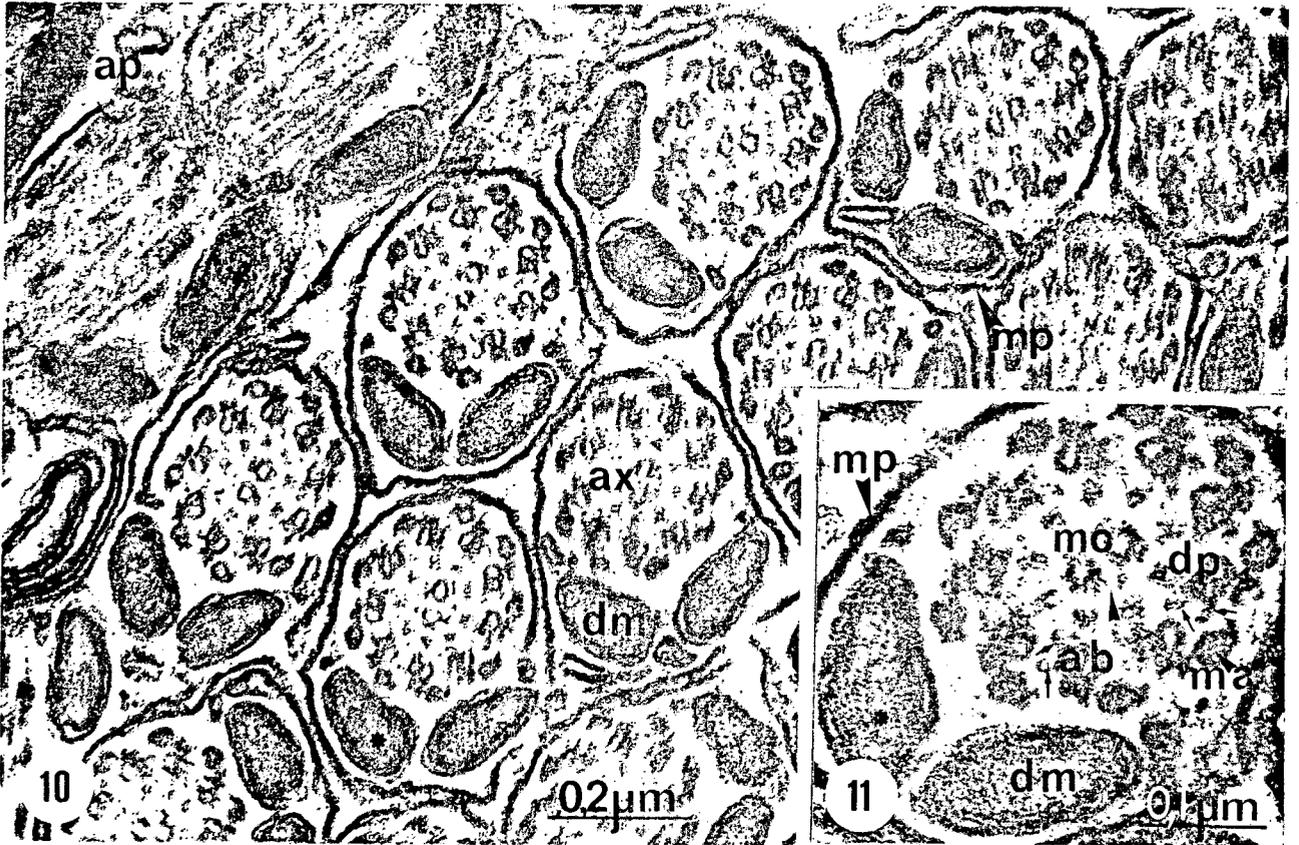
FIGURAS 10 a 12 - ESPERMÁTIDES E ESPERMATOZÓIDES APIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 10 - Espermatozóides apirenes (ap) quase maduros, cortados transversalmente ao nível da porção principal e mediana dos flagelos, destacando-se: o axonema (ax); os 2 derivados mitocondriais (dm) com regiões mais elétron-densas ( \* ) de aspecto estriado; e a membrana plasmática (mp) trilaminar. 92.800x.

Fig. 11 - Aspecto ampliado de um espermatozóide apirene da figura anterior, com destaque para a estrutura do axonema: os 2 microtúbulos centrais (mc) elétron-transparentes e sua bainha envoltória ( > ); as 9 duplas periféricas de microtúbulos (dp) e suas subunidades "a" - com braços de dineína (↔)-e "b"; e os 9 microtúbulos acessórios (ma) elétron-densos. Nota-se que os 2 derivados mitocondriais (dm), de tamanhos semelhantes, possuem regiões elétron-densas de natureza periódica ( \* ) e a presença da membrana plasmática (mp). 160.000x.

Fig. 12 - Porções terminais de flagelos (f) de espermatozóides apirenes (ap), seccionadas transversalmente em diferentes níveis (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L), desde a porção com axonema ainda organizado (A) até aquela com apenas 7 microtúbulos elétron-transparentes e isolados (L). 92.800x.

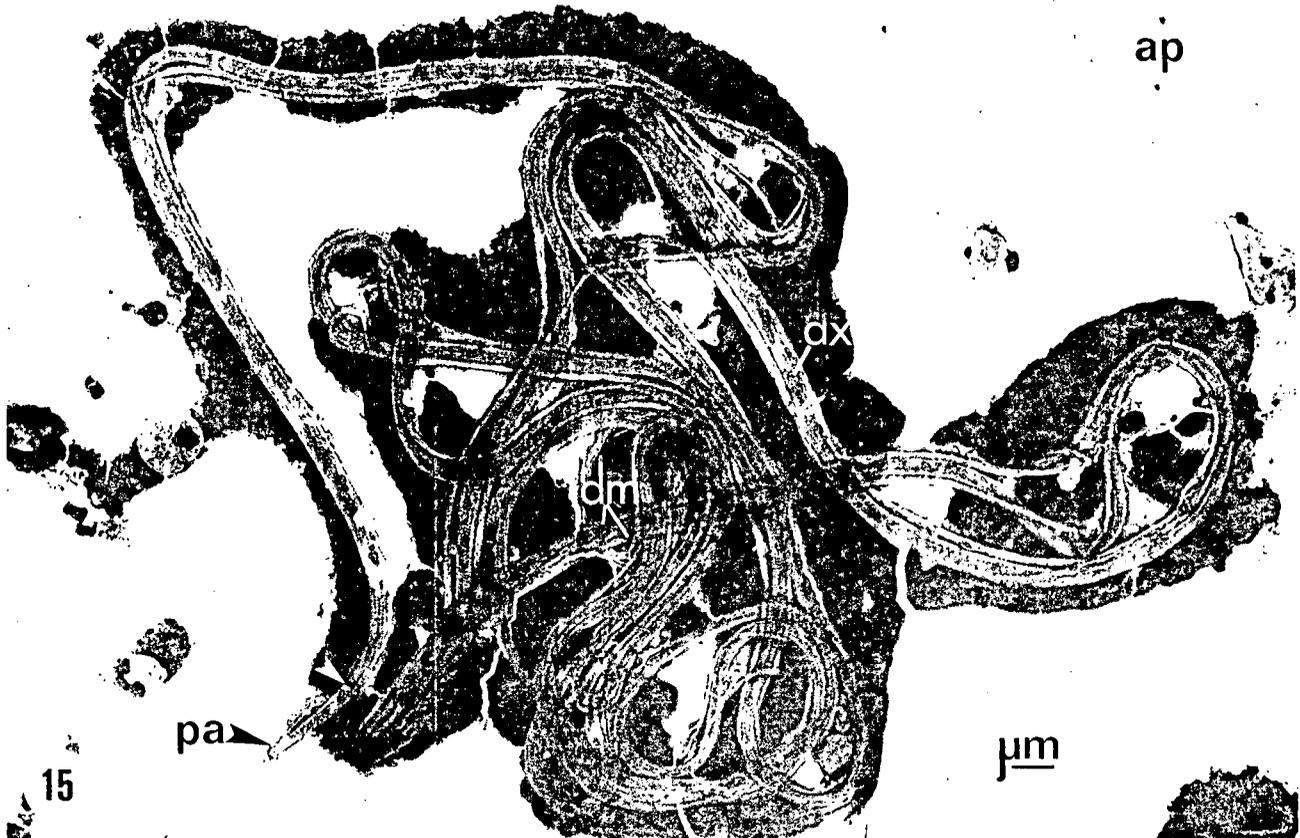
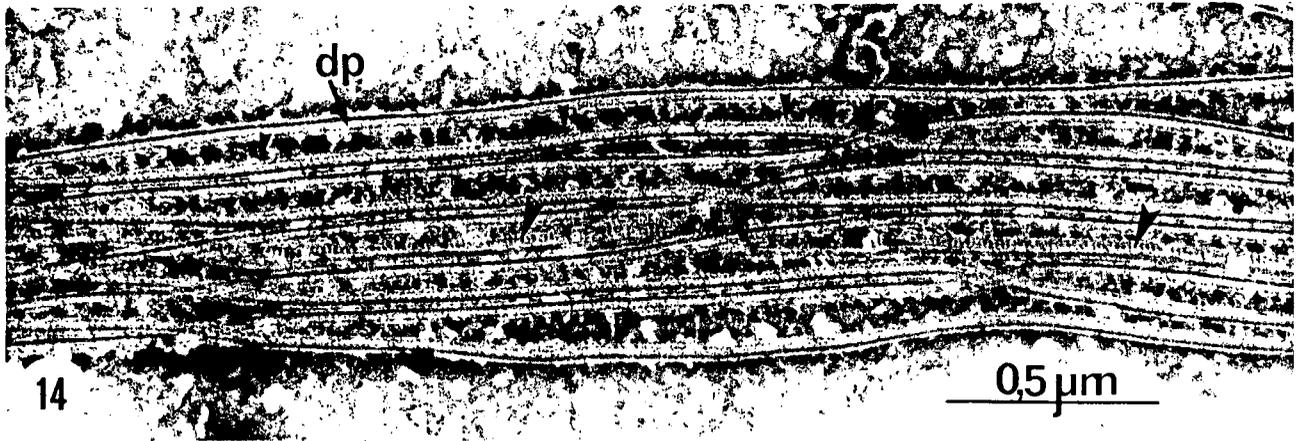
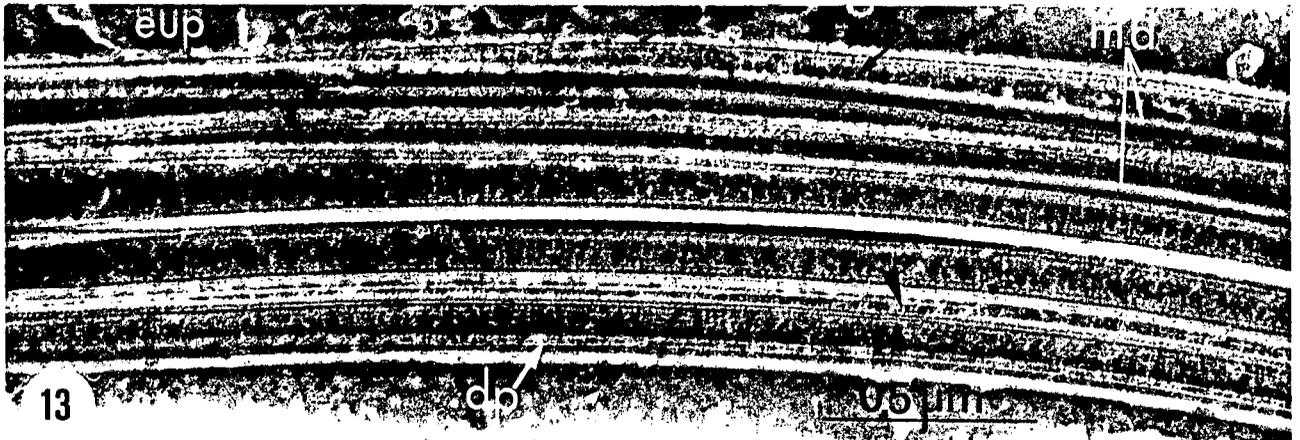


FIGURAS 13 a 15 - ESPERMATOZÓIDES EUIRENE E APIRENE NO TESTÍCULO.

Contrastação Negativa (Fosfotungstato de Potássio a 1%).

Fig. 13 e 14 - Axonemas parcialmente desorganizados, destacando-se: microtúbulos acessórios (ma); duplas de microtúbulos periféricos (dp) com pontes ( $\rightarrow$ ); elementos da bainha ( $\blacktriangleright$ ) que envolve os microtúbulos centrais; e braços de dineína ( $\blacktriangleright$ ) que se projetam das subunidades "a" das duplas periféricas. Eupirene = eup. 54.900x.

Fig. 15 - Espermatozóide apirene (ap) com aproximadamente 260  $\mu$ m de comprimento. Observam-se: a pequena porção anterior (pa); e a região ( $\odot$ ) onde se iniciam os derivados mitocondriais (dm) que ladeiam o axonema (ax) em quase toda sua extensão. 5.100x.

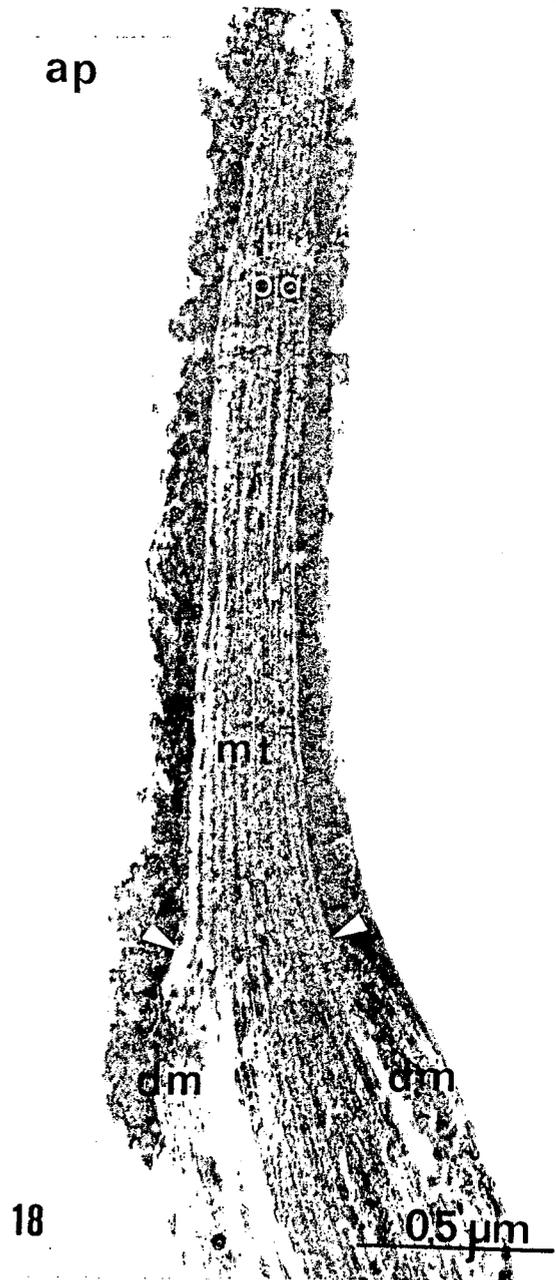
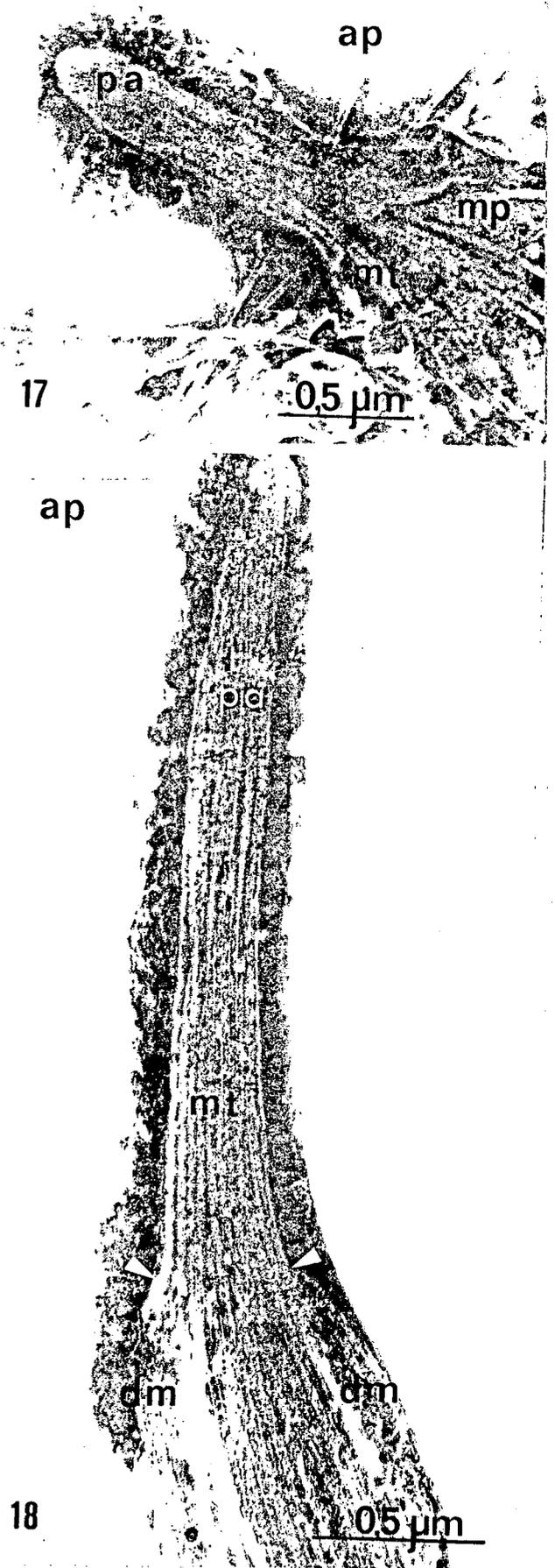


FIGURAS 16 a 18 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NO TESTÍCULO.

Contrastação Negativa (Fosfotungstato de Potássio a 1%).

Fig. 16 - Flagelos de espermatozóides apirenes (ap). No flagelo central distinguem-se: o axonema (ax) e os derivados mitocondriais (dm) que o ladeiam, em cujas regiões internas evidencia-se um eixo de natureza paracristalina (\*). 74.600x.

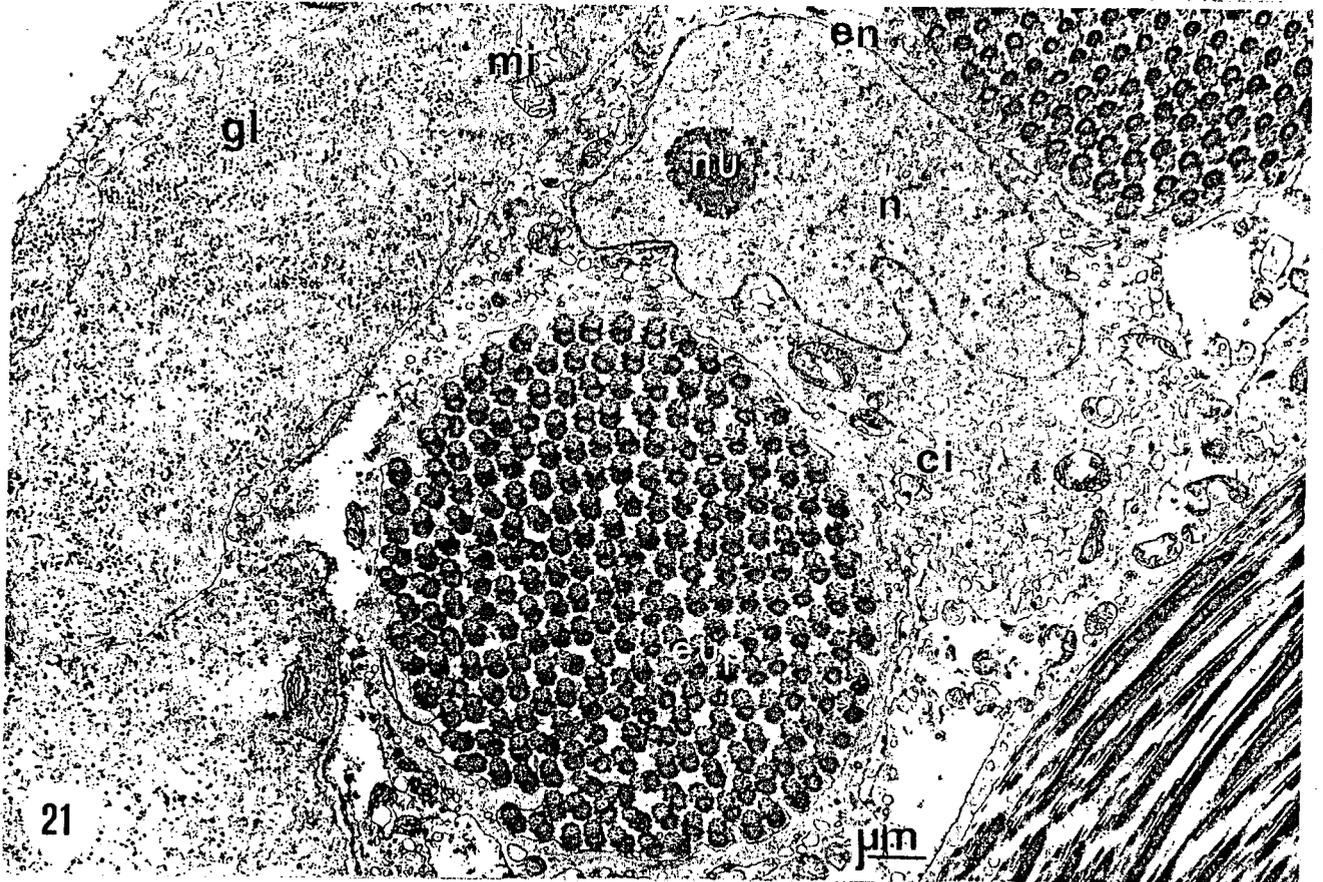
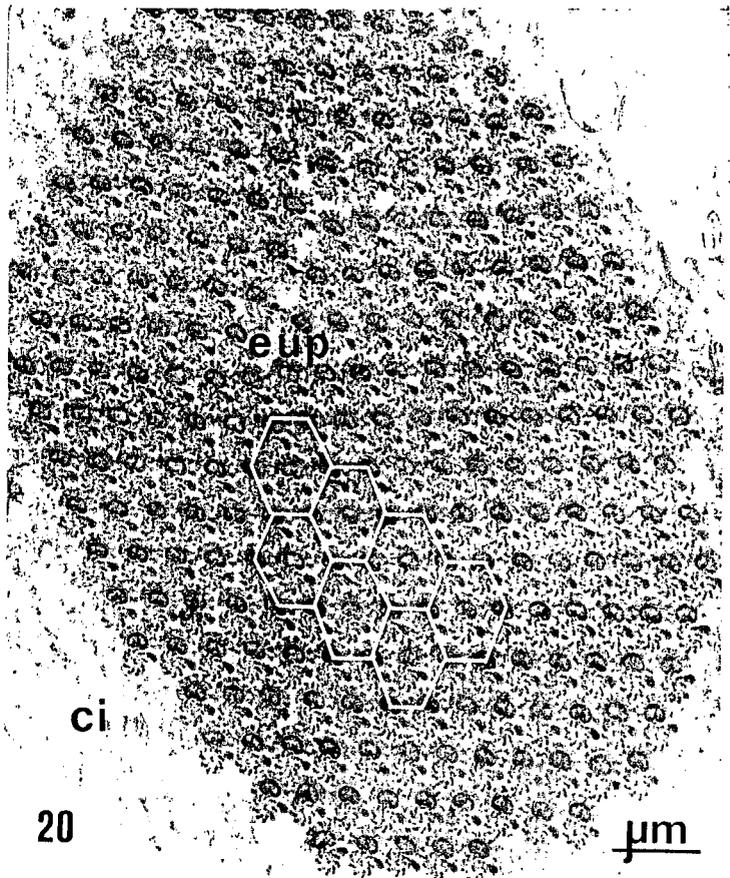
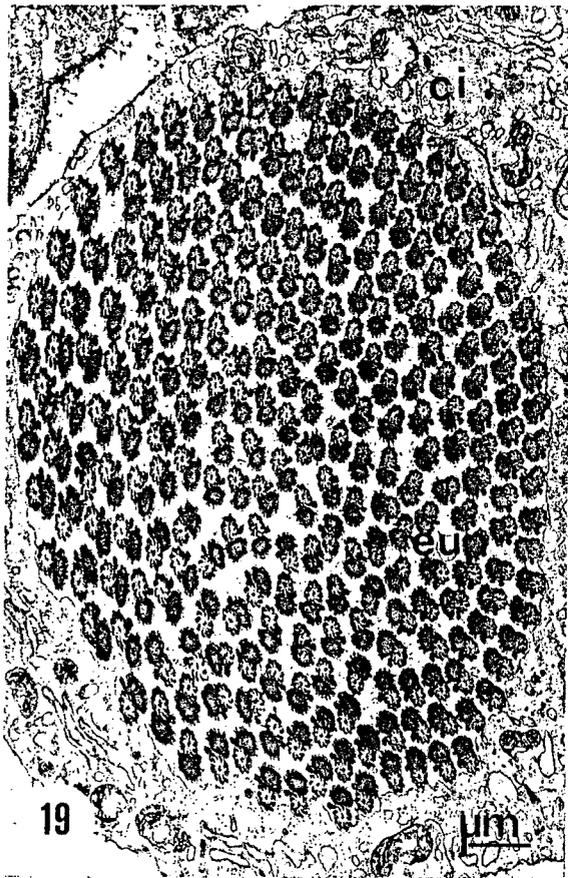
Fig. 17 e 18 - Porções anteriores (pa) de espermatozóides apirenes (ap), nas quais evidenciam-se os microtúbulos (mt) envoltos por uma membrana (mp), na fig. 17, e a região (●) onde termina a porção cefálica do espermatozóide, com início dos derivados mitocondriais (dm), como mostra a fig. 18. Fig. 17 - 40.000x; Fig. 18 - 51.000x.



FIGURAS 19 a 21 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 19 a 21 - Três cistos (ci) eupirenes (eup), cada um com  $256 \pm 1$  espermatozóides, seccionados transversalmente ao nível de flagelos, em alturas diferentes. Na fig. 20, os espermatozóides estão dispostos em fileiras regulares numa peculiar configuração geométrica hexagonal, que também é observada na periferia do próprio feixe. Na fig. 21, evidencia-se: o núcleo (n) da célula cística (ci), com o nucléolo (nu) e o envelope nuclear (en) bem nítidos; mitocôndrias (mi) e abundantes partículas de glicogênio (gl). Fig. 19 - 7.800x; Fig. 20 - 11.200x; Fig. 21 - 7.600x.



FIGURAS 22 a 24 - ESPERMATOZÓIDES EUIPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 22 e 23 - Cortes transversais, em diferentes níveis, de regiões cefálicas de espermatozóides eupirenes (eup), imersos no citoplasma da célula cística (ci) apical. Revestindo a membrana plasmática (mp) próxima do núcleo (n), observa-se uma coroa radial incompleta composta de 13 a 20 apêndices laciniados (al) curtos, recobertos parcialmente por um laciniado mais longo e/ou por um apêndice reticular (ar) mais denso. Membrana plasmática da célula cística = mpc. Próximo à região aplanada do núcleo, há uma área elêtron-densa (▶) de aspecto amorfo. A linha branca indica o provável nível de corte representado na fig. 24. Mitocôndria = mi.  
Fig. 22 - 46.600x; Fig. 23 - 47.600x.

Fig. 24 - Aspecto do corte representado pela linha branca na fig. 22. Os apêndices laciniados (al) e reticular (ar) se dispõem, de modo contínuo, ao longo da porção cefálica do espermatozóide. 44.800x.

BRITISH MUSE  
NATURAL HISTORY

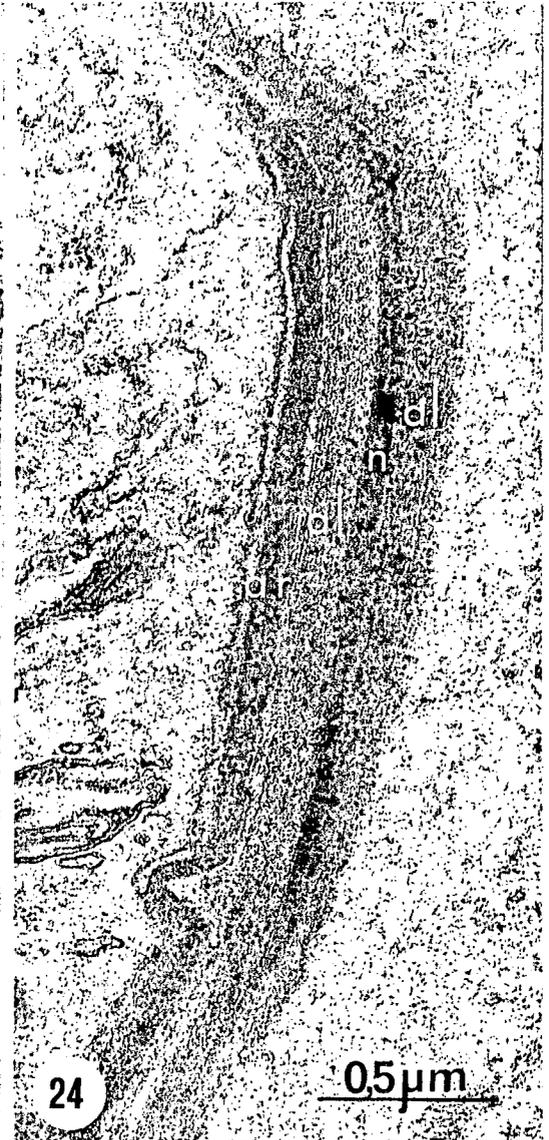
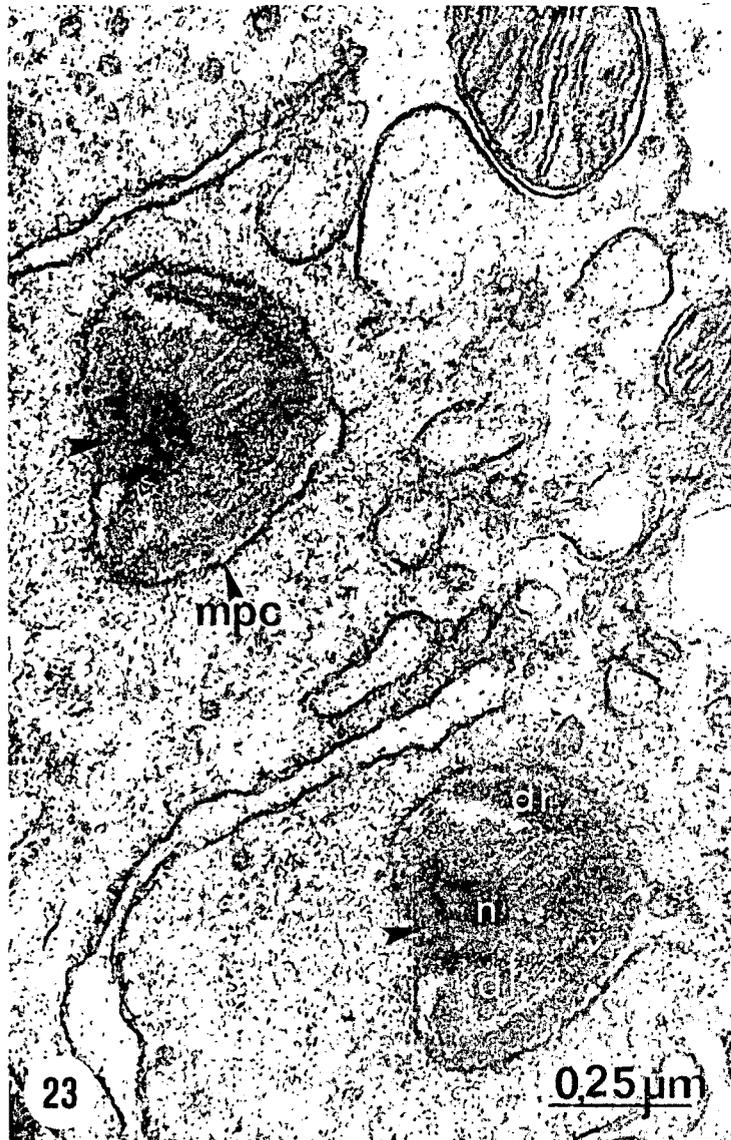
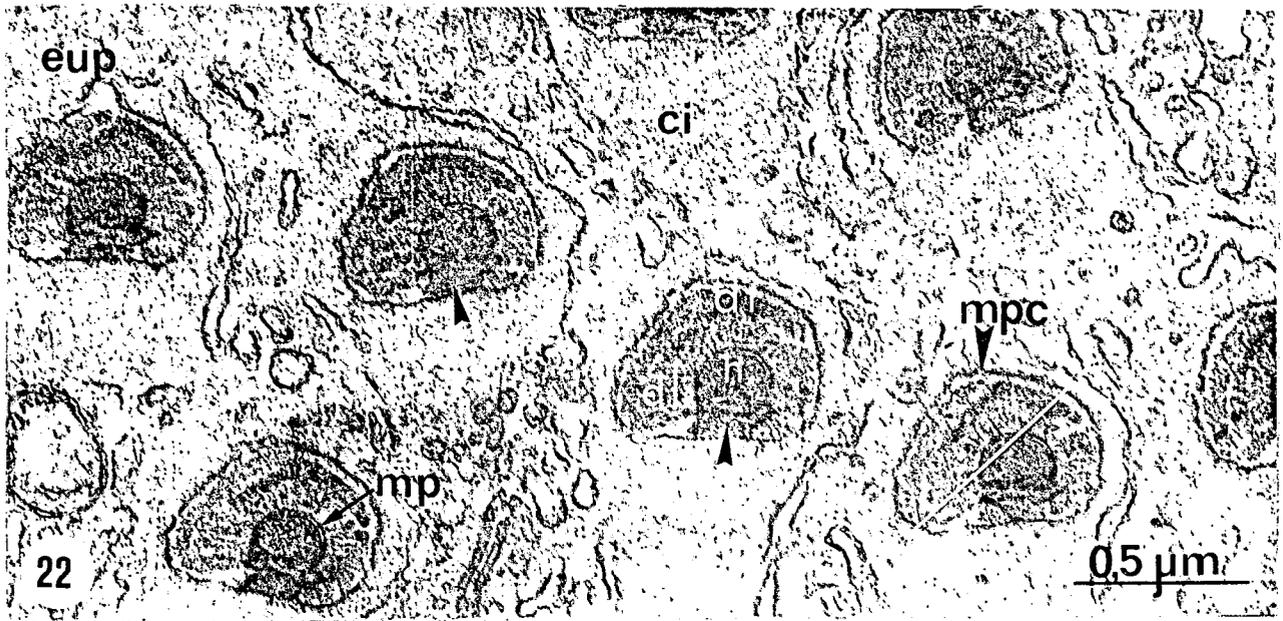


Fig. 27 - Corte transversal de porções iniciais de flagelos de espermatozoides eupirenes. Nota-se que os espermatozoides formam um feixe com orientação definida, indicada pela posição do apêndice reticular (ar). A seta indica um espermatozoide com seu apêndice reticular em posição diferente dos demais. Os apêndices laciniados (al), em número de 15 a 18, mais longos e individualizados, rodeiam os derivados mitocondriais (dm) e quase completamente os axonemas (ax). 32.600x.

Fig. 28 - Ampliação de um espermatozoide eupirene da fig. 27. Observa-se: um volumoso e arredondado apêndice reticular (ar), localizado na direção da dupla periférica nº 1 do axonema; os apêndices laciniados (al) rodeando quase completamente o flagelo: um pequeno derivado mitocondrial (dm); e no axonema, os 2 microtúbulos centrais (mc) elétrondensos, os 9 microtúbulos acessórios (ma) de conteúdo bem elétron-denso (setas brancas) e as 9 duplas periféricas (dp), mostrando o nítido padrão 9+9+2 do axonema. A seta preta indica um glóbulo elétron-denso associado à base do apêndice reticular. 166.000x.

FIGURAS 25 a 28 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 25 - Cisto com 256  $\pm$  1 espermatozóides eupirenes (eup), seccionados transversal e obliquamente ao nível de porções cefálicas e regiões iniciais de flagelos. Nota-se que, apenas, as regiões nucleares e as próximas a elas estão envoltas pelo citoplasma da célula cística. 7.000x.

Fig. 26 - Alguns espermatozóides eupirenes cortados transversalmente ao nível de: (1) núcleo (n); (2) e (3) corpúsculo basal (cb); (4) porção inicial de flagelo, ainda com presença de núcleo; e (5) região subsequente ao início do flagelo. Observa-se uma coroa de apêndices laciniados (al), rodeando completamente o núcleo (1) e, de modo incompleto, ao redor do corpúsculo basal e núcleo (3), do axonema e núcleo (4) e somente do axonema (ax) (5). Nota-se, também, a gradual modificação de forma, volume e posição do apêndice reticular (ar). 46.600x.

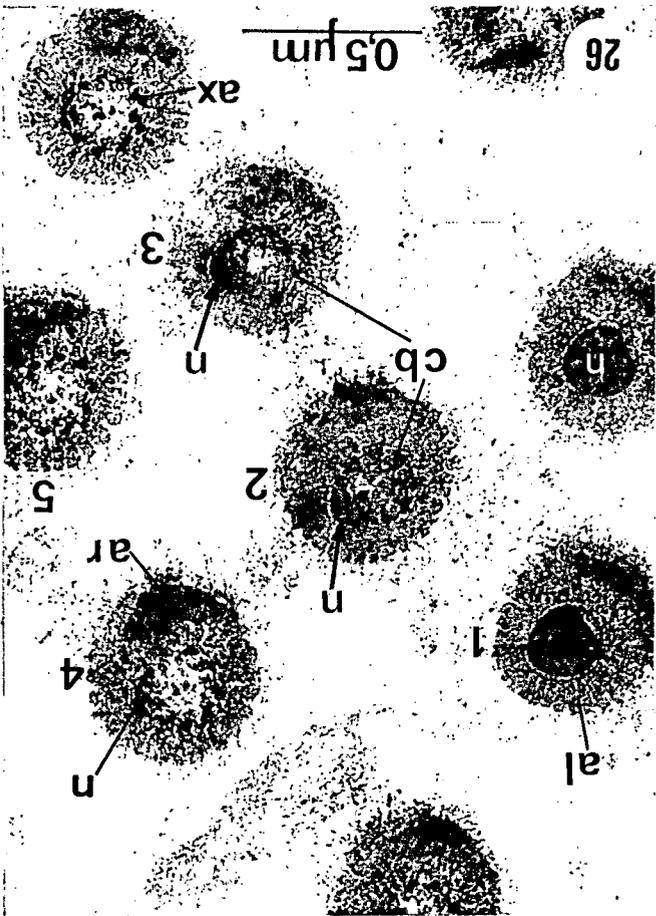
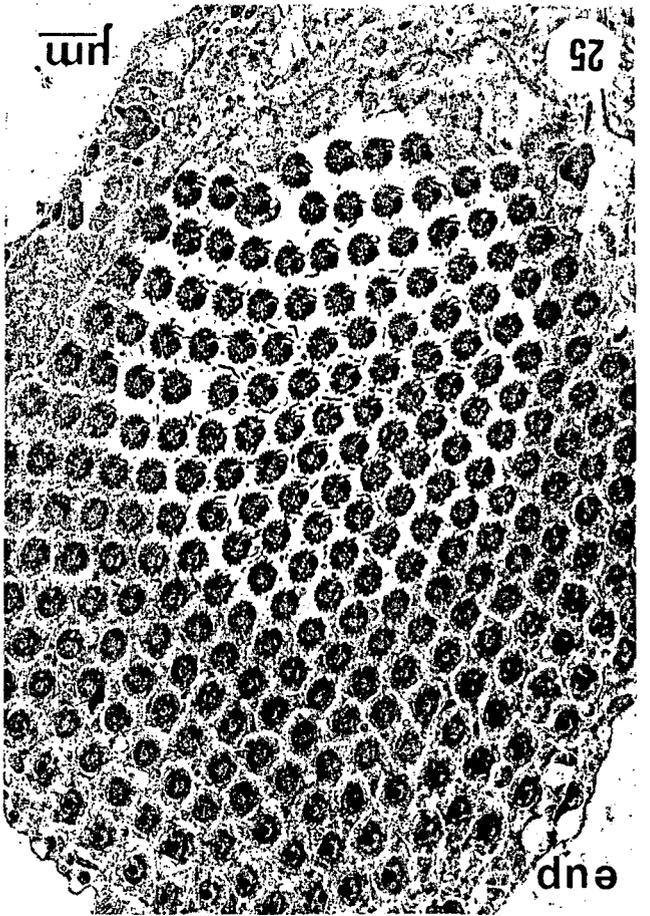
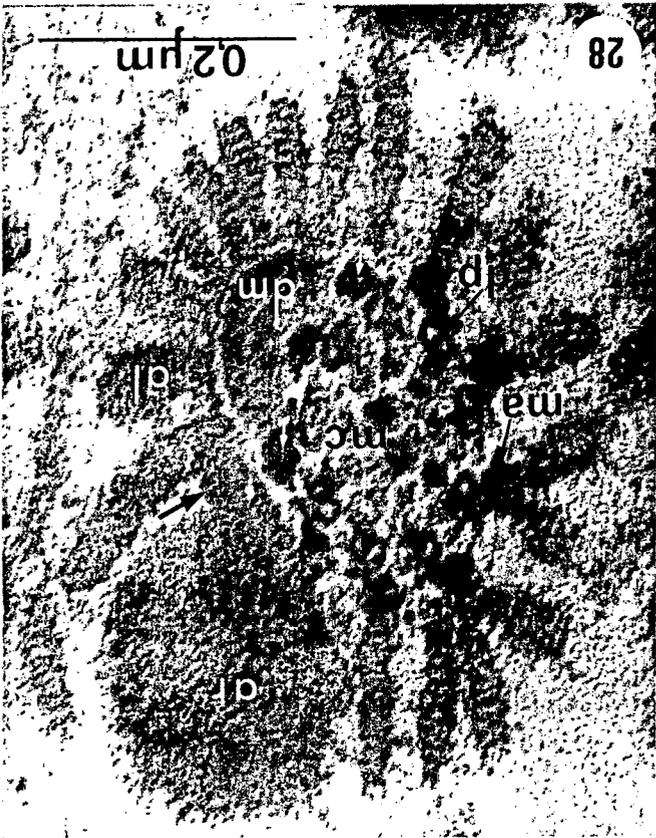
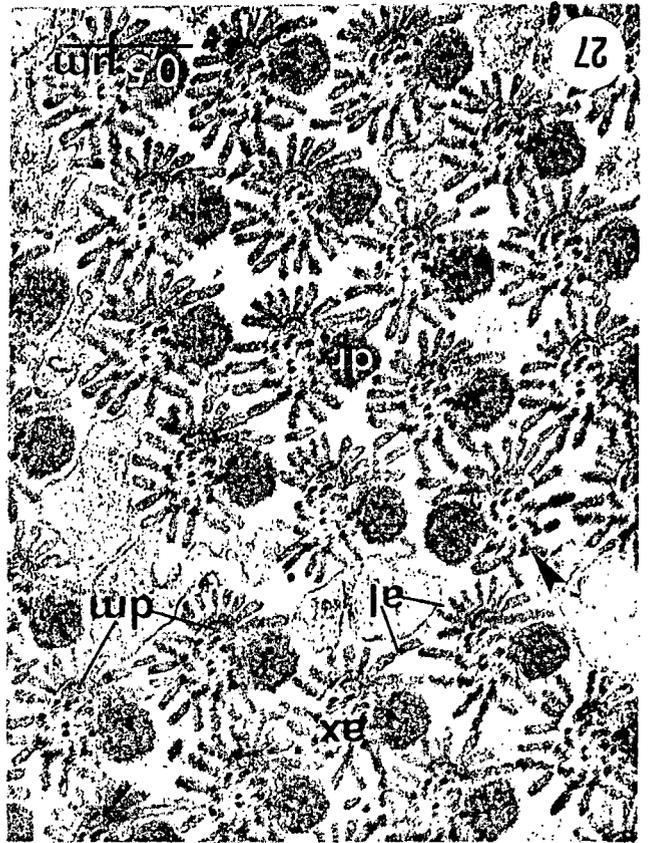


Fig. 31 - Maior ampliação de flagelos da fig. 30. Observa-se que o apêndice reticular (ar) mantém sua posição típica (linha branca) em relação à dupla periférica nº 1 do axonema (ax), o qual, por sua vez, é visto da ponta para a base. Destaque para a posição do derivado mitocondrial (dm) que mantém um ângulo de aproximadamente  $30^{\circ}$ , em relação ao eixo que passa pelos microtúbulos centrais. Nota-se, também, que os microtúbulos acessórios (ma) apresentam um conteúdo bem elétron-denso (setas brancas). Membrana plasmática (▶) nítida. 106.400x.

FIGURAS 29 a 31 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 29 - Cisto (ci) de espermatozóides eupirenes (eup), em corte transversal ao nível de regiões anteriores das porções principais dos flagelos, mostrando um número menor (de 06 a 11) de apêndices laciniados (al), que estão quase restritos à área dos derivados mitocondriais. O apêndice reticular (ar), elétron-denso, mantém seu aspecto globular e sua posição típica. Nota-se, no interior do círculo, um flagelo anormal com 2 axonemas, 2 derivados mitocondriais e 1 apêndice reticular, rodeado parcialmente por 8 apêndices laciniados. 16.600x.

Fig. 30 - Ampliação de um grupo de espermatozóides correspondentes aos da fig. 29. Os apêndices laciniados, em número de 7 a 8, estão praticamente restritos à periferia dos derivados mitocondriais (dm) e nitidamente acolados à membrana plasmática (►). O apêndice reticular apresenta pequenas expansões filamentosas (↔) na sua superfície livre. Eventualmente, são observadas pequenas pontes (p) que ligam o apêndice reticular à membrana plasmática que envolve o flagelo. 53.200x.

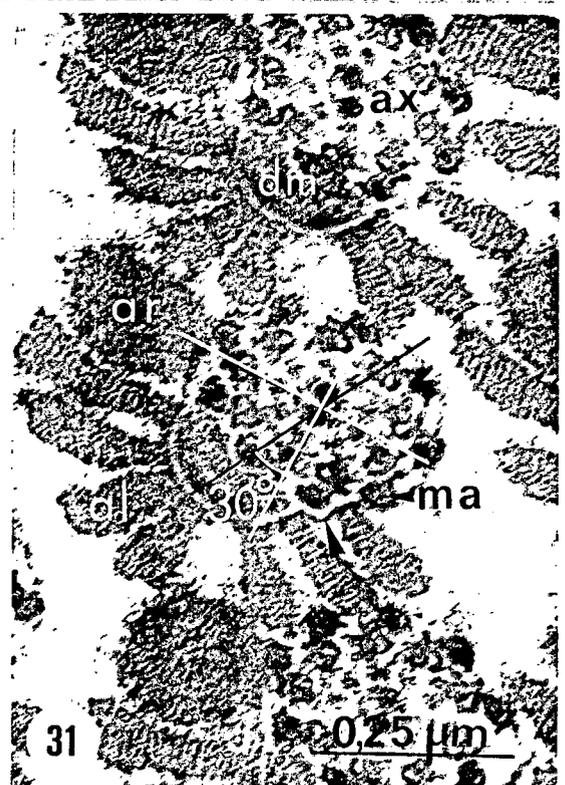
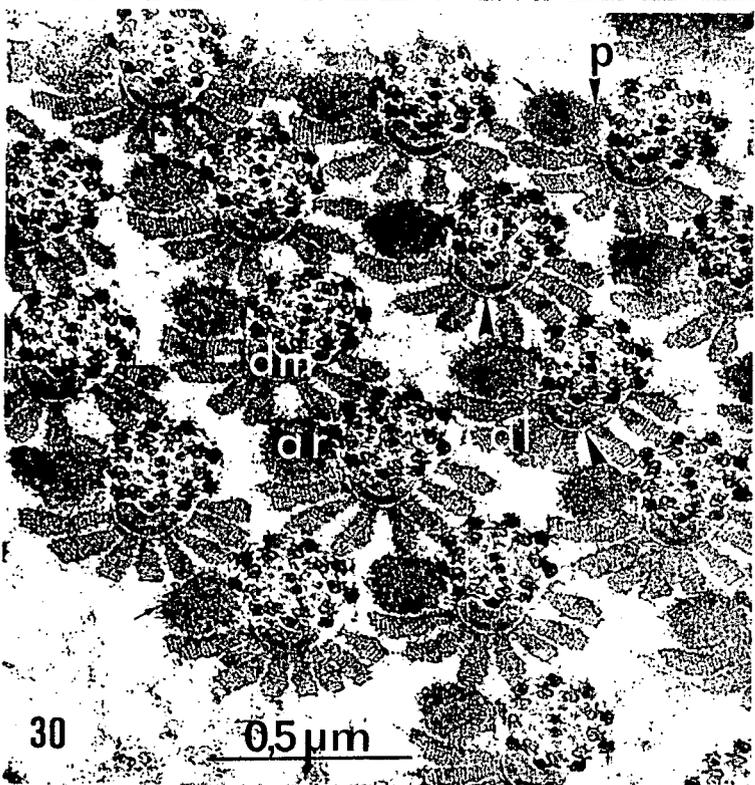
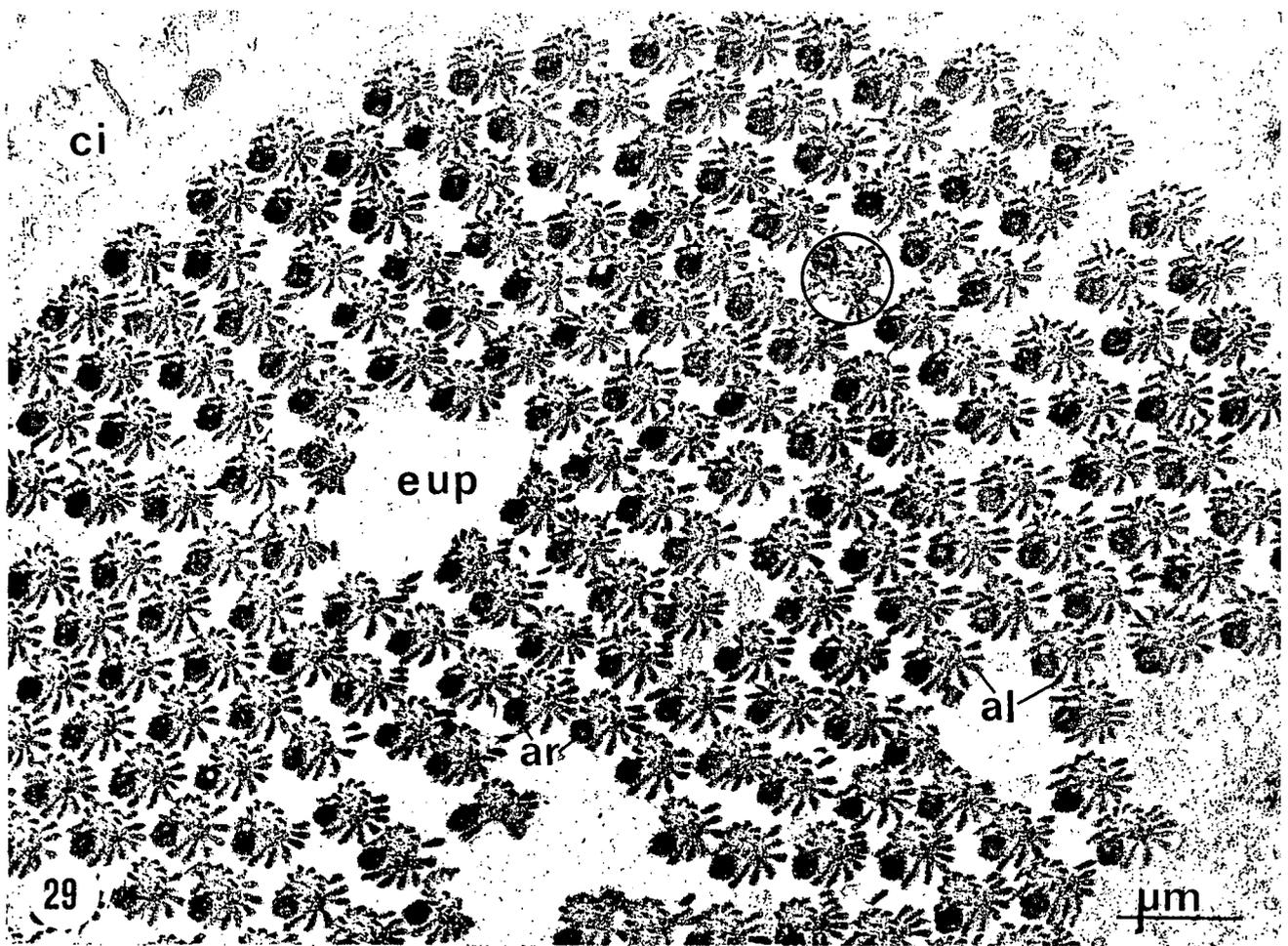


Fig. 34 - Cortes longitudinal e tangencial de flagelos de espermatozoides, mostrando: grupos de glóbulos de aspecto vesiculoso (→) localizados entre os apêndices reticulares, os axonemas e os apêndices laciniados mais próximos dos reticulares. Destaque também para os apêndices laciniados que se dispõem, de modo contínuo, ao longo dos flagelos, acompanhando os derivados mitocondriais (dm). 28.200x.

FIGURAS 32 a 34 - ESPERMATOZÓIDES EUIPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 32 - Feixe de espermatozóides eupirenes (eup), seccionados transversalmente ao nível da porção principal dos flagelos, numa altura um pouco mais posterior a daqueles das fig. 29, 30 e 31. O número de apêndices laciniados (al), acolados à membrana plasmática (mp), é também de 7 a 8. Entre o apêndice reticular (ar) e o apêndice laciniado mais próximo, destaca-se a presença de pequenos glóbulos elétron-densos, de tamanhos variáveis (→), evidentes também nas fig. 33 e 34. Os derivados mitocondriais (dm) são um pouco mais volumosos. Destaque para um apêndice reticular (➤) em posição oposta aos demais. 43.800x.

Fig. 33 - Vista ampliada de espermatozóides da figura anterior. Destaque para: os apêndices reticular e laciniados apostos à membrana plasmática; os glóbulos densos (→); os microtúbulos acessórios (ma), do axonema, com seu conteúdo fortemente elétron-denso (➤). 88.600x.

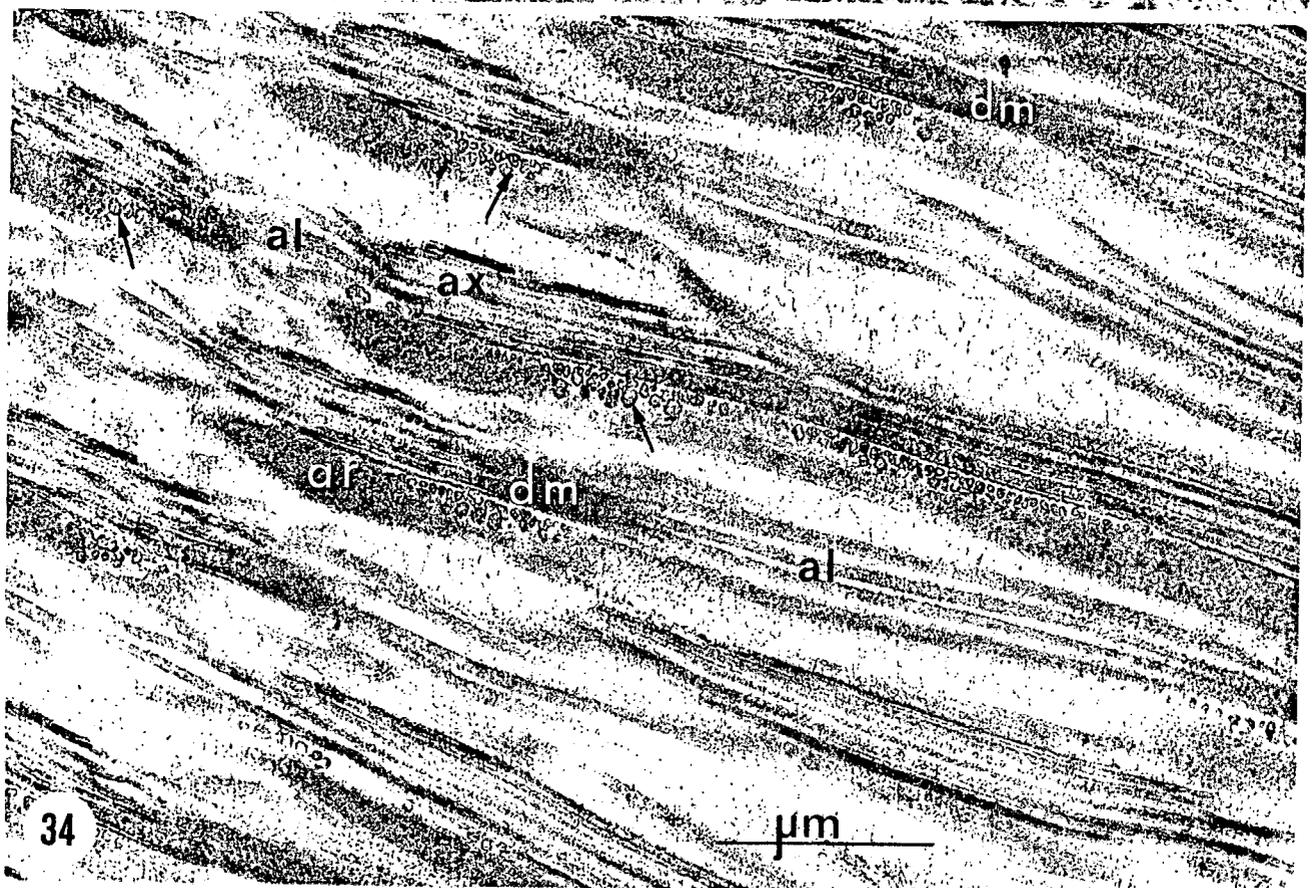
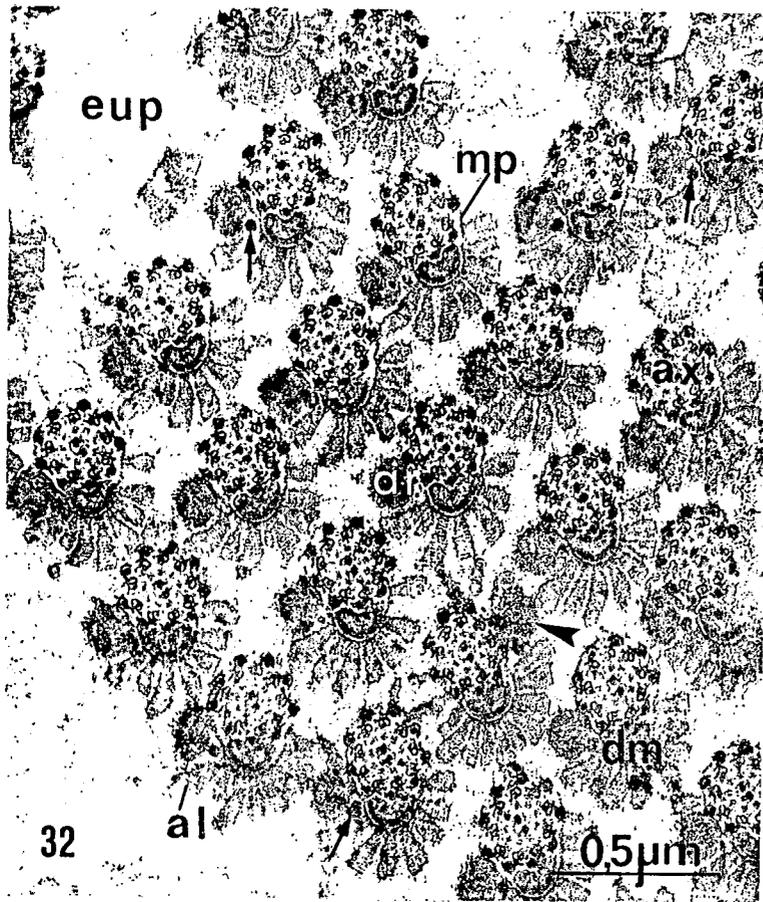


Fig. 37 - Ampliação maior de espermatozoides eupirenes no mesmo nível de corte que os mostrados nas fig. 35 e 36. Destacam-se: os apêndices reticular e lacinados aderidos à membrana plasmática; os derivados mitocondriais com seu aspecto reniforme peculiar; e no axonema, os microtúbulos acessórios (ma) com seu conteúdo elétron-denso (►) e as fibras densas (fd) que os interligam, as duplas periféricas (dp) de microtúbulos e os microtúbulos centrais (mc). 136.400x.

FIGURAS 35 a 37 - ESPERMATOZÓIDES EUIPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 35 - Feixe de espermatozóides eupirenes (eup), em corte transversal ao nível dos flagelos, observados na direção da base para a ponta dos axonemas (ax). Nota-se que, neste nível de corte, os apêndices laciniados (al), em número de 8 a 9, acolados à membrana plasmática (mp), recobrem somente a periferia dos derivados mitocondriais (dm), agora mais volumosos que nos cortes anteriores. Apêndice reticular (ar) ainda com aspecto arredondado. 42.500x.

Fig. 36 - Visão ampliada da fig. 35. Destaque para: a estrutura de natureza periódica dos apêndices laciniados aderidos à membrana plasmática; a superfície irregular (↔) do apêndice reticular; as pontes (p) de ligação entre o apêndice reticular e a membrana plasmática. No derivado mitocondrial, observa-se na camada cortical elétron-densa, próximo ao axonema (ax), um eixo longitudinal (○). 88.600x.

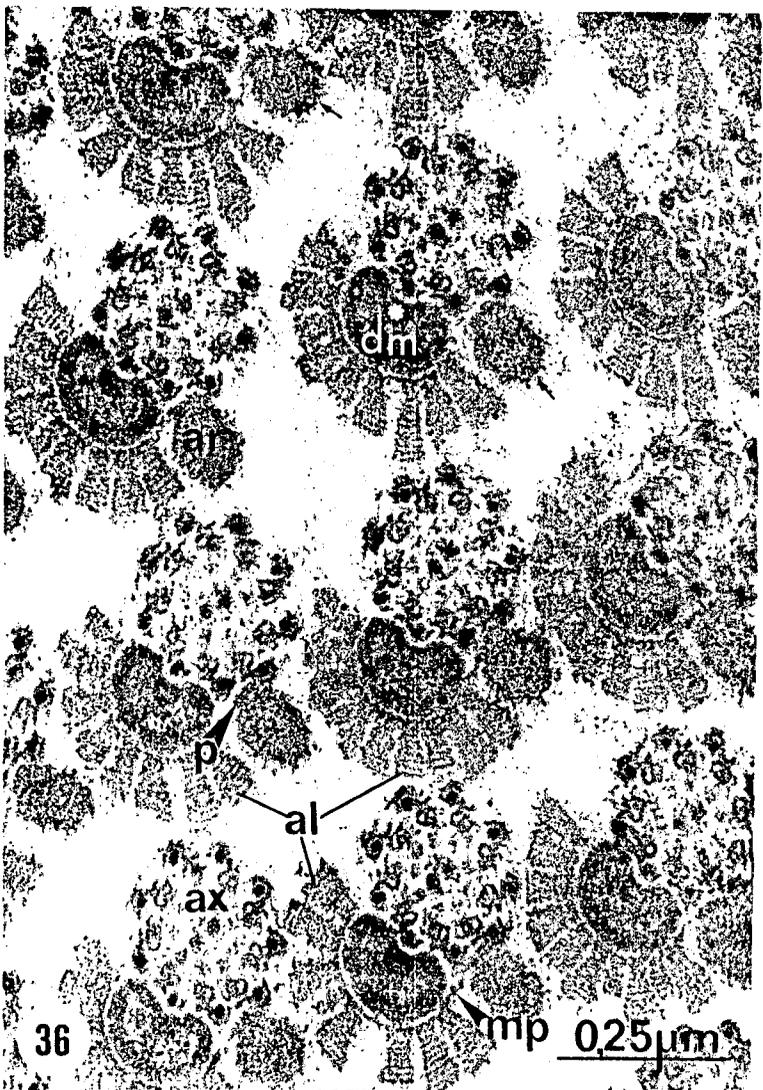
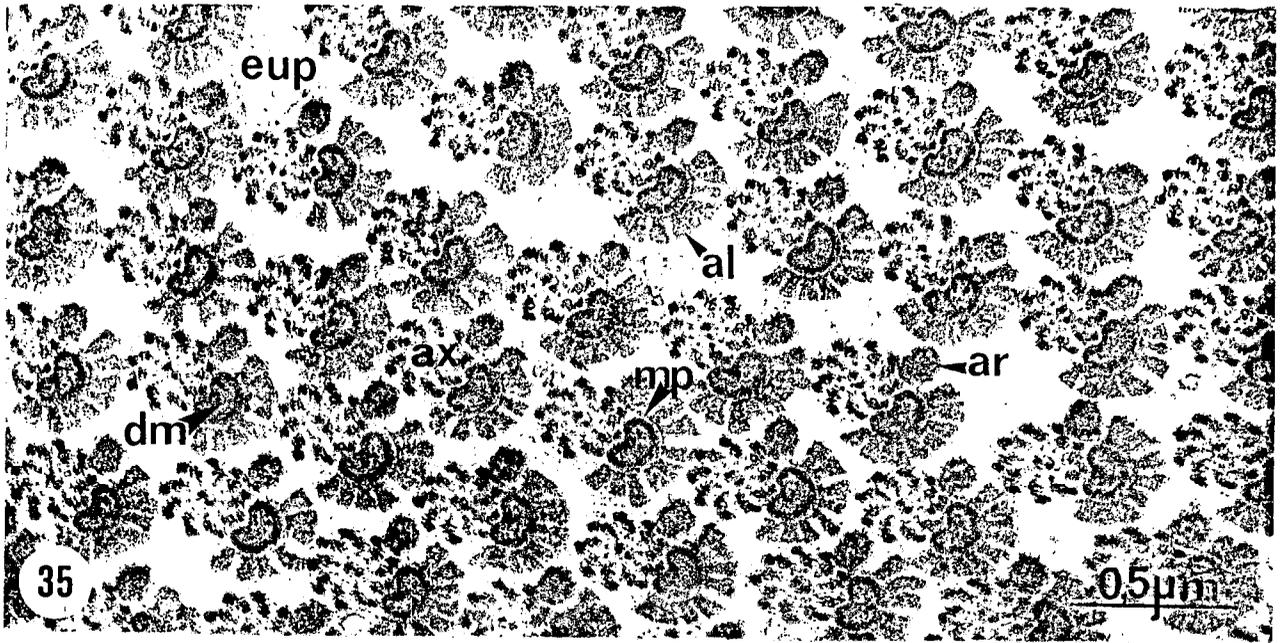


Fig. 40 - Visão ampliada do cisto à esquerda, na fig. 38.

Nota-se que, em cada espermatozóide, os apêndices laciniados estão bem mais curtos, às vezes pouco distintos e quase ausentes, e em número muito variável. O apêndice reticular arredondado apresenta menor volume. Notam-se, agora, dois derivados mitocondriais (dm1 e dm2) de diferentes tamanhos e com nítidos limites de separação (setas brancas). O axonema (ax) é também visto da ponta para a base. Destaque para a membrana plasmática (mp).

46.600x.

FIGURAS 38 a 40 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 38 - Aspecto parcial de dois cistos eupirenes (eup), cujos espermatozóides foram seccionados transversalmente, em diferentes alturas, ao nível da porção principal dos flagelos, num plano mais posterior aos apresentados nas figuras anteriores. Já se observa, nos espermatozóides do cisto à esquerda, um segundo derivado mitocondrial (►). Entre as duas células císticas (ci), são vistas junções celulares do tipo septada (js) e desmosoma (d).  
19.300x.

Fig. 39 - Maior ampliação, num nível de corte semelhante ao cisto à direita, na fig. 38. Os apêndices laciniados (al), em número aproximado de 11 em cada espermatozóide, são mais curtos e o reticular (ar) apresenta um aspecto menos circular. O derivado mitocondrial (dm) mantém ainda seu aspecto reniforme, com destaque para o eixo cortical mediano elétron-denso (⊙). O axonema (ax) é visto da ponta para sua base. 46.600x.

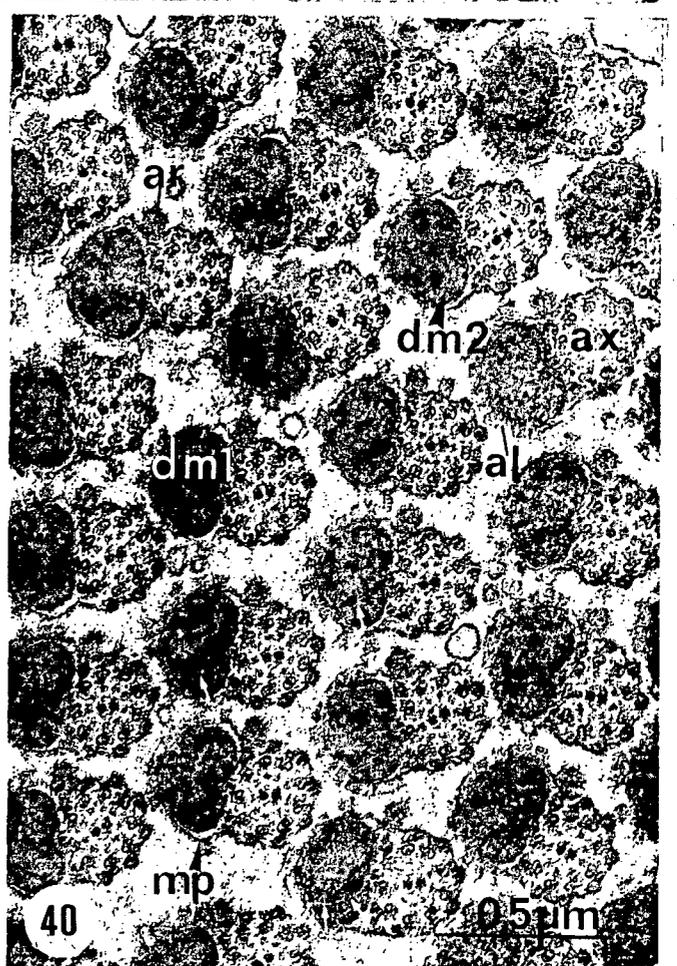
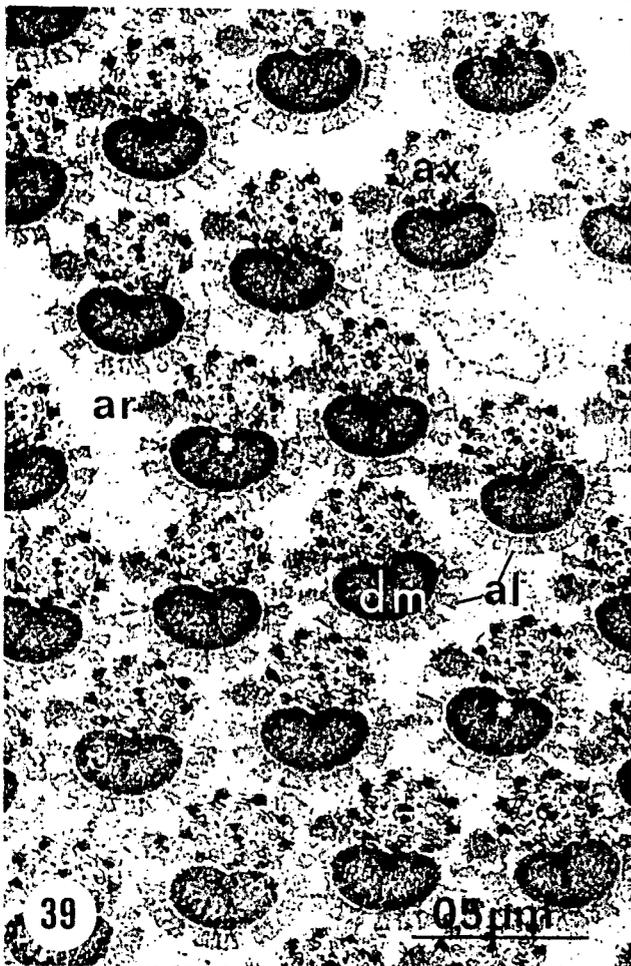
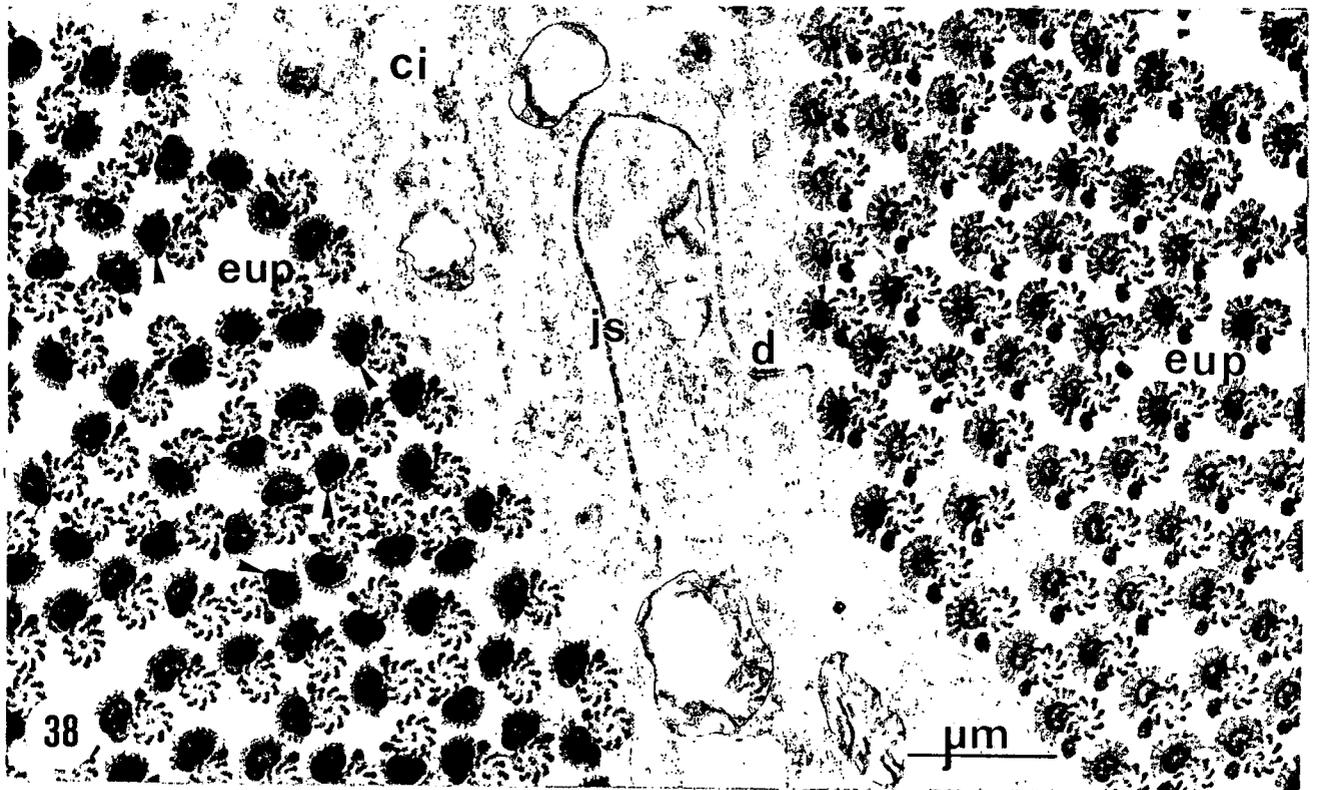
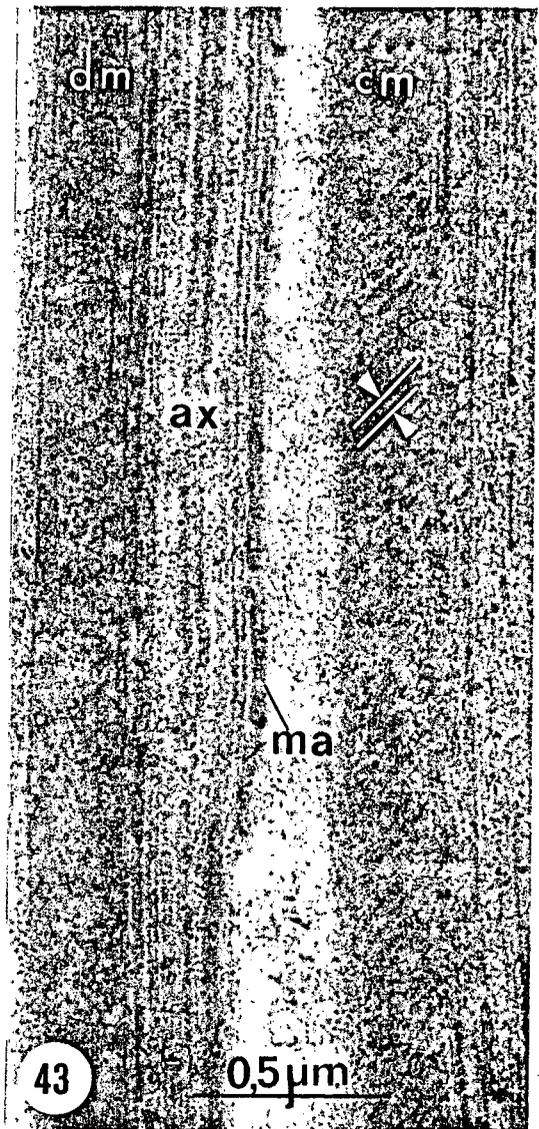
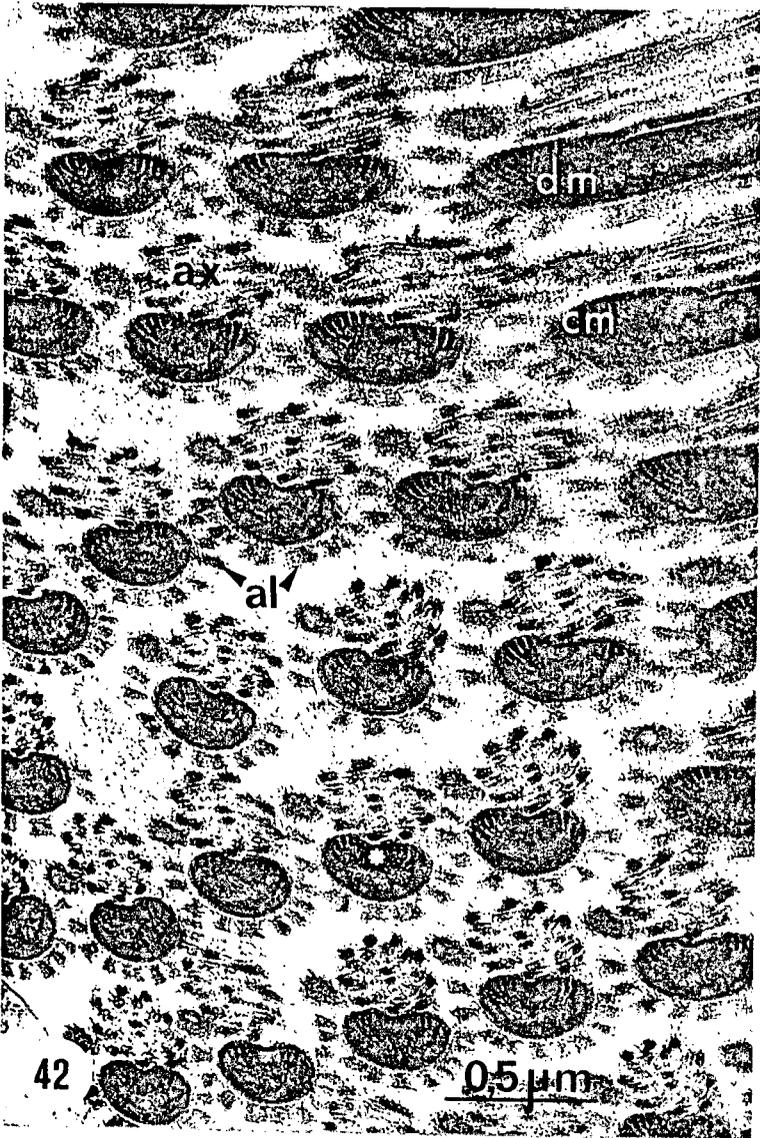
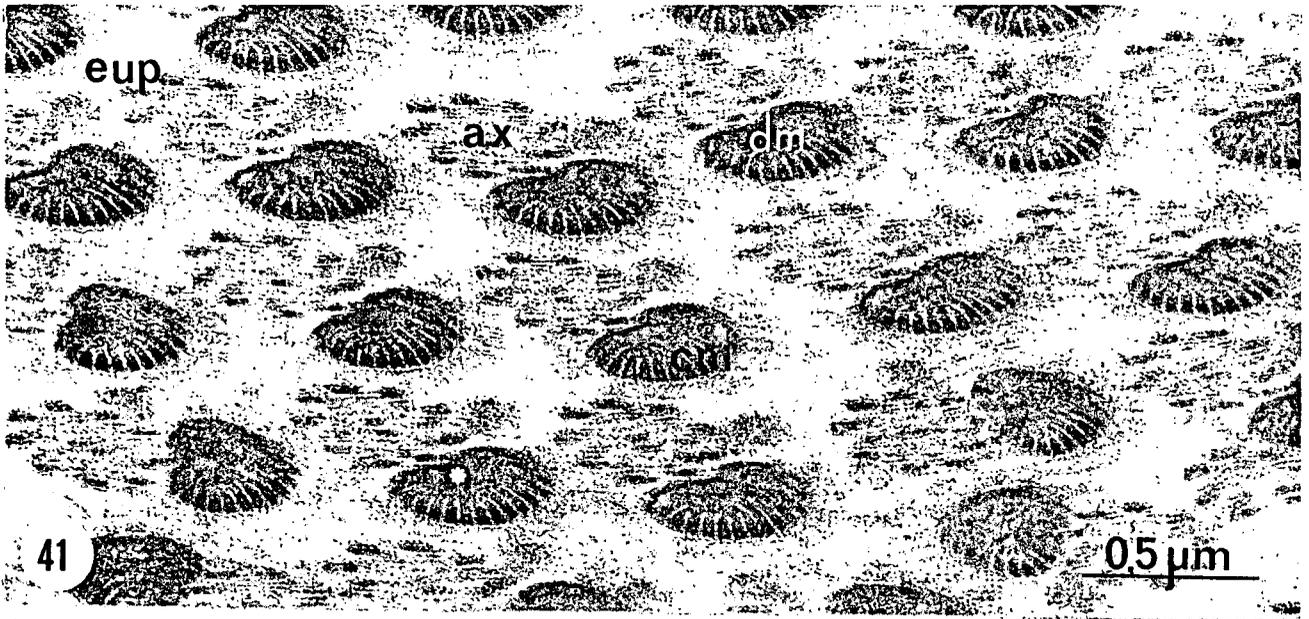


Fig. 43 - Secção longitudinal de dois espermatozoides eupi-  
renes, onde se evidencia a estrutura dos deriva-  
dos mitocondriais (dm). À esquerda, num corte mais  
profundo, percebe-se que o derivado é constitu-  
ído por uma camada cortical elétron-densa que en-  
volve uma matriz amorfa menos elétron-densa. À di-  
reita, num corte mais superficial, na camada cor-  
tical do derivado, observa-se uma estriação oblí-  
qua regular com um período de aproximadamente 450  
Å. As estrias claras, observadas também nas fig.  
41 e 42, assemelham-se a cristas mitocondriais.  
As estrias escuras correspondem a faixas longas e  
estreitas que se dispõem em forma de hélice na ca-  
mada cortical do derivado mitocondrial. Microtú-  
bulo acessório do axonema = ma. 53.200x.

FIGURAS 41 a 43 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES NO TESTÍCULO.

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 41 e 42 - Cortes oblíquos de espermatozóides eupirenes (eup), ao nível de flagelos, provavelmente na região mediana da porção principal, onde se destacam os derivados mitocondriais (dm) únicos acolados ao axonema (ax). Notam-se cristas modificadas (cm) na camada cortical, projetando-se um pouco em direção à camada medular dos derivados. Observa-se também que, em função do ângulo de corte, as cristas ora se evidenciam na face próxima aos apêndices laciniados (al), ora na próxima ao axonema (ax). Na região do eixo cortical (⊙) elétron-denso, não há cristas. Fig. 41 - 45.700x; Fig. 42 - 40.100x.



FIGURAS 44 a 46 - ESPERMATOZÓIDES EUIPIRENES NO TESTÍCULO.

Contrastação Negativa (Fosfotungstato de Potássio a 1%).

Fig. 44 a 46 - Nos espermatozóides eupirenes (eup), notam-se distintamente os dois derivados mitocondriais (dm1 e dm2) com diferentes diâmetros, estando o mais estreito mais próximo do axonema (ax). Observa-se, também, a organização helicoidal da camada cortical dos derivados, indicada pela estriação oblíqua regular, cujo período é aproximadamente igual a 450 Å. Às vezes, nota-se, por transparência, superposição de espiras, como mostram as fig. 44 e 45. Já na fig. 46, nota-se que dm1 apresenta sua camada cortical parcialmente desorganizada, evidenciando-se sua estrutura em hélice. Microtúbulos do filamento axial = mt. Destaca-se, nas fig. 45 e 46, um cordão elêtron-denso longitudinal (setas) nos derivados micondriais (dm1), correspondendo provavelmente ao eixo cortical e-lêtron-denso observado nos cortes transversais.

Fig. 44 - 40.000x; Fig. 45 - 51.000x; Fig. 46 - 25.800x.

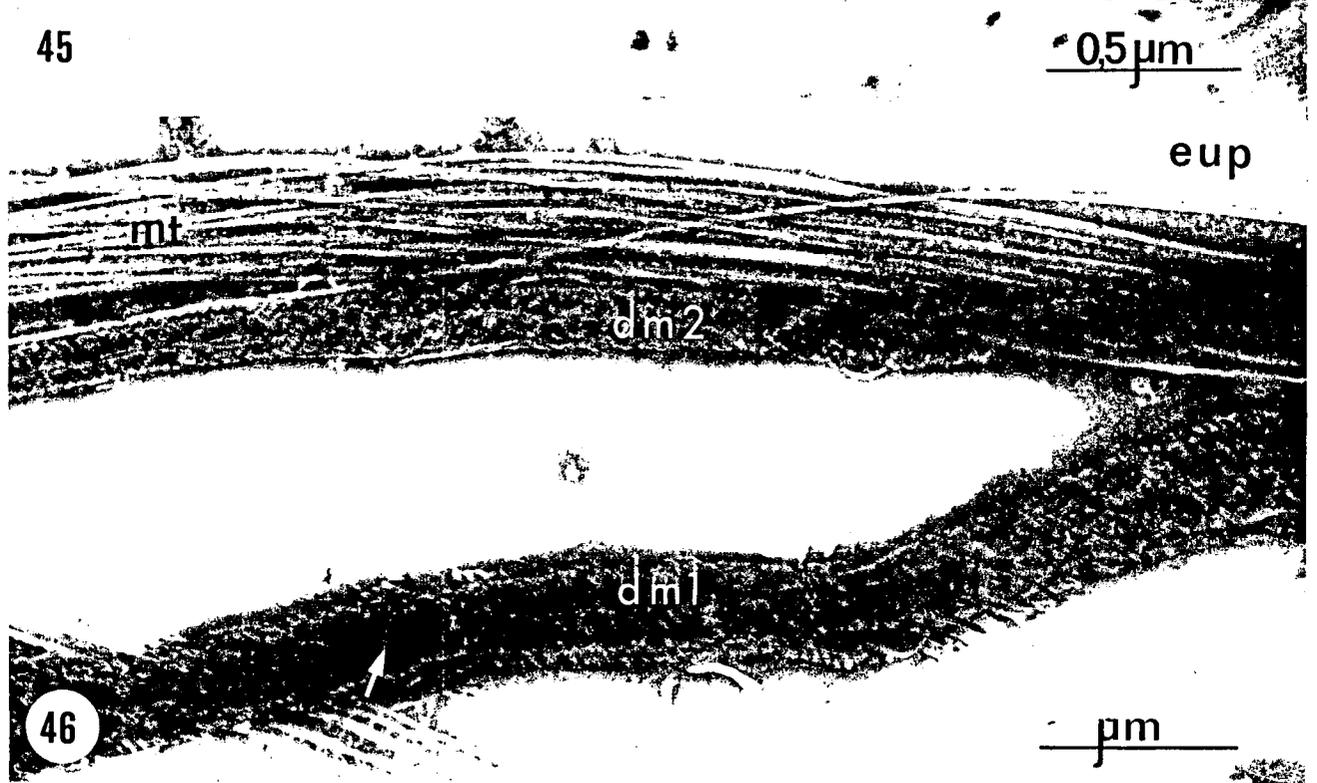
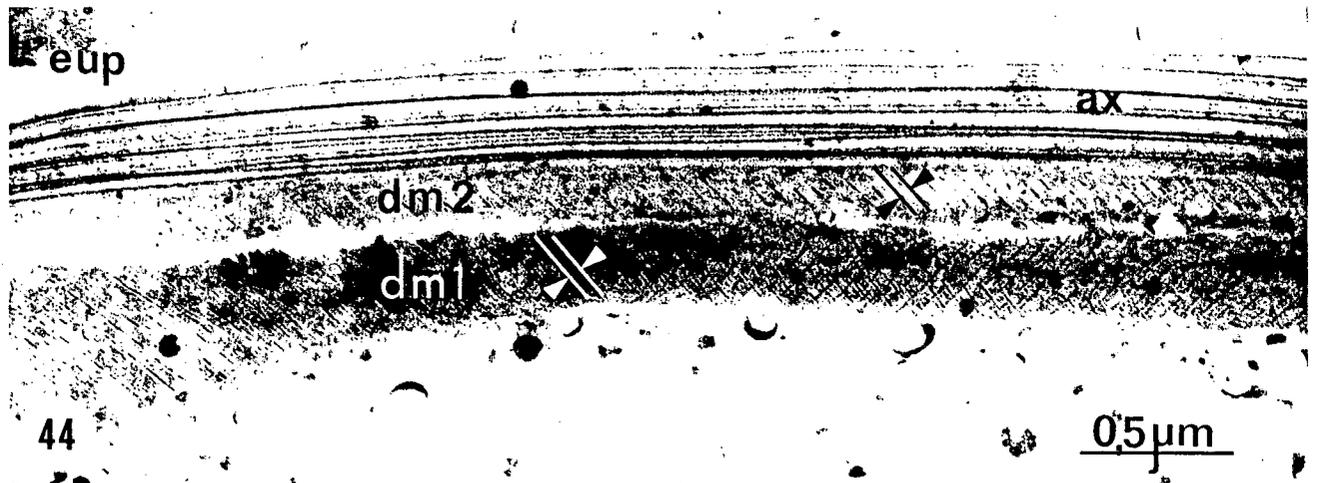
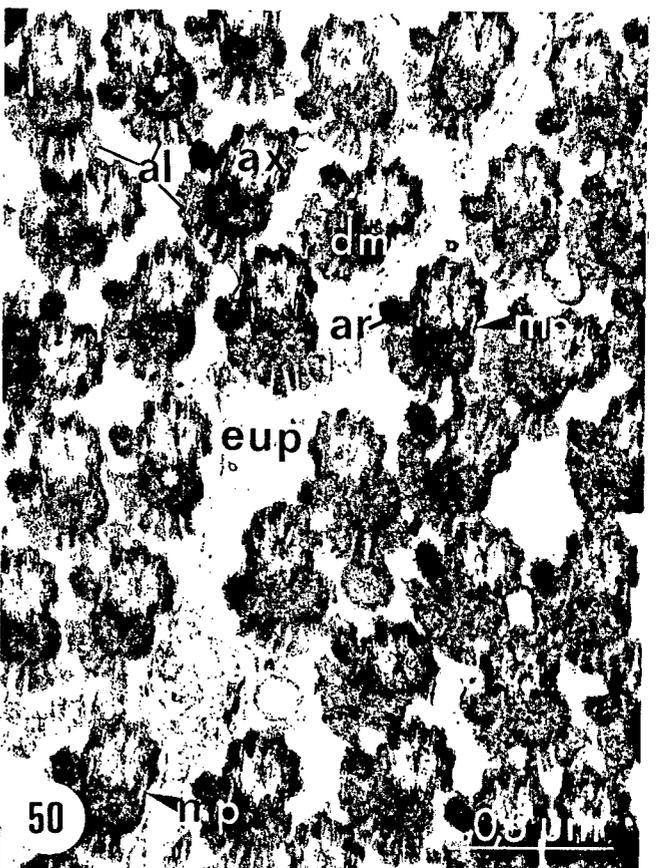
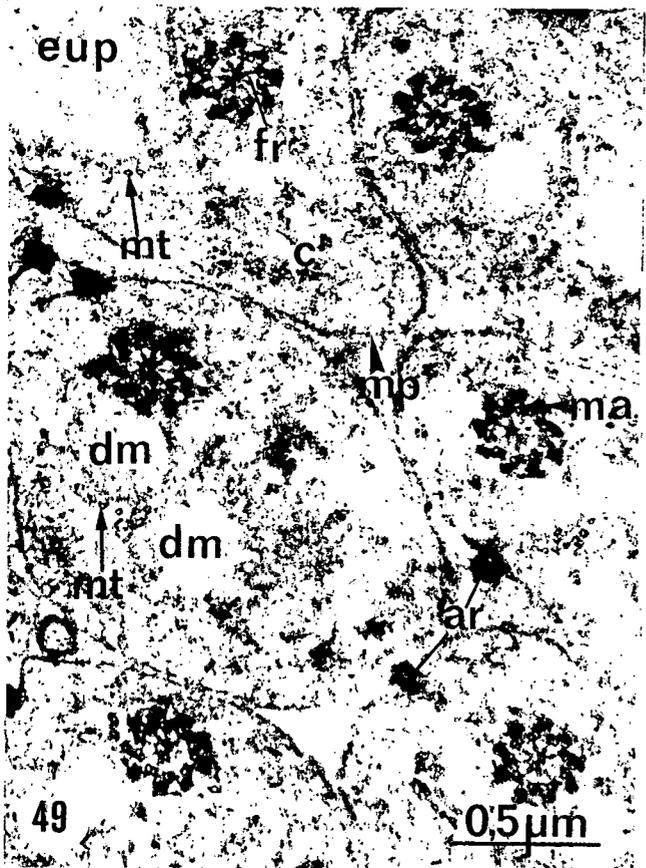
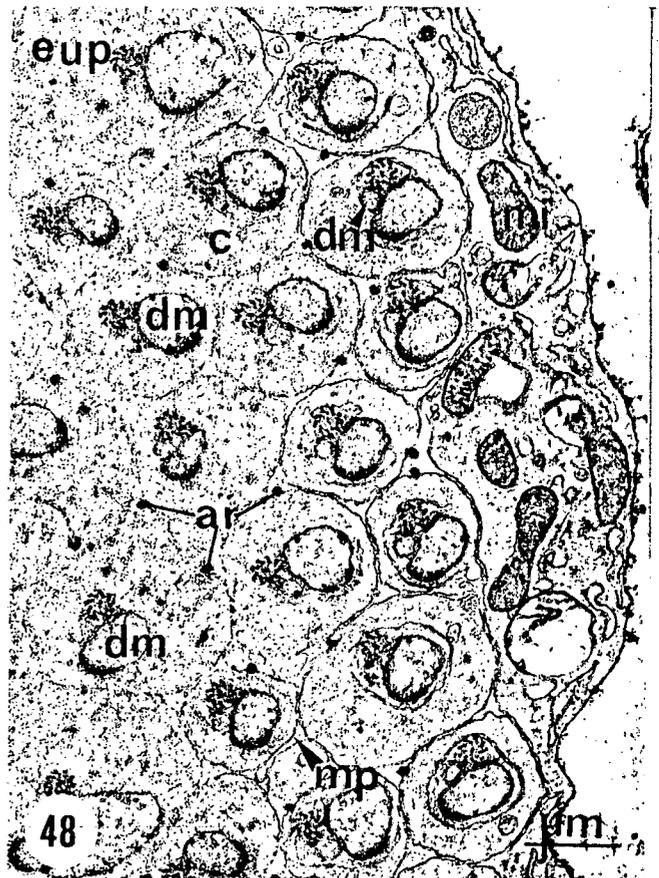
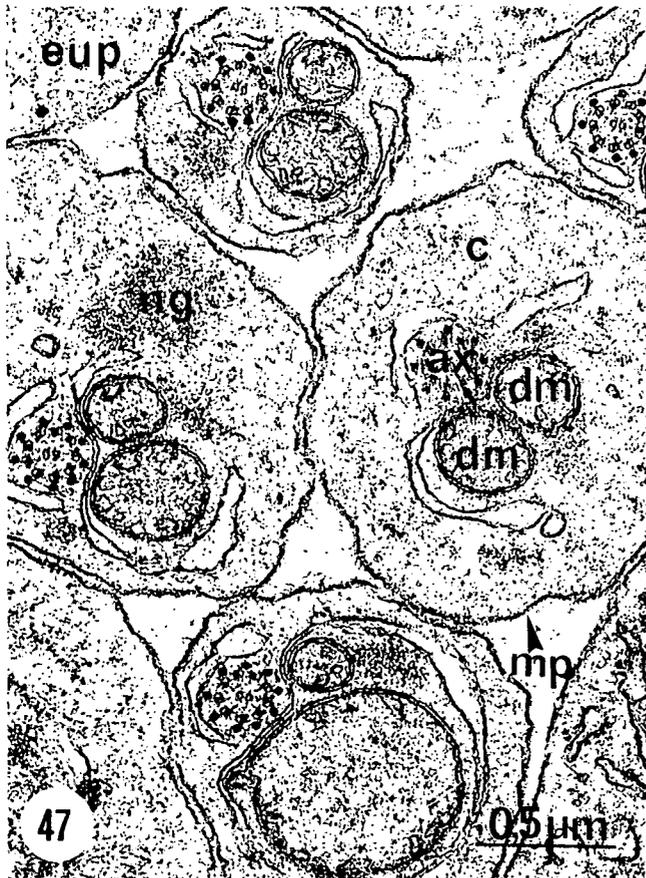


Fig. 50 - Espermatozoides eupirenes (eup), em corte oblíquo, tratados com vermelho de rutênio, nos quais evidenciam-se: os apêndices laciniados (al) e reticular (ar); o derivado mitocondrial (dm) com destaque para o eixo cortical elétron-denso (⊙); o axonema (ax) e a membrana plasmática (mp). 38.000x.

FIGURAS 47 a 50 - ESPERMÁTIDES E ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES  
NO TESTÍCULO.

Fig. 47 e 48 - Espermátides eupirenes (eup), seccionadas transversalmente, em dois diferentes estágios de maturação, observadas em testículos de imago jovens e encontradas próximas a feixes de espermatozóides maduros. Nota-se uma região mais elétron-densa, o "nuage" (ng), somente no citoplasma (c) de espermátides mais precoces, na fig. 47. Nas espermátides da fig. 48, já se observa a presença de corpúsculos elétron-densos, os apêndices reticulares (ar), acolados às membranas plasmáticas (mp). Destacam-se, também, os axonemas (ax), os derivados mitocondriais (dm) e mitocôndrias (mi) da célula cística. Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ôsmio 2%, seguido de ácido tânico 1%. Fig. 47 - 36.400x; Fig. 48 - 12.300x.

Fig. 49 - Espermátides eupirenes (eup) tratadas com vermelho de rutênio, nas quais evidenciam-se, em corte transversal: no axonema, os microtúbulos acessórios (ma), as fibras radiais (fr) elétron-densas e os microtúbulos centrais; os apêndices reticulares (ar) elétron-densos, acolados à membrana plasmática (mp); e microtúbulos (mt) ao redor dos derivados mitocondriais (dm) no citoplasma (c). 43.400x.

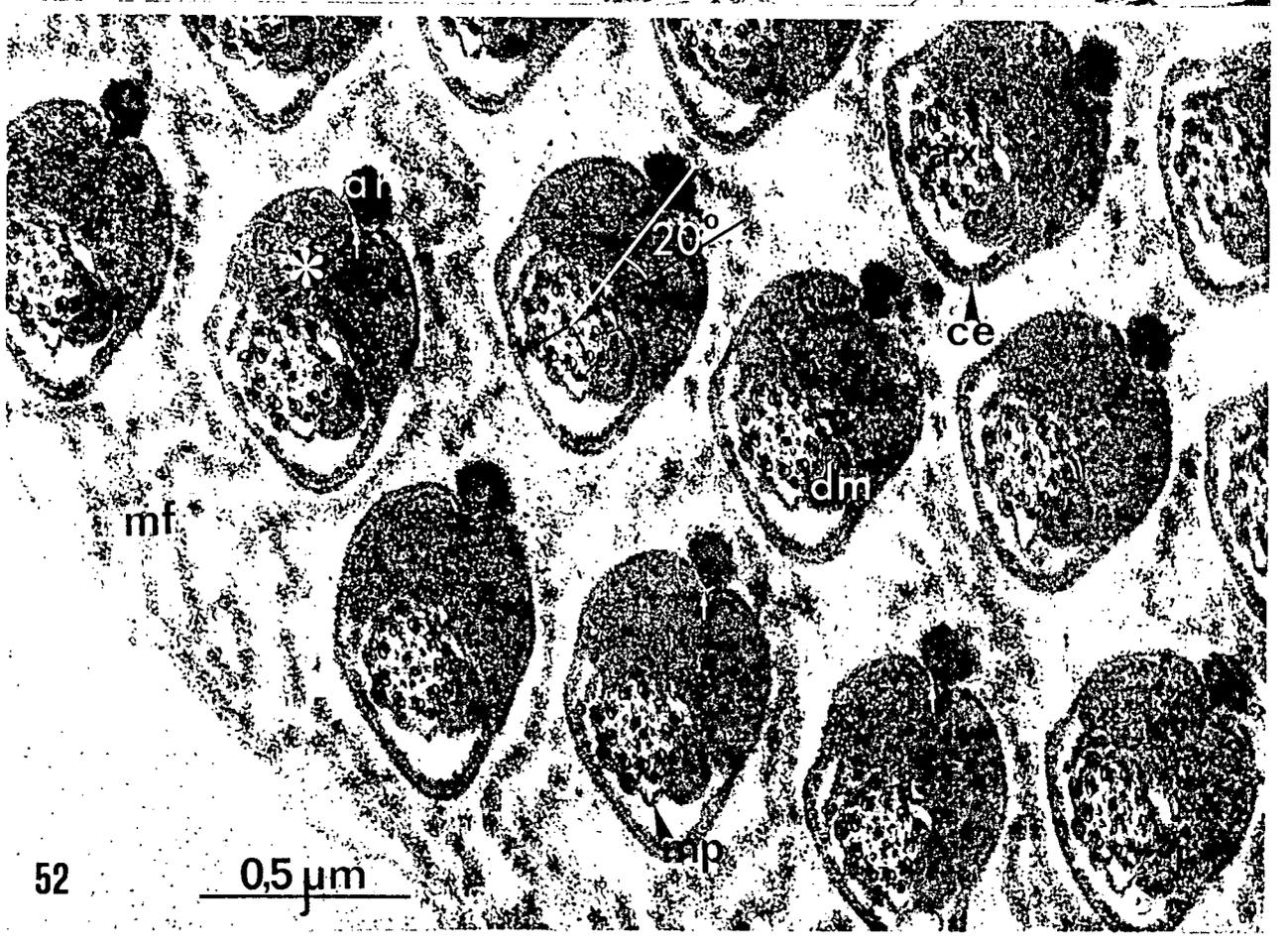
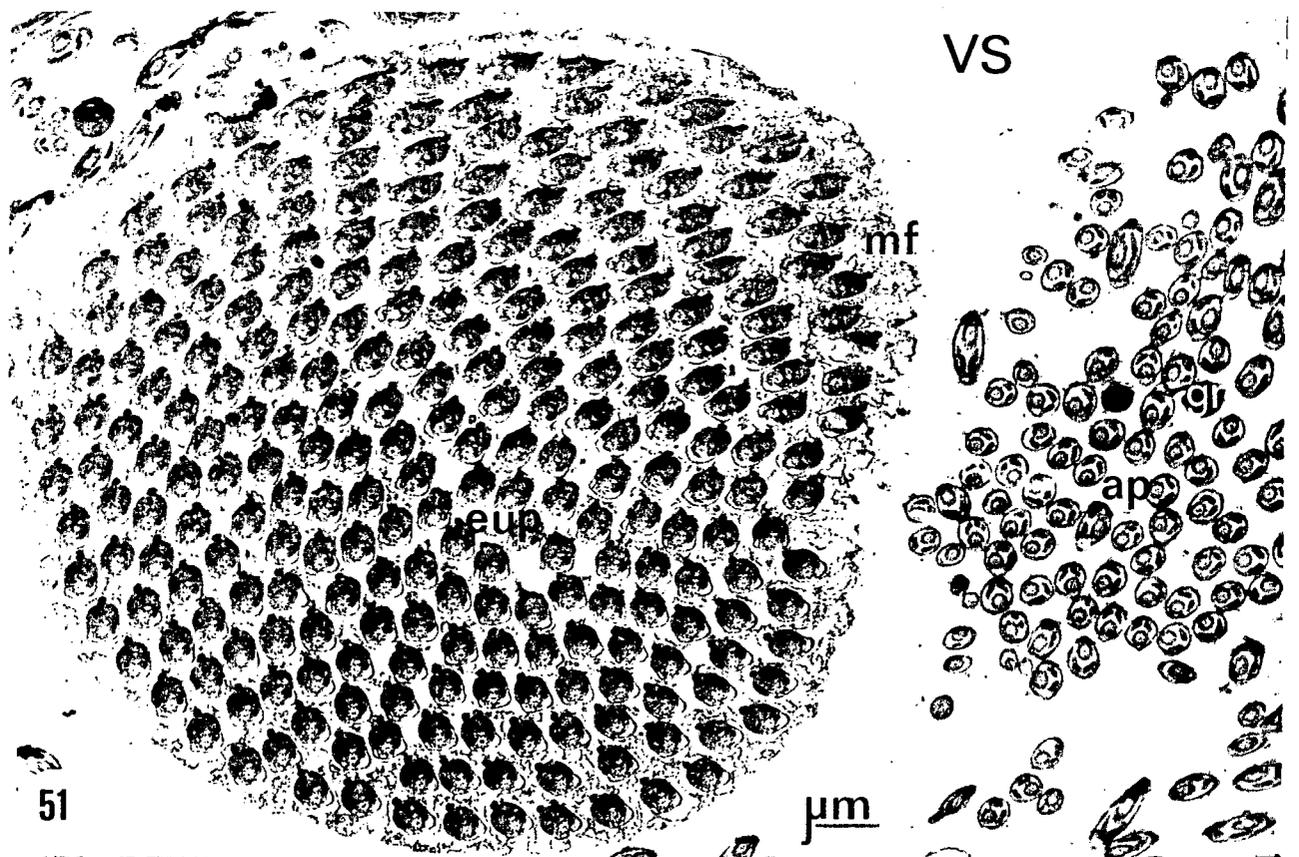


FIGURAS 51 e 52 - ESPERMATOZÓIDES EUPIRENES E APIRENES NA VE  
SÍCULA SEMINAL (VS).

Material fixado em glutaraldeído 3%, tetróxido de ósmio 1% e acetato de uranil 2%.

Fig. 51 - Feixe de espermatozóides eupirenes (eup), cortados transversalmente ao nível dos flagelos e envolvidos por material denso de aspecto filamentososo (mf). Próximo ao feixe eupirene, encontram-se dispersos espermatozóides apirenes (ap) e alguns grânulos elétron-densos (gr) intercalados. 8.200x.

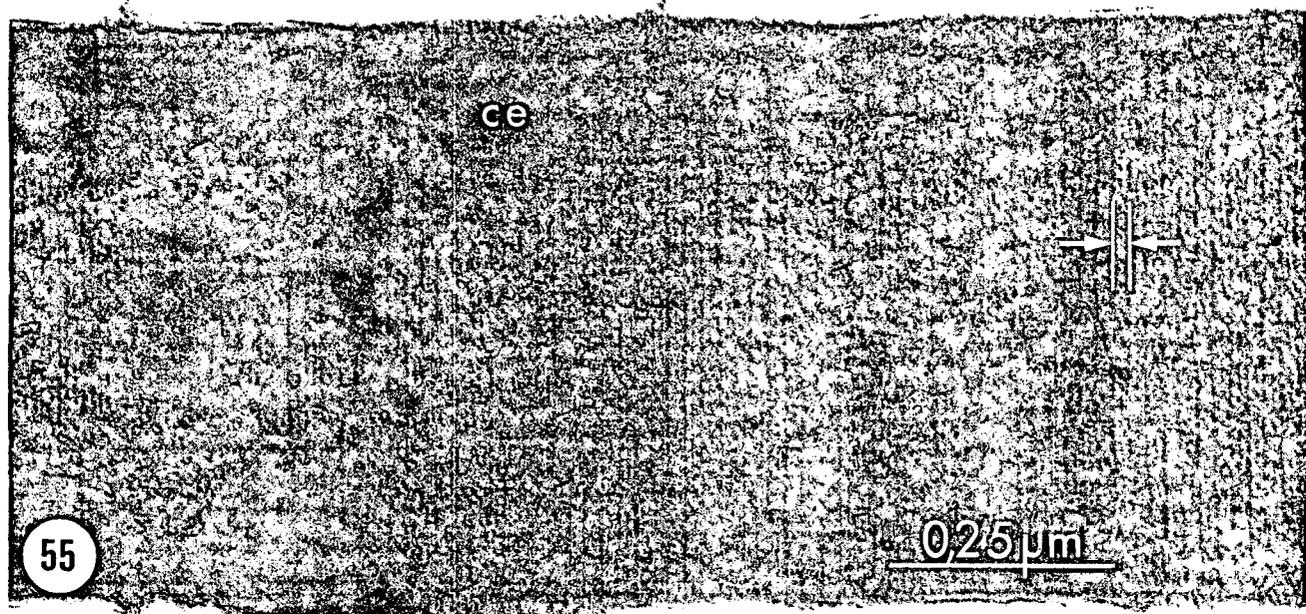
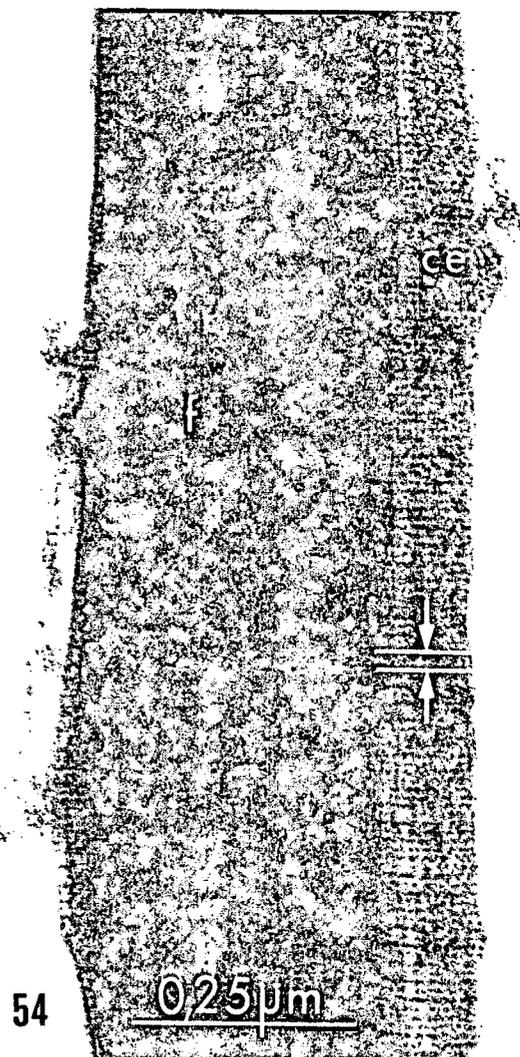
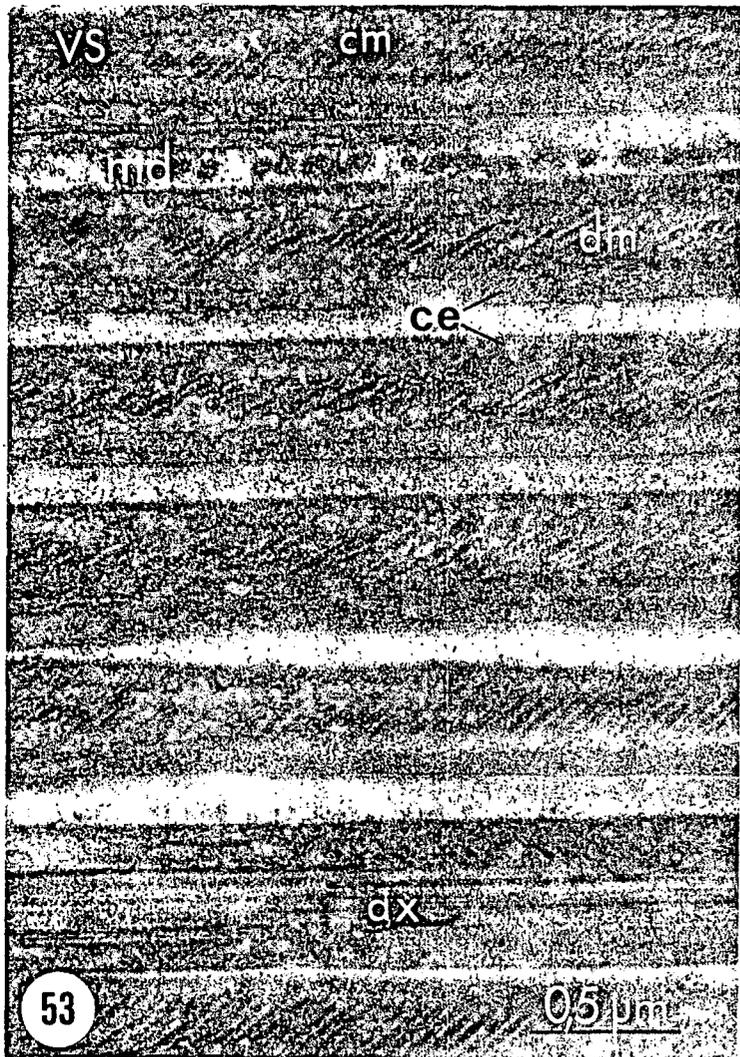
Fig. 52 - Destaque ampliado de uma região do feixe da fig. 51, mostrando detalhes: do material filamentososo de aspecto globular que envolve o feixe; da estrutura do flagelo, cortado num nível anterior da porção principal; e das camadas envoltórias-a matriz amorfa elétron-densa () e a capa externa (ce). Presença de apêndices reticulares (ar), localizados em depressões (setas brancas) das capas, num ângulo (linha branca) de aproximadamente 20° em relação à linha preta que passa pela dupla periferia de microtúbulos nº 1. Ausência de apêndices laciniados. Derivado mitocondrial (dm) único. 54.900x.



FIGURAS 53 a 55 - ESPERMATOZÓIDES NA VESÍCULA SEMINAL (VS).

Fig. 53 - Secção longitudinal de flagelos de espermatozoides eupirenes (eup), os quais mostram capas externas (ce), axonema (ax) e estriação oblíqua dos derivados mitocondriais (dm), correspondente à disposição helicoidal das cristas modificadas (cm). Nota-se, também, material elétron-denso (md) entre espermatozoides. Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%. 39.000x.

Fig. 54 e 55 - Aspecto da capa externa (ce) que envolve o flagelo (f) de um espermatozoide, evidenciando-se sua estriação regular de período igual a aproximadamente  $180 \text{ \AA}$ . A fig. 55 mostra uma capa isolada. Contrastação negativa (Acetato de uranil a 0,5%). 117.000x.

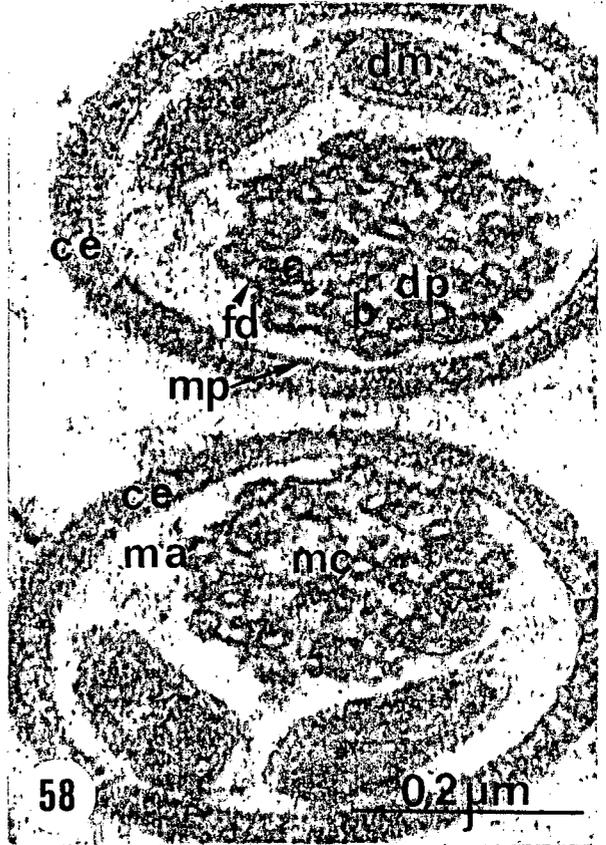
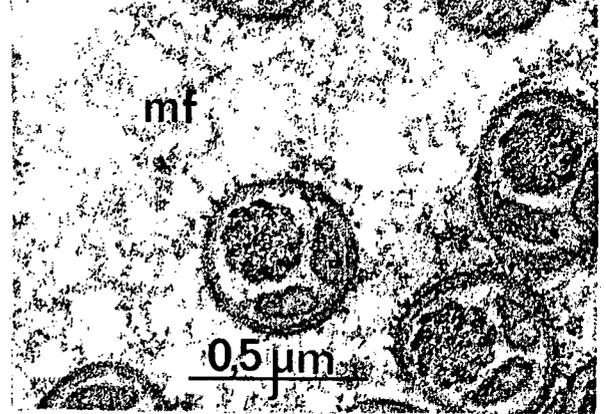
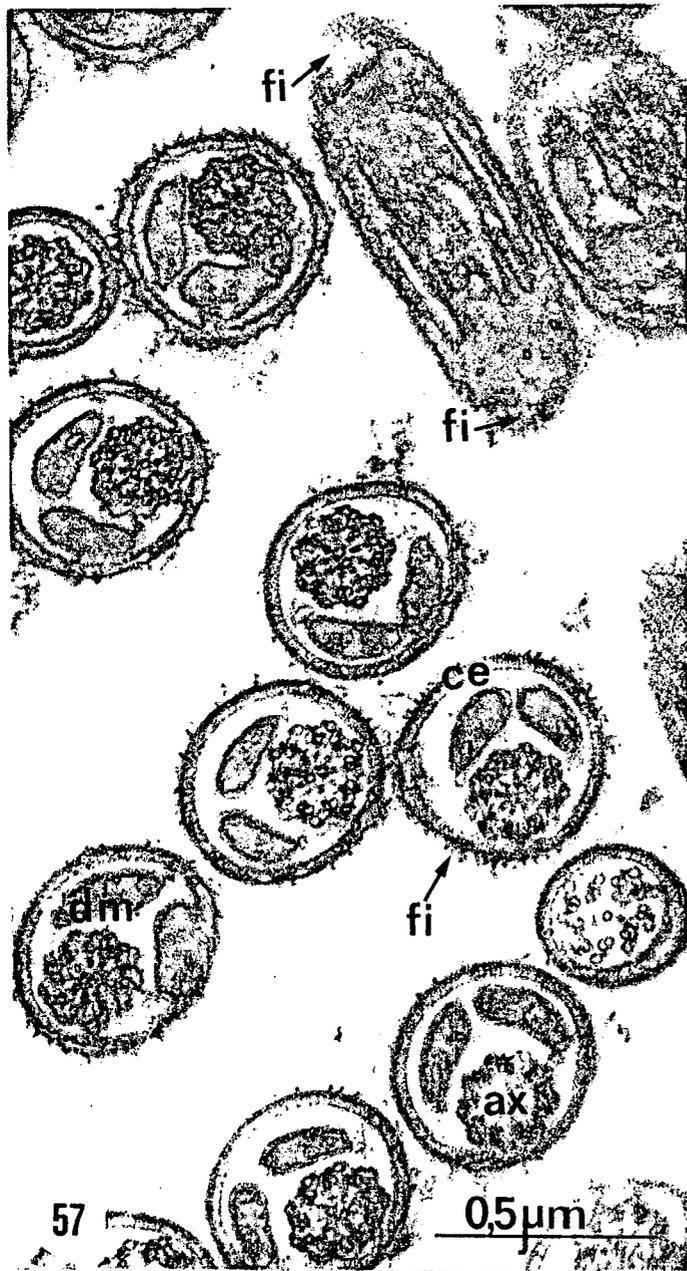
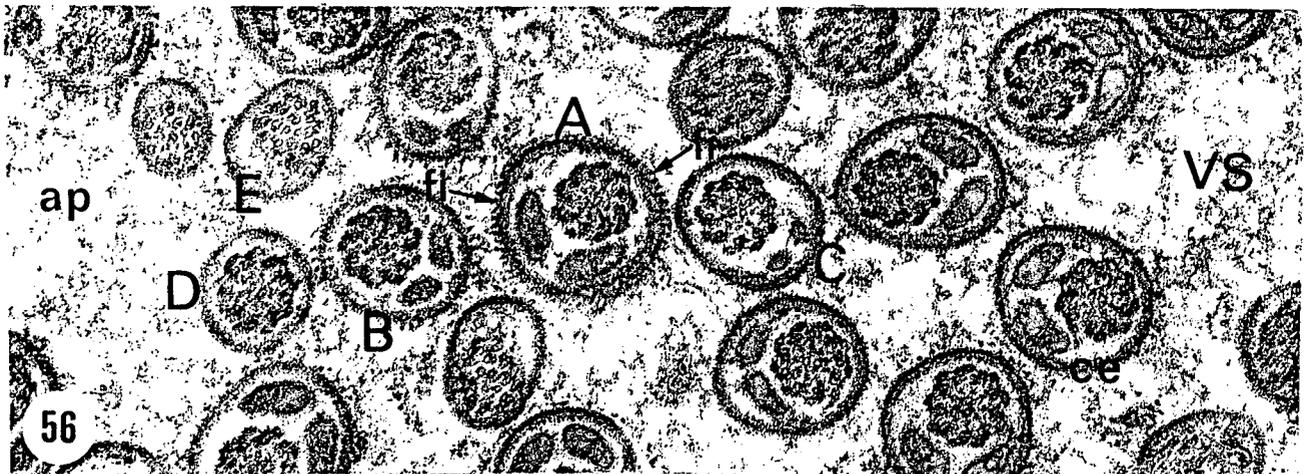


FIGURAS 56 a 58 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NA VESÍCULA SEMI-NAL (VS).

Fig. 56 - Cortes transversais de flagelos de espermatozóides apirenes (ap), em diferentes níveis (A, B, C, D e E). Observam-se pequenas expansões filamentosas (fi) que recobrem as capas (ce) e material de aspecto filamentoso (mf) disperso entre os espermatozóides. Glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%. 46.700x.

Fig. 57 - Espermatozóides apirenes (ap), em secção transversal e oblíqua, mostrando detalhes das capas externas (ce) de natureza estriada e com expansões filamentosas (fi) que se dispõem paralelamente ao longo dos flagelos. Material fixado em glutaraldeído 3%, tetróxido de ósmio 1% e acetato de uranil 2%. 57.500x.

Fig. 58 - Ampliação maior de dois espermatozóides apirenes, em secção transversal nos quais observam-se: a capa externa (ce) de natureza estriada; a membrana plasmática (mp) acolada à capa; os 2 derivados mitocondriais (dm) com regiões medulares elétrondensas (\*); e no axonema, os microtúbulos centrais (mc) e acessórios (ma) elétrontransparentes, as duplas periféricas (dp) de microtúbulos com suas subunidades "a" e "b" de diferentes elétrondensidades e as fibras densas (fd) entre os microtúbulos acessórios. Material fixado em glutaraldeído 3%, tetróxido de ósmio 1% e acetato de uranil 2%. 150.300x.



FIGURAS 59 a 64 - ESPERMATOZÓIDES APIRENES NA VESÍCULA SEMI  
NAL (VS).

Fig. 59 a 64 - Espermatozoides apirenes, seccionados trans-  
versal e obliquamente em diferentes níveis  
(A, B, C, D, E, F, G, e H), desde a porção ce-  
fálica (A) até a terminal (H) do flagelo, on-  
de não são mais observados microtúbulos. No-  
ta-se, na superfície externa de espermatozói-  
des das fig. 59, 61 e 64, uma coroa de curtos  
filamentos (fi) - que parece em dupla camada  
(►) na porção cefálica - acolados à parede  
externa (ce), na qual está aderida a membra-  
na plasmática (mp). Na fig. 60, destacam-se  
2 volumosos grânulos (gr) de material elétron-  
denso e um número variado de grânulos meno-  
res. Material finamente granular ao redor  
dos espermatozoides nas fig. 59, 60, 61 e 64.  
Fig. 59 e 60 - Material fixado em glutaralde-  
ído 5% e tetróxido de ósmio 1%.  
Fig. 61 a 64 - Material fixado em glutaralde-  
ído 2%, tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico  
1%. Fig. 59 e 60 - 61.000x; Fig. 61 - 70.000x.  
Fig. 62 - 136.000x; Fig. 63 - 83.000x; Fig. 64  
117.000x.

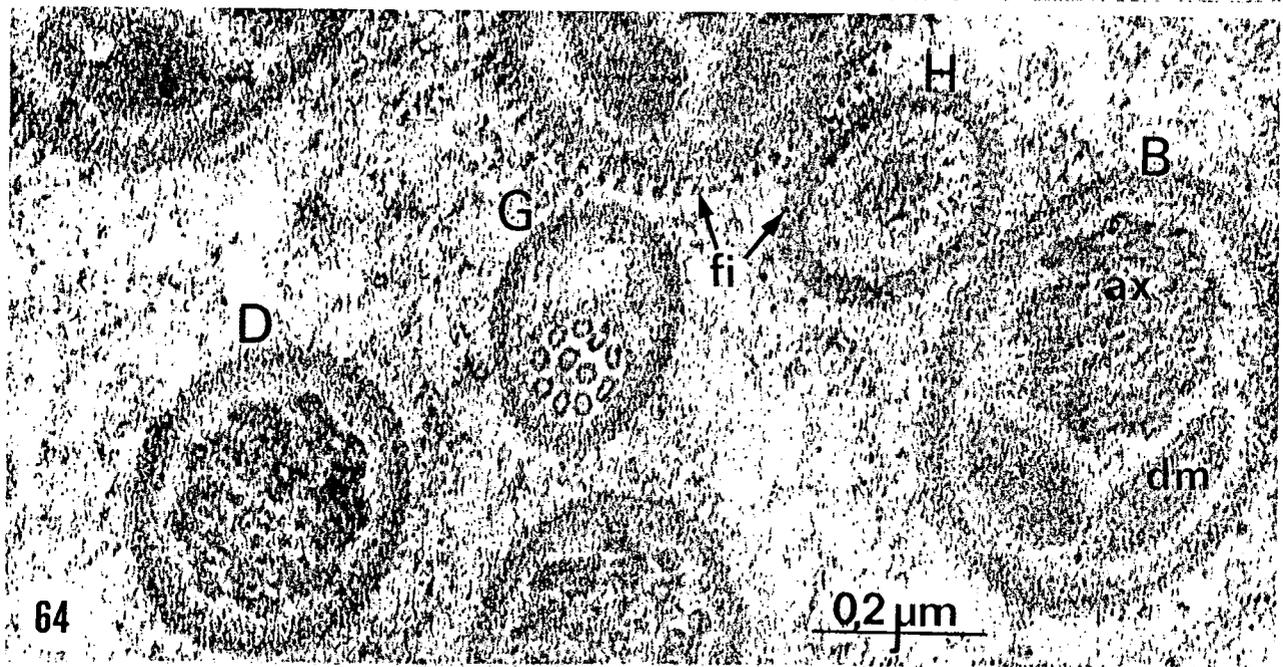
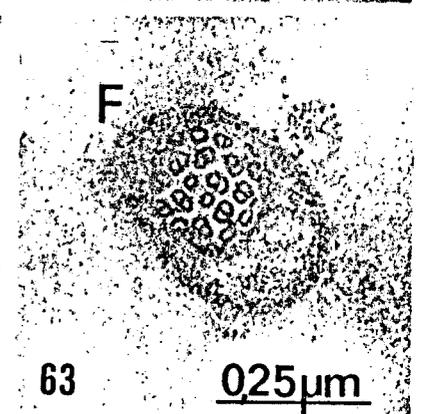
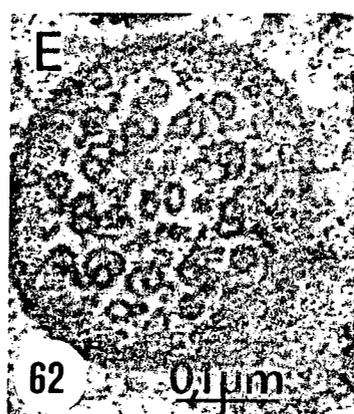
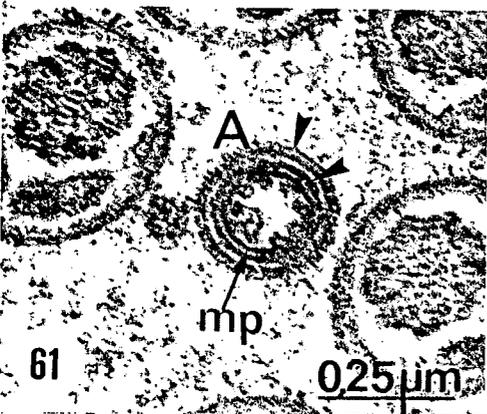
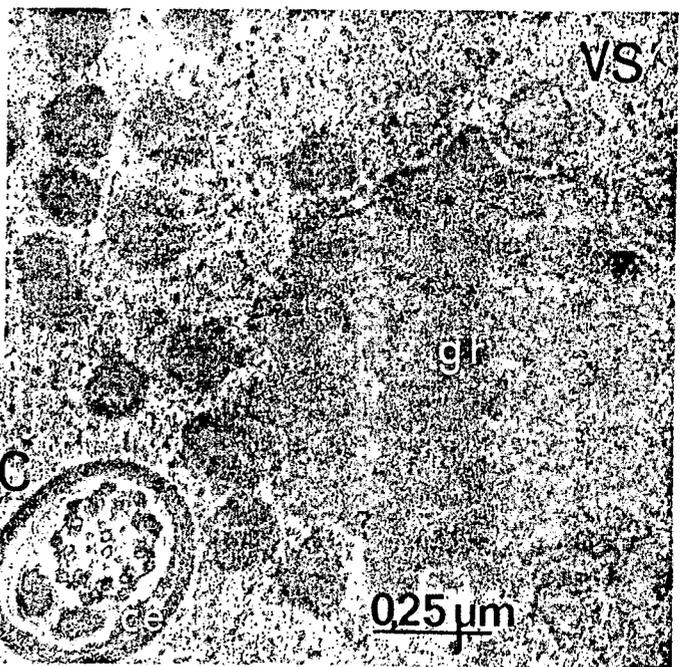
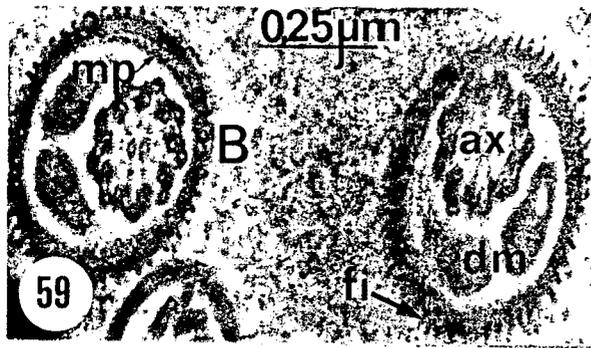


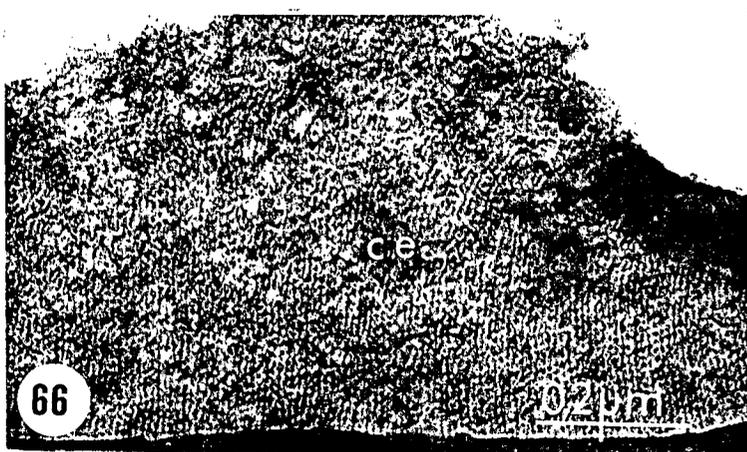
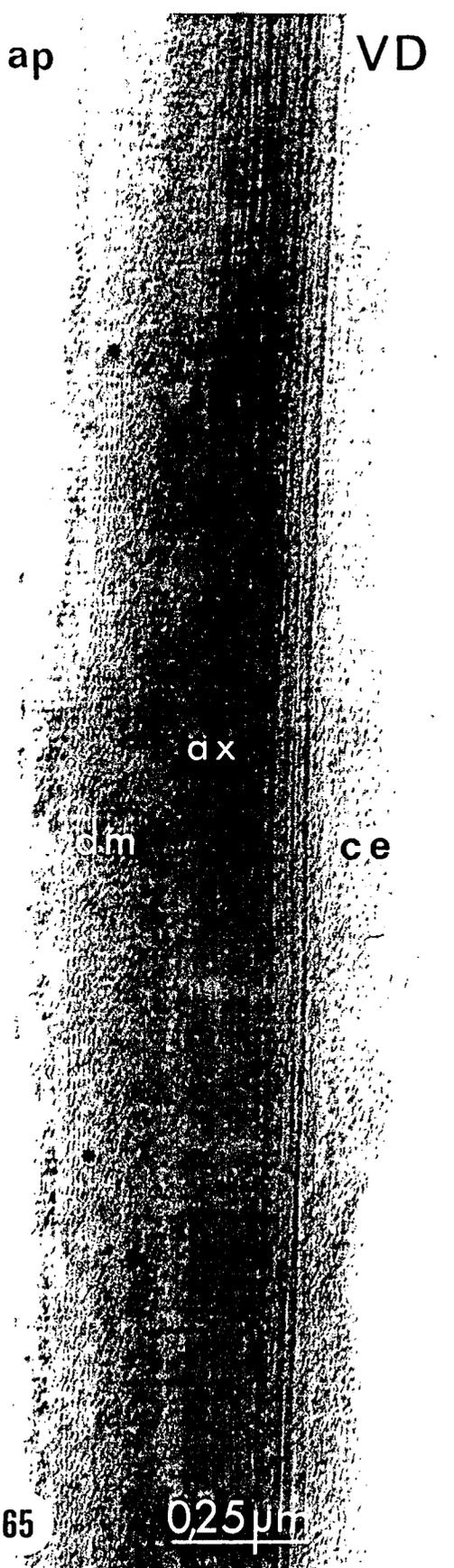
FIGURA 65 - ESPERMATOZÓIDE NO VASO DEFERENTE (VD).

Fig. 65 - Flagelo de espermatozóide apirene (ap), observado no vaso deferente (VD), no qual se destacam: o axonema (ax), um dos derivados mitocondriais (dm) com seu eixo medular de natureza paracristalina ( \* ) e a capa (ce) que envolve todo o flagelo. Contrastação negativa (Fosfotungstato de Potássio a 1%) 79.600x.

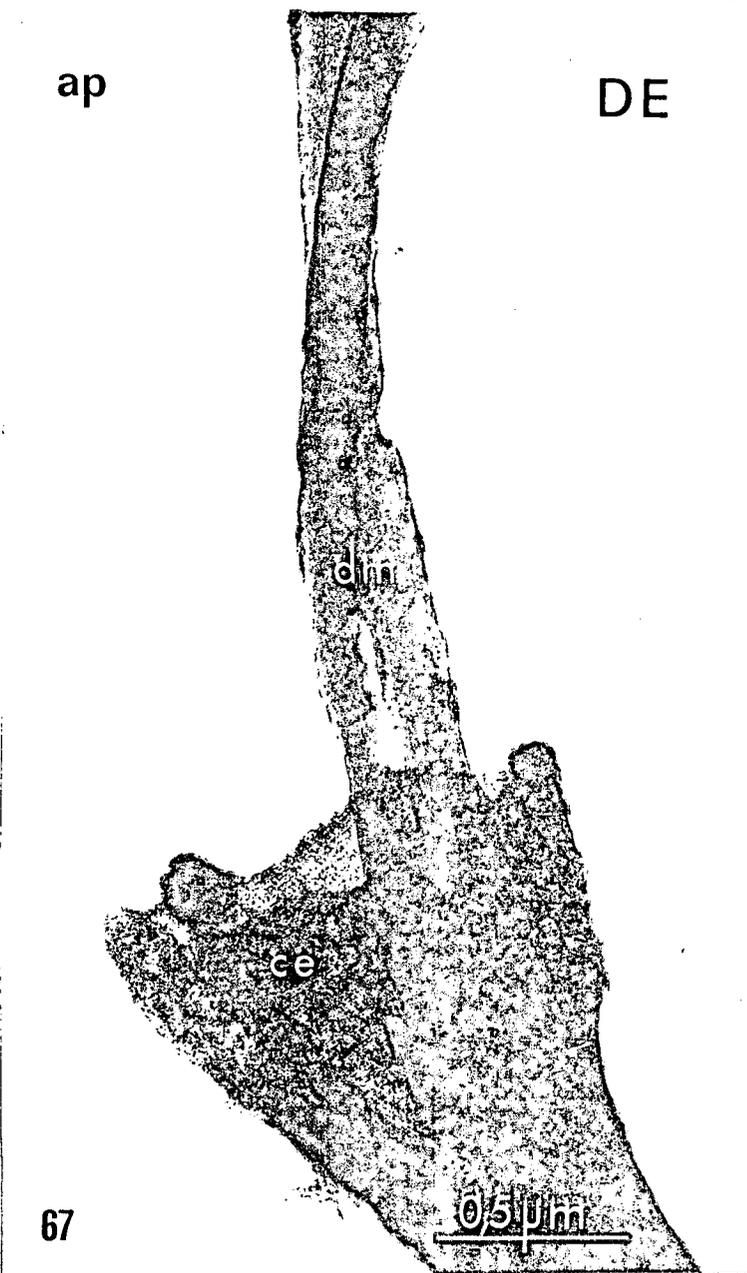
Fig. 66 e 67 - ESPERMATOZÓIDES NO DUCTO EJACULADOR (DE) DUPLIO.

Fig. 66 e 67 - Detalhe da estrutura estriada regular da capa (ce) que envolve, individualmente, os flagelos de espermatozóides apirenes (ap). Na fig. 67, destacam-se também dois derivados mitocondriais (dm). Contrastação negativa (Acetato de uranil 0,5%). Fig. 66 - 101.000x; Fig. 67 - 51.300x.

ap VD



ap DE

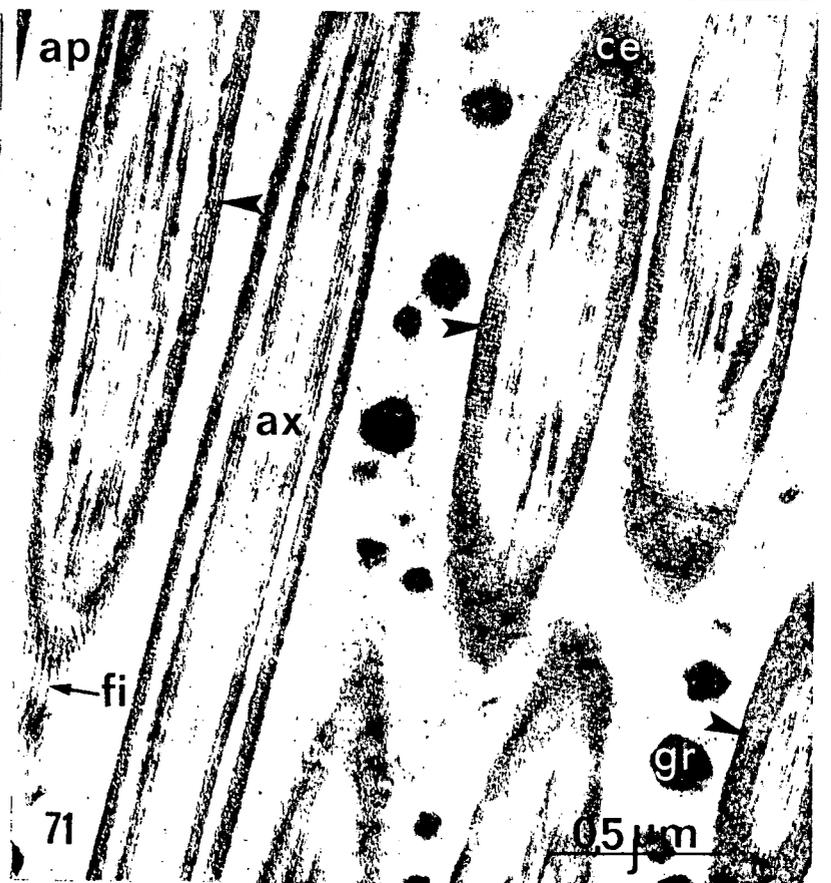
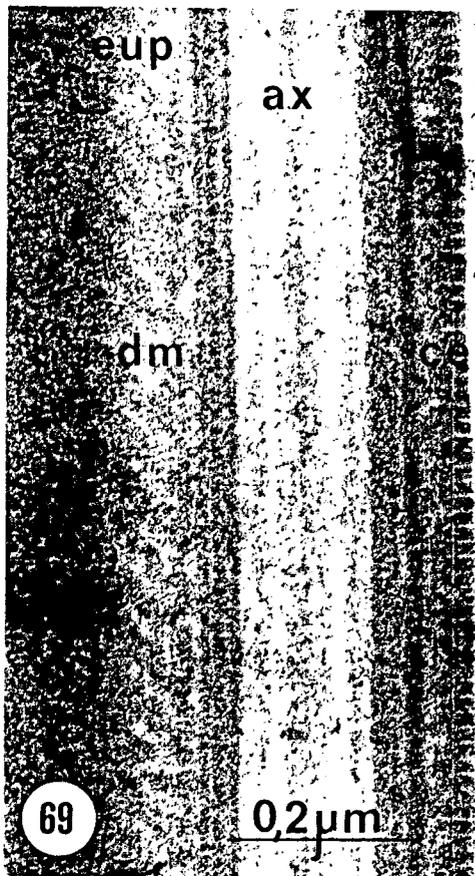
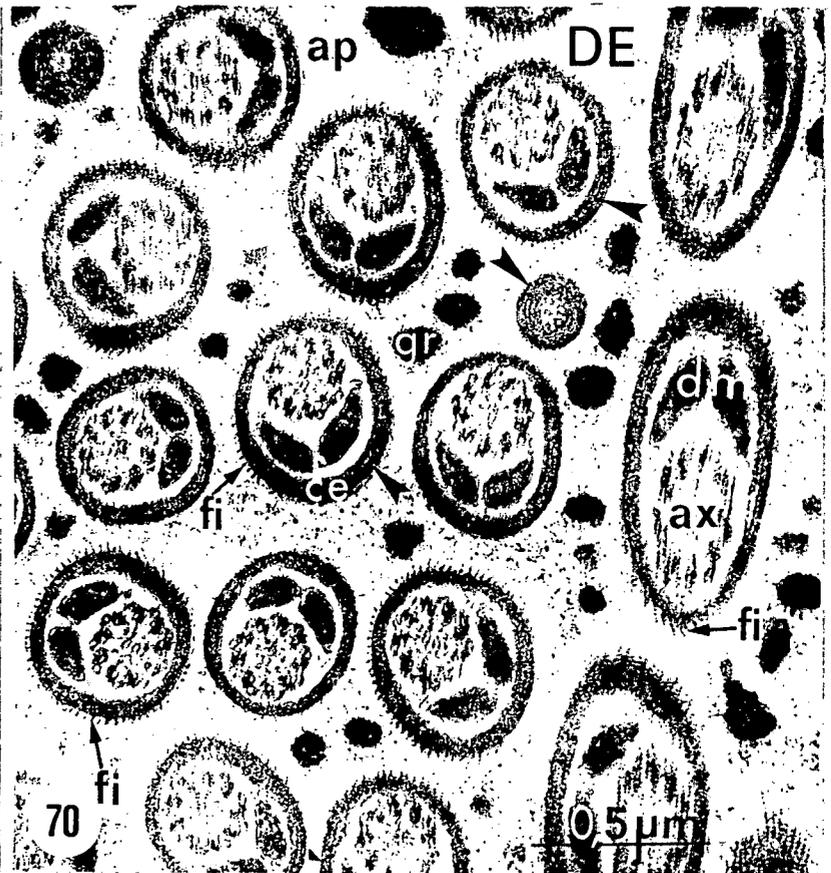
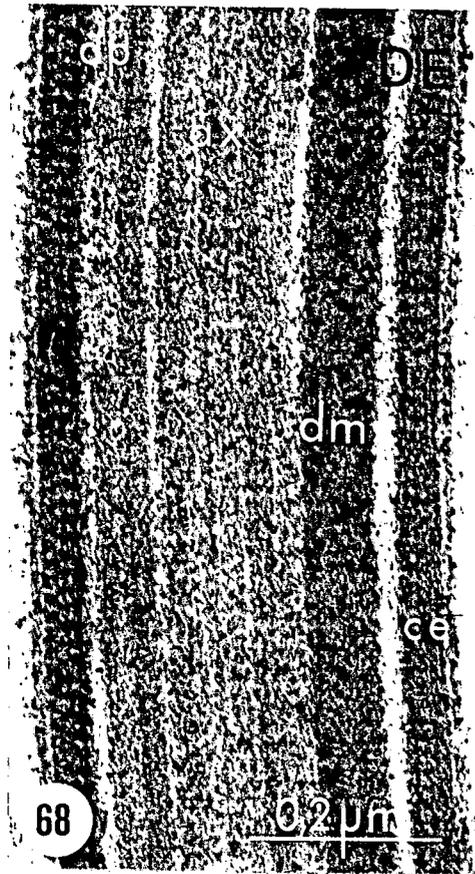


FIGURAS 68 a 71 - ESPERMATOZÓIDES NO DUCTO EJACULADOR (DE) DUPLO.

Fig. 68 e 69 - Flagelos de espermatozóides apirene e eupirene respectivamente, em corte longitudinal, mostrando detalhes da estrutura diferenciada das capas externas (ce). Notam-se, também, os axonemas (ax) e os derivados mitocondriais (dm). Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2% e ácido de tânico 1%. 122.800x.

Fig. 70 - Secção transversal e oblíqua de flagelos de espermatozóides apirenes (ap), nos quais destacam-se os filamentos (fi) ao redor das capas (ce) formadas de anéis concêntricos, bem distintos em certos níveis de corte (▶). Presença de grânulos de secreção (gr) elétron-densos. Derivados mitocondriais (dm) e axonema (ax) em destaque. Material fixado em glutaraldeído 6%, tetróxido de ósmio 1% e acetato de uranil 2%. 46.000x.

Fig. 71 - Secção longitudinal e oblíqua de flagelos de espermatozóides apirenes (ap), nos quais destacam-se: os filamentos (fi) que se dispõem ao longo dos flagelos e a capa externa (ce) formada de várias camadas (▶) estriadas. Presença de grânulos de secreção (gr). Glutaraldeído 6%, tetróxido de ósmio 1% e acetato de uranil 2%. 46.000x.



FIGURAS 72 e 73 - ESPERMATOZÓIDES NO DUCTO EJACULADOR (DE) DUPLO.

FIGURAS 72 a 74 - Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 72 - Visão parcial de um feixe de espermatozoides eupirenes (eup), em secção transversal ao nível de porções cefálicas. Presença de material elétron-denso (md) envolvendo completamente os espermatozoides, que se dispõem, em geral, numa determinada orientação.  
8.500x.

Fig. 73 - Visão ampliada da fig. 72. Destaque para: o apêndice reticular (ar) acolado à capa externa (ce) numa pequena depressão; a matriz amorfa elétron-densa (⊗) que ocupa o maior volume; o núcleo (n) com formato de meia-lua, localizado no lado oposto ao apêndice reticular; e o material elétron-denso (md), em grumos, ao redor dos espermatozoides. 25.500x.

Fig. 74 - Aspecto parcial de células epiteliais secretoras da parede do ducto ejaculador duplo, em corte longitudinal. Observam-se, no citoplasma, complexos de Golgi (G), retículo endoplasmático granular (REG) e vários grânulos de secreção (gr), acumulados próximos à superfície livre celular, a qual apresenta microvilosidades (mv). Nota-se a presença de junções celulares (jc). 15.200x.

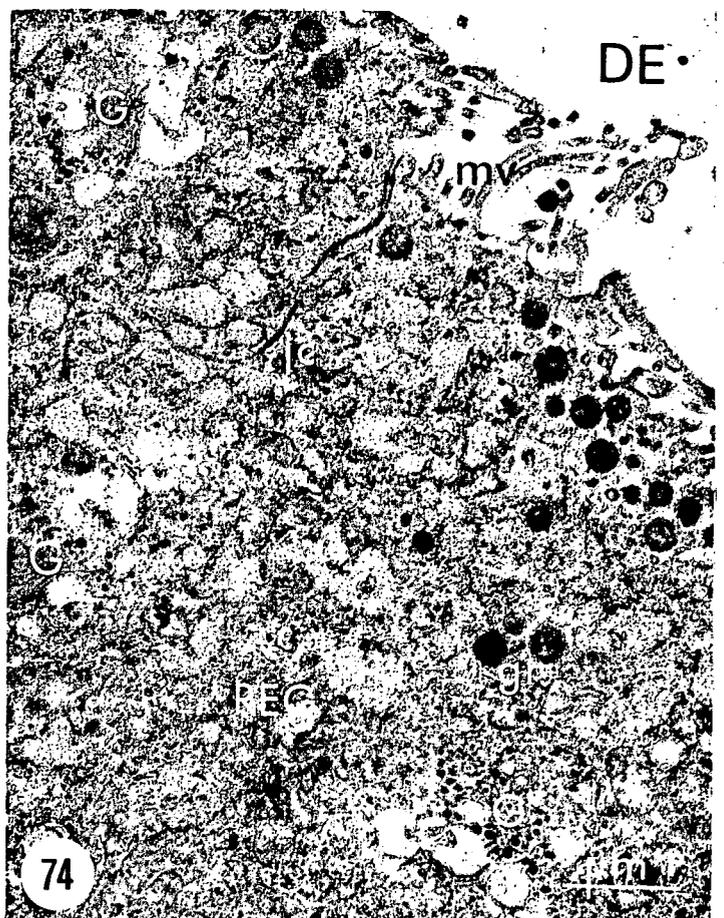
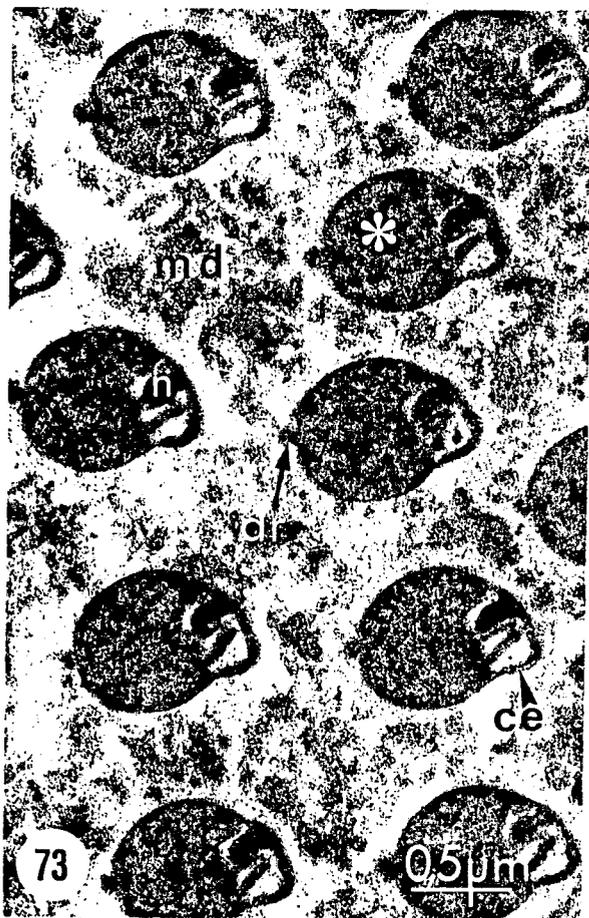
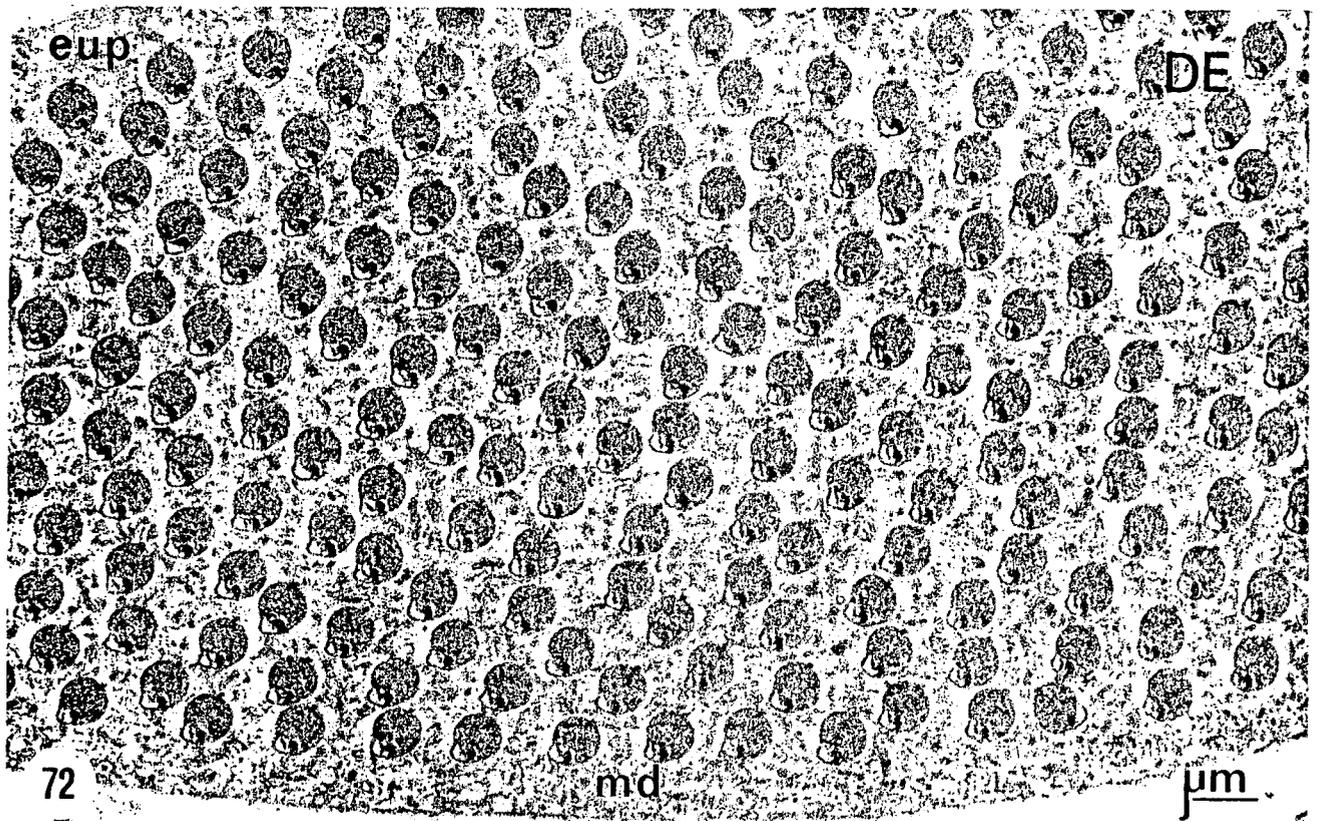


Fig. 77 - Espermatozoides eupirenes (eup) e apirenes (ap), em corte transversal ao nível de flagelos. Nos eupirenes, seccionados em um nível posterior ao da fig. 76, observa-se que: o apêndice reticular é vestigial ou ausente, evidenciando-se as depressões (►) correspondentes nas capas externas, e a matriz é menos volumosa. Entre os apirenes, observam-se vários grânulos de secreção (gr). Glutaraldeído 6%, tetróxido de ôsmio 1%, seguido de acetato de uranil 2%. 19.400x.

Fig. 78 - Secções transversais de flagelos - porções mais posteriores-de espermatozoides eupirenes, nos quais destacam-se: o apêndice reticular vestigial ou ausente (►), a redução no volume da matriz elêtron densa e uma região elêtron-transparente (setas brancas), anteriormente ocupada por um eixo elêtron-denso, no derivado mitocondrial (dm). Glutaraldeído 6%, tetróxido de ôsmio 1%, seguido de acetato de uranil 2%. 34.500x.

FIGURAS 75 a 77 - ESPERMATOZÓIDES NO DUCTO EJACULADOR (DE) DUPLA.

FIGURA 78 - ESPERMATOZÓIDES NO DUCTO EJACULADOR (DE) SIMPLES.

Fig. 75 - Feixe de  $256 \pm 1$  espermatozoides eupirenes (eup), em corte transversal ao nível de flagelos, mantidos em conjunto pelo material elétron-denso (md) intersticial que os envolve mais densamente na periferia. Destaque (círculo) para um flagelo anormal duplo. Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.  
8.200x.

Fig. 76 - Visão parcial de um feixe de espermatozoides eupirenes, em corte transversal ao nível de flagelos - porção anterior - e do núcleo (n). Nota-se: o apêndice reticular (ar), localizado numa depressão da capa externa (ce); a volumosa matriz elétron-densa () de aspecto reticulado, que recobre parcialmente o flagelo; e o derivado mitocondrial (dm). Material fixado em glutaraldeído 6%, tetróxido de ósmio 1%, seguido de acetato de urânio 2%.  
27.600x.

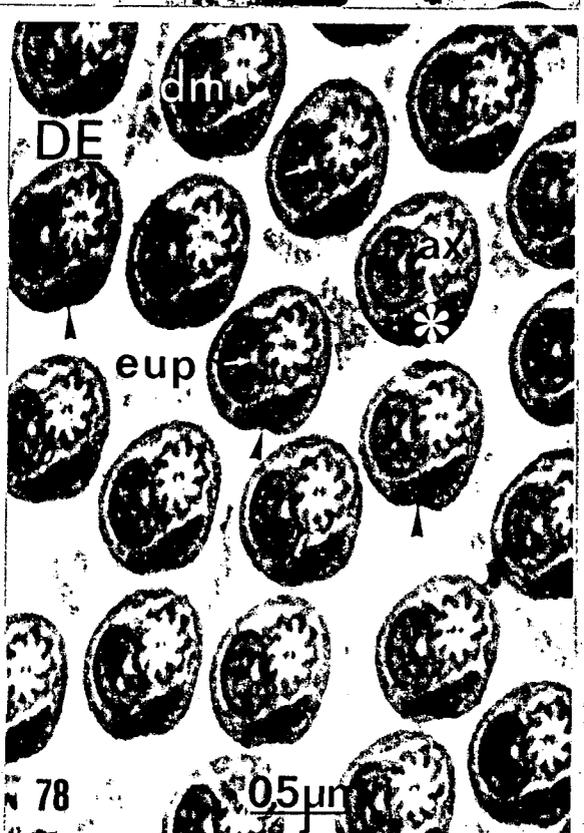
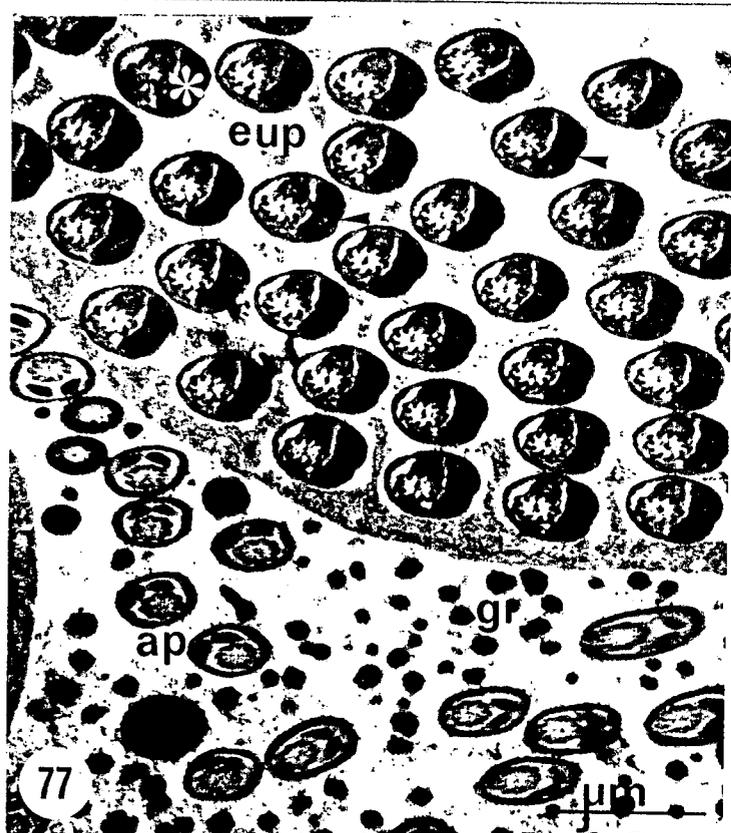
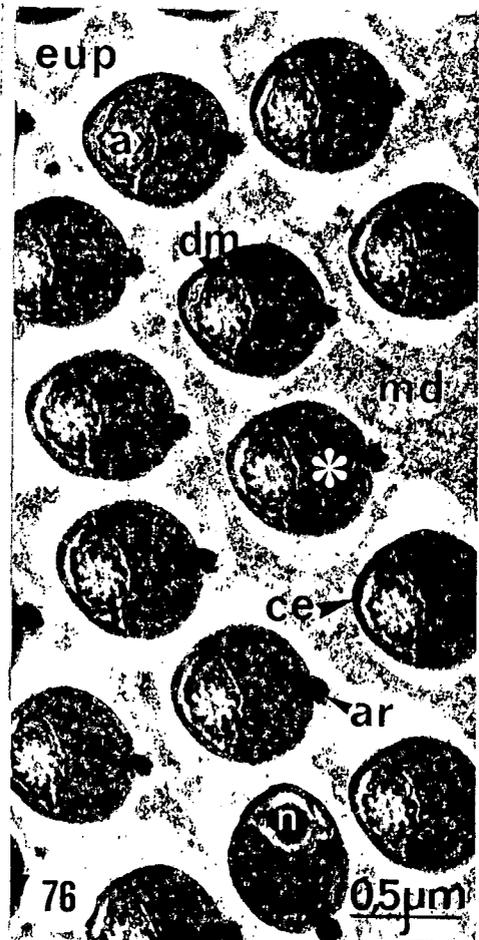
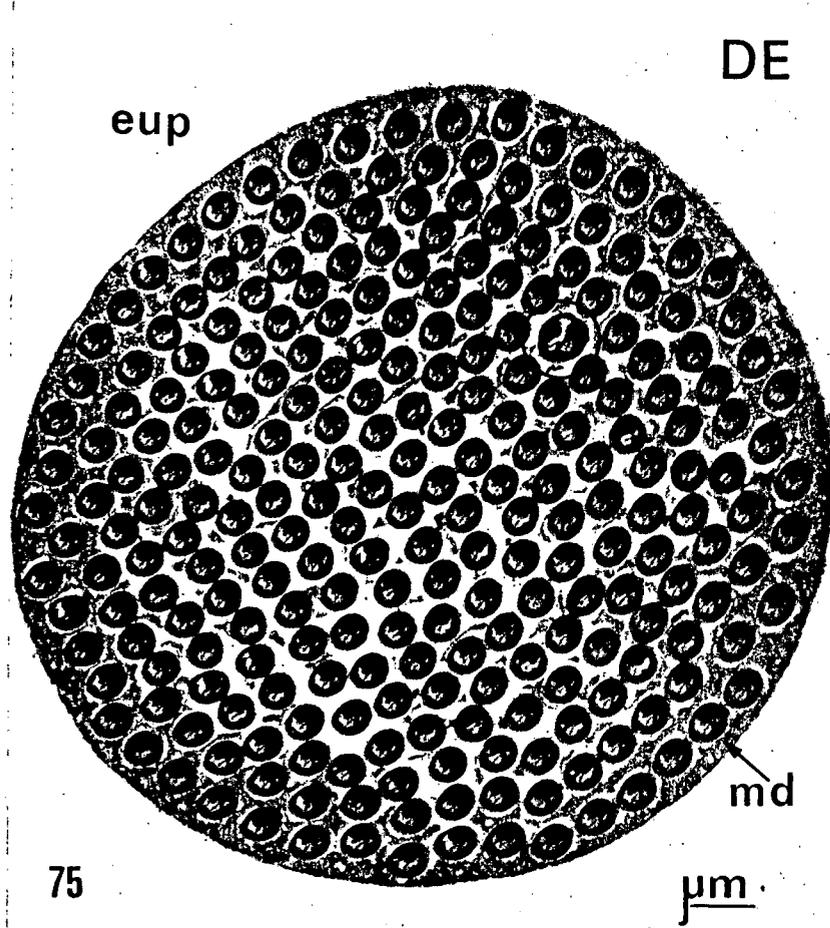


Fig. 81 - Um espermatozóide apirene anormal com 2 flagelos envoltos por capas internas (\* ) e externa (ce) comuns. Destacam-se os 2 axonemas e os 4 derivados mitocondriais com regiões medulares elétrondensas (\* ). À esquerda e abaixo, nota-se um espermatozóide eupirene (eup), seccionado num nível mais anterior que o mostrado na fig. 80. O axonema, com microtúbulos acessórios elétrondensos (seta branca), e o derivado mitocondrial estão envoltos por uma volumosa matriz elétrondensa. Na capa externa há uma saliência (→) numa região próxima ao axonema. 81.800x.

Fig. 82 - Ampliação de um espermatozóide apirene (ap), cortado transversalmente ao nível da porção mediana do flagelo, no qual destacam-se: a capa mais externa e as mais internas (\* ) que envolvem os 2 derivados mitocondriais e o axonema. Neste, observa-se que os microtúbulos acessórios (ma) são preenchidos com material de baixa elétrondensidade (setas brancas). Nota-se, também, a natureza periódica (\* ) das regiões medulares dos derivados mitocondriais. 155.500x.

Fig. 83 - Envelope vazio (ev) de um espermatozóide eupirene. Matriz amorfa (asterisco branco) e capa externa (ce). 117.300x.

FIGURAS 79 a 83 - ESPERMATOZÓIDES NA BURSA COPULATRIX (BC).

Material fixado em glutaraldeído 2%, tetróxido de ósmio 2%, seguido de ácido tânico 1%.

Fig. 79 - Espermatozóides apirenes (ap) seccionados transversal e longitudinalmente, nos quais destacam-se: o axonema (ax), os derivados mitocondriais (dm) e as capas externas (ce). 25.500x.

Fig. 80 - Flagelo de espermatozóide eupirene (eup), cortado transversalmente numa região posterior da porção principal, no qual evidenciam-se: a capa externa, na qual há uma interrupção (▶) numa área mais elétron-densa, onde se inseria o apêndice reticular; a matriz elétron-densa (⊗) que envolve os 2 derivados mitocondriais (dm) e, parcialmente, o axonema (ax). A seta menor indica uma área elétron-transparente, anteriormente ocupada por um eixo elétron-denso. 81.800x.

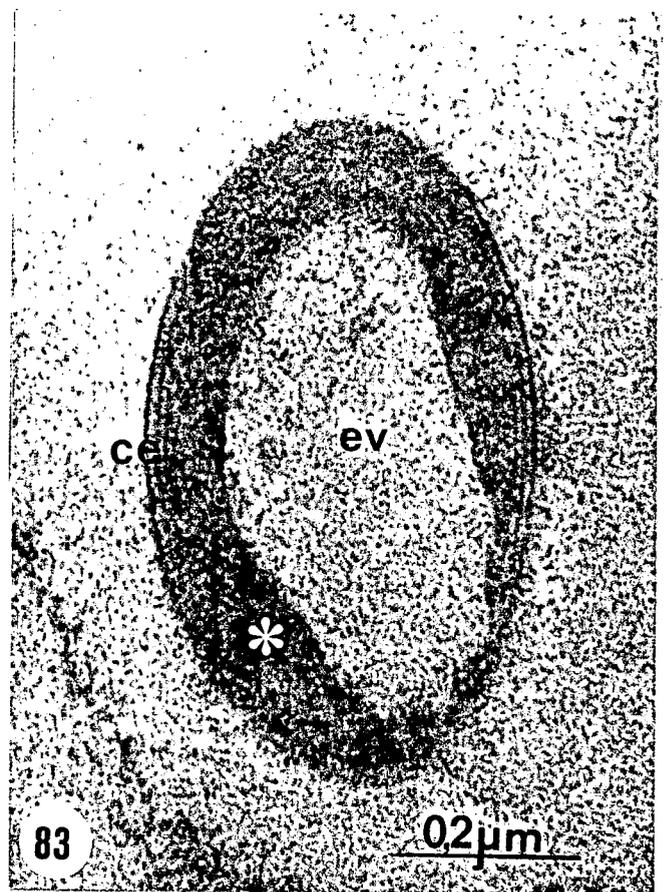
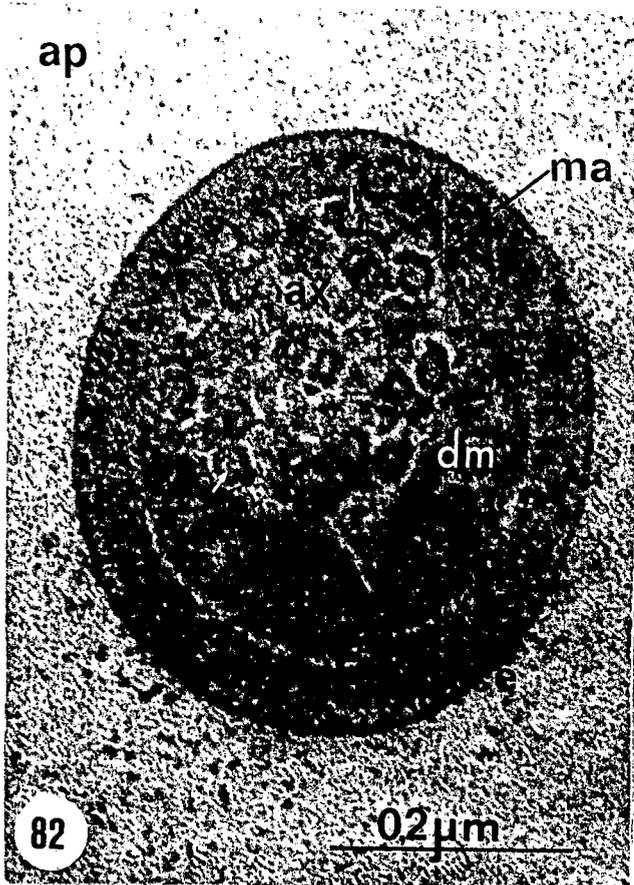
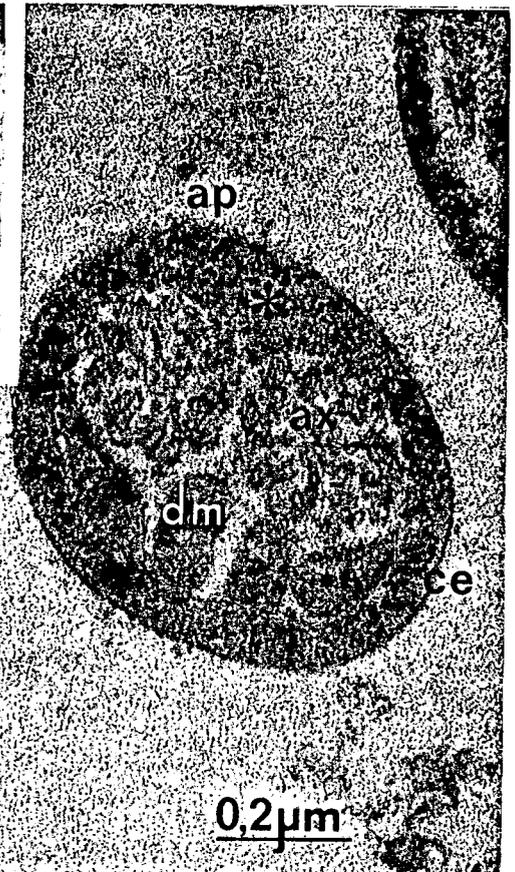
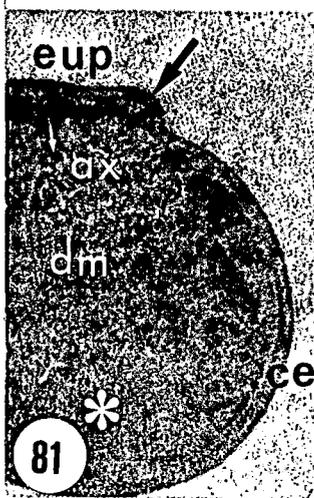
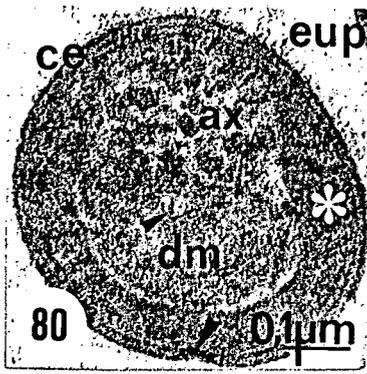
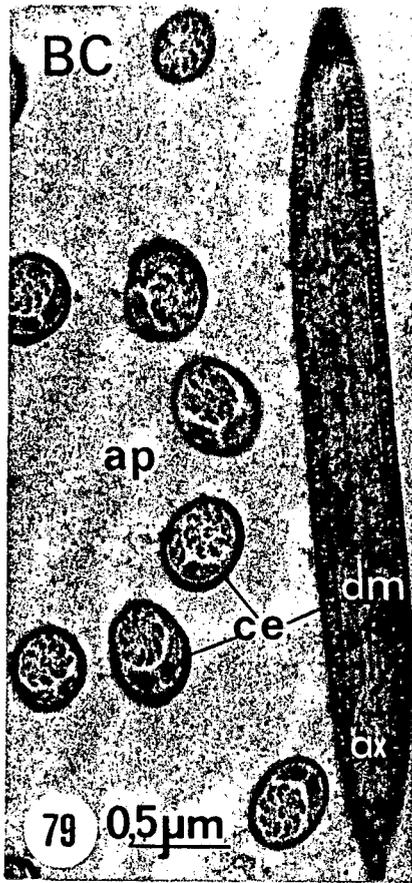


Fig. 85 - Maior aumento de 2 espermatozoides eupirenes (eup) e um apirene (ap), seccionados ao nível de flagelos. Destacam-se nos eupirenes: espessamentos (→) entre as capas justapostas; interrupção na capa (seta branca) e uma área mais elétron-densa, onde se inseria o apêndice reticular; saliência ou abertura (→) da capa, por onde sairá o espermatozóide; axonema (ax) com microtúbulos acessórios (ma) e centrais elétron-transparentes; derivado mitocondrial único com uma área elétron-transparente (▷), próxima ao axonema. 117.000x.

Fig. 86 - Justaposição de flagelos de espermatozoides eupirenes, destacando-se o espessamento (→) entre as capas de estrutura estriada, e a matriz (⊗) com regiões claras e densas. 48.500x.

FIGURAS 84 a 86 - ESPERMATOZÓIDES NA ESPERMATECA (RS).

Material fixado em glutaraldeído 0,25% (a proximadamente 2 1/2 meses), ácido tânico 4%, tetróxido de ósmio 1%, seguido de acetato de uranil 2%.

Fig. 84 - Aspecto geral de um grupo de espermatozóides eupirenes (eup), no qual se encontra intercalado um apirene (ap), imersos num material elétron-denso (md). Secção transversal ao nível de porções cefálicas e flagelos, em várias alturas. Observa-se: espessamento (→) entre as capas (ce) dos espermatozóides que se justapõem; saliências (→) próximas a núcleos (n) ou axonemas (ax), por onde sairão os espermatozóides; matriz amorfa (⊗) com diferentes elétron-densidades e mais volumosa ao nível de cabeças e porções iniciais dos flagelos; derivados mitocondriais (dm) únicos e duplos com regiões elétron-transparentes (▷) próximas aos axonemas; e pequenas áreas elétron-densas externas (▷) onde se inseriam os apêndices reticulares. 40.000x.

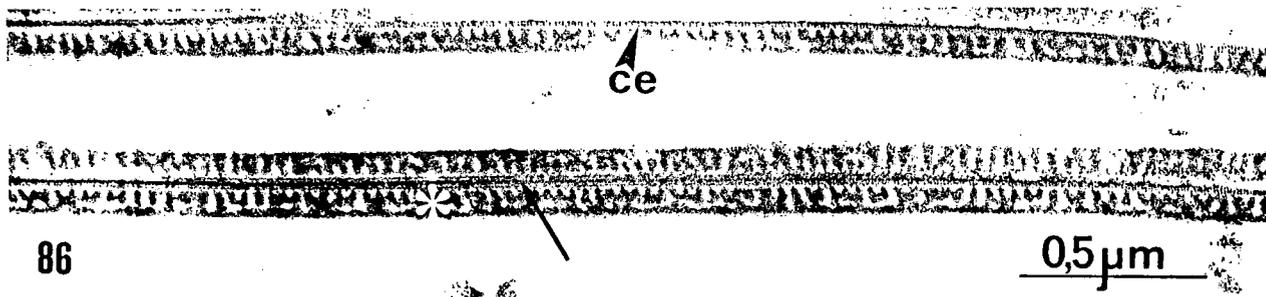
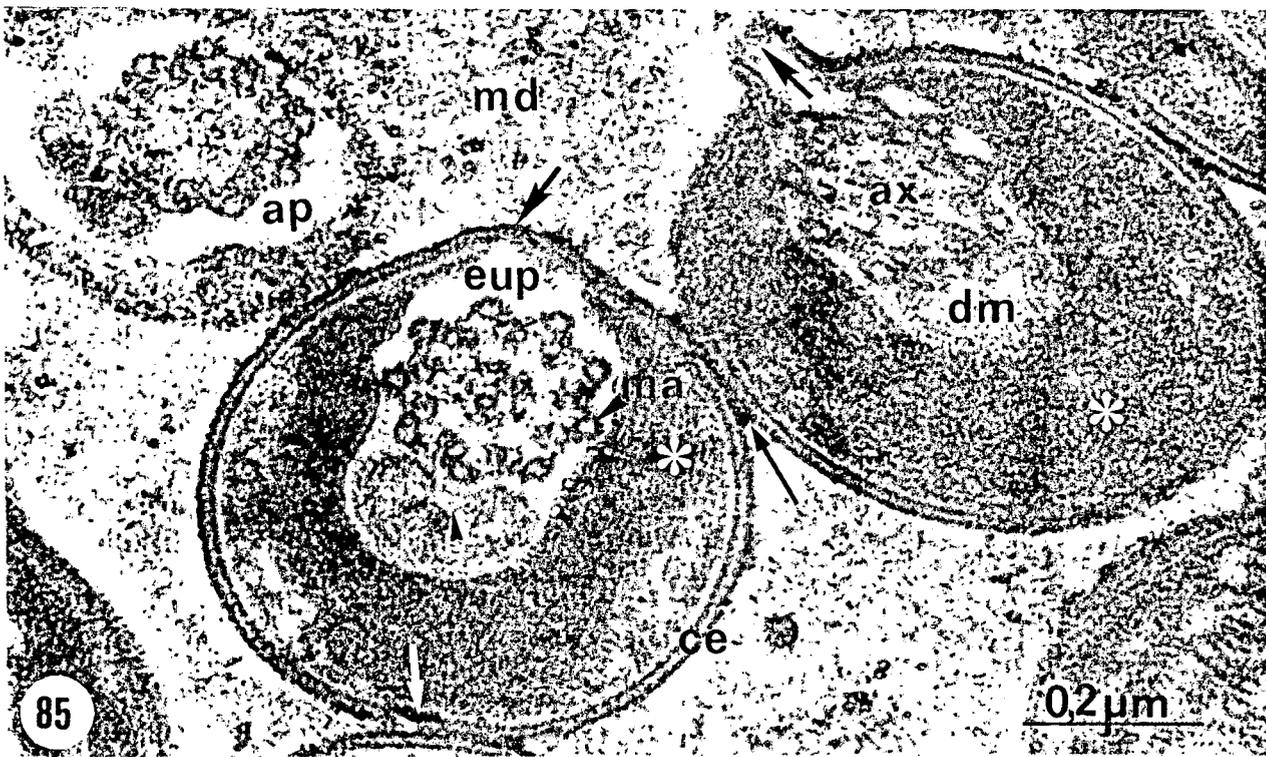
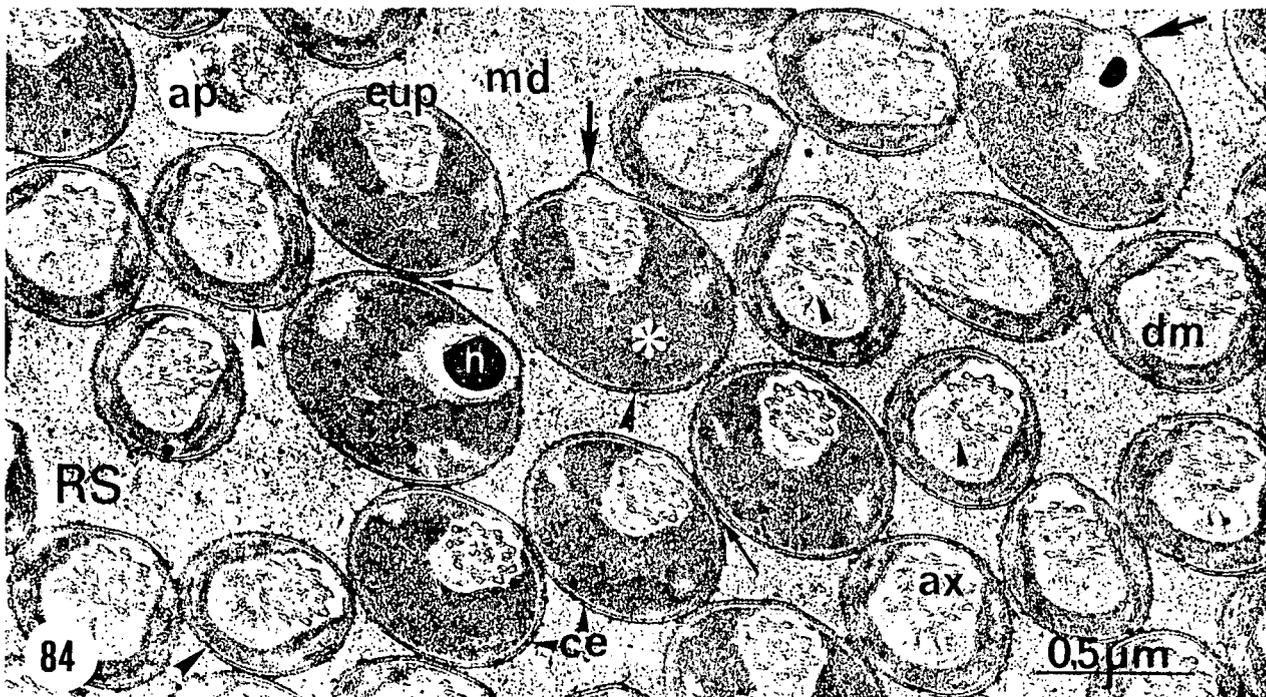


Fig. 88 - Maior aumento de um espermatozôide eupirene (eup), em corte transversal ao nível do flagelo numa altura similar àquela da fig. 87. Observa-se: na capa externa, uma área densa (seta branca) próxima à região interrompida, onde se inseria o apêndice reticular; pequenas estruturas globulares (▶), em série, que recobrem internamente a matriz amorfa; no derivado mitocondrial, uma área elétron-transparente próxima ao axonema, na direção do microtúbulo acessório (ma) localizado entre as duplas periféricas (dp) nº 2 e 3; no axonema, os microtúbulos acessórios elétron-transparentes interligados por fibras densas (fd), os microtúbulos centrais e as duplas periféricas igualmente elétron-transparentes. Material denso ao redor do espermatozôide. 166.000x.

Fig. 89 - Aspecto geral de um conjunto de envelopes vazios (ev) de espermatozôides eupirenes, envoltos por material denso. Alguns espermatozôides apirenes (ap) intercalados. 15.200x.

FIGURAS 87 a 89 - ESPERMATOZÓIDES NA ESPERMATECA (RS).

Material fixado em glutaraldeído 0,25% (aproximadamente 2 1/2 meses), ácido tânico 4%, tetróxido de ôsmio 1%, seguido de acetato de uranil 2%.

Fig. 87 - Espermatozóides eupirenes cortados transversalmente ao nível dos flagelos, em níveis posteriores àqueles da fig. 85 e mais ampliados que os da fig. 84. Destacam-se: as capas externas (ce), com saliências ( $\rightarrow$ ), interrupções ( $\blacktriangleright$ ) e espessamentos ( $\rightarrow$ ) nas regiões de contato entre espermatozóides; a matriz amorfa ( $\otimes$ ) com áreas de diferentes elétrondensidades; os derivados mitocondriais (dm) únicos e volumosos, na maioria; e o material elétron-denso (md) onde os espermatozóides estão imersos. 56.900x.

