

**MAX PEREIRA GONÇALVES**

**DESCRIÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DA ESPERMATOGÊNESE  
COM ÊNFASE NA ESPERMIOGÊNESE EM *Trypoxylon (Trypargilum)*  
*lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae)**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS –BRASIL**

**2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G635d  
2007

Gonçalves, Max Pereira, 1972-

Descrição ultra-estrutural da espermatogênese com  
ênfase na espermiogênese em *Trypoxylon (Trypargilum)*  
*lactitarse* (Hymenoptera : Sphecidae) / Max Pereira  
Gonçalves. – Viçosa, MG , 2007.  
xiii, 38f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Lino Neto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Ultraestrutura (Biologia). 2. Espermatogênese em  
animais. 3. Sêmen - Anatomia. 4. Himenóptero - Morfologia.  
5. Himenóptero - Classificação. 6. Himenóptero -  
Reprodução. 7. Vespa - Biologia. 8. *Trypoxylon*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571,633

**MAX PEREIRA GONÇALVES**

**DESCRIÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DA ESPERMATOGÊNESE  
COM ÊNFASE NA ESPERMIOGÊNESE EM *Trypoxylon (Trypargilum)*  
*lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae)**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.**

**APROVADA: 12 de fevereiro de 2007.**

---

**Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-Orientador)**

---

**Prof.<sup>a</sup> Uyrá dos Santos Zama  
(Co-Orientadora)**

---

**Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta**

---

**Prof.<sup>a</sup> Karina Carvalho Mancini**

---

**Prof. José Lino Neto  
(Orientador)**

**Dedico**

Àquelas que mais me incentivaram, apoiaram e lutaram por mim,

À minha Mãe, Célia de Brito Pereira (*in memoriam*) e

À Minha Avó, Maria Bárbara Pereira (*in memoriam*)

Àqueles que me deram uma nova razão para lutar e iluminaram minha vida

À minha filha, Bárbara Célia Alves Pereira e

A meu filho, Max Pereira Gonçalves Filho.

## AGRADECIMENTOS

Meus Sinceros Agradecimentos

À Neuzane Assis de Oliveira, pelo companheirismo, amizade, apoio e amor.

Ao meu Pai, José Gonçalves Neto, pelo exemplo de honestidade.

Aos meus Irmãos, Marcos Pereira Gonçalves e Riva Angelis Pereira da Silva, pela amizade, cumplicidade, incentivo e apoio constante.

À Liliane Tereza Alves Pereira, pela amizade e filhos maravilhosos que me deu.

Ao Professor Doutor José Lino Neto, pela orientação presente, pela amizade, pelos ensinamentos, enfim, por tudo que aprendi com você.

Aos meus amigos de infância que são irmãos de coração: Bidico (Marcos Paulo Meireles) e Kiko (Jairo Henrique Pereira Filho), pelo incentivo e amizade.

Ao Professor Doutor Clóvis Andrade Neves, pela Co-orientação, pela paciência e pela amizade.

Ao Professor Doutor Lusinerio Prezzotti, pela Co-orientação, pelo incentivo e pela amizade.

À Professora Doutora Uyrá dos Santos Zama, pela Co-orientação, pela dedicação, presença e pela amizade.

Aos membros da Banca Examinadora da Tese: Professor Doutor José Lino Neto, Professor Doutor Clóvis Andrade Neves, Professor Doutor Sérgio Luis Pinto da Matta, Professora Doutora Uyrá dos Santos Zama e a Doutora Karina Carvalho Mancini pela disponibilidade, análises e sugestões.

Aos meus colegas professores: Waleska Bretas, Denise, Lúcia Alves, Luiz Cosme, Ivana, Márcio Mendes, entre outros, por antes de serem colegas de profissão terem me ensinado a ser um profissional, A Luciane pela amizade e em especial ao Nelson Saunders pelo exemplo profissional e amizade.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Histologia da Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE: Érika Mori, Estevaldo Conde e Kenner Moraes, pela amizade e convivência afetuosa

A todos os professores do Departamento de Biologia Geral (U.F.V.) e em especial aqueles que foram meus mestres: Sérgio da Matta, Izabel, Cláudio, Clóvis, Everaldo, Mara, Elza e Serrão.

Aos Funcionário do Departamento de Biologia Geral (U.F.V.) e do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural (U.F.V.): Alex, Rose, Diana, Salvadora, Beth.

À Professora Doutora Mary Anne Heidi Dolder por abrir as portas do Laboratório de Biologia Celular (IB-UNICAMP).

A todos os colegas: Denilse, Gláucia, Frederico, Ana Paula Caixeiro, Ana Paula da Matta, Daniele, Fabiana, Ronney, Diego, Sirlei, Luíz, Jaqueline, Jane, Fabiano, Marcos, Aline, Maria Inês, Patrícia, Pollyana, Lílian, Tatiana, Vinícius, Marcos, Mariáurea, e todos os demais colegas da Biologia Celular e Estrutural que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista

Aos colegas de turma que se tornaram amigos pela amizade e companheirismo, em especial as amigos: Cláudia, Rejane, Sirlene, Reggianni, Edson, Michelle, Giselle, Lamara e Edmilson, por terem me ouvido nas horas de tédio.

À Universidade Vale do Rio Doce, pela liberação, patrocínio e incentivo para que eu fizesse o mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino de excelência oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo patrocínio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste projeto, que se tornaram parte da minha história, o meu muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

Max Pereira Gonçalves, filho de José Gonçalves Neto e Célia de Brito Pereira, nasceu em Caratinga, Minas Gerais, Brasil, em 05 de outubro de 1972.

Em dezembro de 1999, graduou-se como Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares – MG, Brasil. Durante o período de graduação, de 1996 a 1999, foi monitor da disciplina de Citologia e Histologia.

Em 2005, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil, defendendo tese em fevereiro de 2007. Neste mesmo mês foi aprovado no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO                                                                                                                        | VIII |
| ABSTRACT                                                                                                                      | IX   |
| 1. Introdução                                                                                                                 | 1    |
| 2. Revisão Bibliográfica                                                                                                      | 3    |
| 2.1 Características gerais dos testículos dos insetos                                                                         | 3    |
| 2.2 Morfologia geral dos espermatozóides nos Hymenoptera                                                                      | 3    |
| 2.3 Meiose nos Hymenoptera                                                                                                    | 5    |
| 2.4 Características gerais da espermatogênese nos insetos                                                                     | 6    |
| 3. Objetivos                                                                                                                  | 9    |
| 4. Material e Métodos                                                                                                         | 10   |
| 5. Resultados                                                                                                                 | 12   |
| 5.1 Formação de cistos e feixes espermáticos                                                                                  | 12   |
| 5.2 Alterações nucleares                                                                                                      | 12   |
| 5.3 Formação do acrossomo                                                                                                     | 13   |
| 5.4 Formação dos derivados mitocôndriais                                                                                      | 14   |
| 5.5 Formação do adjunto do centríolo                                                                                          | 15   |
| 5.6 Formação do axonema                                                                                                       | 15   |
| 5.7 Comparação da espermatogênese nos dois tipos de espermatozóides produzidos por <i>Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse</i> | 15   |
| 6. Discussão                                                                                                                  | 28   |
| 7. Conclusões                                                                                                                 | 31   |
| 8. Referências Bibliográficas                                                                                                 | 33   |

## RESUMO

GONÇALVES, Max Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007.  
**Descrição ultra-estrutural da espermatogênese com ênfase na espermiogênese em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae).** Orientador: José Lino Neto. Co-Orientadores: Clóvis Andrade Neves, Lusinério Prezotti e Uyrá dos Santos Zama.

Nos insetos, os testículos, que são em número de dois, são formados por folículos, que variam em número entre as espécies. Em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* observam-se três folículos em cada testículo. É nos folículos testiculares que as espermatogônias originam os espermatozóides, através do processo espermatogênico. Na espermiogênese, fase final da espermatogênese, se observam grandes alterações nas espermátides para diferenciação em espermatozóides, ocorrendo de forma gradativa e contínua, através de alterações nucleares, formação do acrossomo, dos derivados mitocondriais e do axonema. Estas alterações visam tornar o espermatozóide uma célula compacta, com motilidade e capacidade de fecundação. Os espermatozóides dos insetos geralmente apresentam, na região da cabeça, núcleo e acrossomo e, adjunto do centríolo na região de transição e na região flagelar, um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios. Este trabalho teve como objetivos: a) descrever a estrutura e a ultra-estrutura da espermatogênese em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*, e b) observar se os processos espermatogênicos são iguais para a formação dos dois tipos de espermatozóides. O processo espermiogênico em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é semelhante ao descrito para os demais Hymenoptera, entretanto, no final são formados dois tipos de espermatozóides, um com núcleo curto e diâmetro maior e outro com núcleo longo e delgado. Não foram observadas diferenças no processo espermatogênico entre os dois tipos de espermatozóides, sendo o processo semelhante ao descrito para a maioria dos insetos.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Max Pereira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2007.  
**Ultra-structural description of the spermatogenesis with emphasis in the spermiogenesis in *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae).**  
Adviser: José Lino Neto. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves, Lusinério Prezotti and Uyrá dos Santos Zama.

The spermatogenic process happens in the testicles, which are in number of two. In the insects, the testicles are formed by follicles, varying the number among the species. In *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* three follicles are observed in each testicle. It is in the testicular follicles that the spermatogonias originate the spermatozoa. The spermatozoa of the insects usually present, in the head's region, nucleus and acrosome and, in the flagellum, is region an axoneme, two mitochondrial derivatives and two accessory bodies. In the spermatogenesis process big significant alterations are observed in the spermatids that differentiated in to spermatozoa. Its happens occurs whit gradual and continuous way, that includes nuclear alterations and formation of the acrosome, the mitochondrial derivatives and axoneme. These alterations transform to turn the spermato'zoa into a compact cell, with motility and fecundation capacity. The spermatogenic process in *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* is similar to the observed for other Hymenoptera, however, two types of spermatozoa are formed, one with short nucleus and larger diameter and another with long and thin nucleus. Thus, this study aims: describe the structure and ultrastructure of the spermatogenesis in *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*, and observe if the spermatogenic process is the same for both sperm types. Differences were not observed in the spermatogenic process between the two types of spermatozoa, being the process similar to the described for most of the insects.

## 1. INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera, com aproximadamente 120 mil espécies descritas, estão entre as quatro maiores ordens de insetos, sendo considerados a de maior complexidade biológica. Possuem, aproximadamente, 80 famílias divididas nas subordens Symphyta e Apocrita. A subordem Apocrita é a mais diversificada e contém a grande maioria das espécies sendo, por sua vez, subdividida nos grupos Aculeata e Parasitica (Gallo *et al*, 2002). Os Aculeata representam em torno de 45% das espécies descritas e têm, como principal característica, fêmea com ferrão derivado, por modificações do ovopositor (Gaston, 1992).

É uma das ordens com maior diversidade biológica, sendo seus representantes encontrados em quase todos os ecossistemas (Gaston, 1991). É o grupo dentre os Insecta que apresenta mais interações com outros insetos e possui o maior número de espécies de importância econômica, uma vez que, como a maioria é parasitóide, desempenham papel importante no equilíbrio natural das populações de seus hospedeiros. Por esta razão, é a ordem mais usada em programas de controle biológico de pragas agrícolas e florestais (Hanson, 1995).

Nos Hymenoptera se observam diversos tipos de comportamentos sociais, e o cuidado maternal é generalizado entre os de hábito solitário (Evans & West-Eberhard, 1970). Já nos que possuem interações sociais, predomina a eussocialidade (Crespi & Yanega, 1995).

Os Hymenoptera têm uma inquestionável importância ecológica e econômica, e mesmo assim não há consenso sobre suas relações evolutivas (Rasnitsyn, 1988; Gauld & Bolton, 1996; Dowton & Austin, 1994; Ronquist *et al.*, 1999). Estudos utilizando dados moleculares, na maioria das vezes, não têm chegado às mesmas hipóteses filogenéticas propostas a partir da morfologia somática (Cameron, 1993; Dowton & Austin, 1994; Dowton *et al.*, 1997).

O gênero *Trypoxylon* pertence à família Sphecidae (Sphecoidea), que pertence aos Aculeata, e apresenta ampla distribuição geográfica, sendo dividida nos subgêneros *Trypoxylon* e *Trypargilum* (Gallo *et al*, 2002). Os machos das espécies do subgênero *Trypargilum* permanecem no ninho durante a fundação do mesmo pelas fêmeas (Cross *et al*,

1975; Coville & Coville, 1980), onde as cópulas ocorrem (Amarante, 1991; Brockmann, 1992; Garcia & Adis, 1995).

Há poucos trabalhos sobre a morfologia dos espermatozóides e da formação dos mesmos, fazendo-se necessário seu estudo, uma vez que ele tem se mostrado promissor em filogenia, representando mais uma ferramenta para desvendar as relações evolutivas entre os grupos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TESTÍCULOS DOS INSETOS**

O sistema reprodutor masculino da maioria dos insetos é formado por um par de testículos, vasos eferentes e deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório. Cada testículo é formado por um ou vários folículos, que variam em forma e número de um grupo de inseto para outro (Chapman, 1998). Os folículos testiculares são preenchidos por cistos, os quais são formados por clones das células germinativas imbricadas nas células císticas. Estas são células de revestimento não germinativas (Baccetti & Bairati, 1964).

Os folículos testiculares podem ser divididos em cinco regiões distintas: a) germário, que é a região onde espermatogônias dividem-se mitoticamente; b) zona de crescimento, formada por espermatogônias B em proliferação, com a formação de cistos; c) zona de maturação, onde cada espermatócito sofre a segunda divisão meiótica, dando origem a espermátides; d) zona de transformação, que é o local onde ocorre a espermiogênese e e) zona com espermatozóides, onde o folículo testicular liga-se ao vaso deferente através do vaso eferente (Cruz-Landim, 2004).

O número de espermátides por cisto varia entre as espécies e representa o número de divisões mitóticas que ocorrem antes da diferenciação e pode ser expresso por  $2^n$ , onde n representa o número de divisões celulares. A forma do cisto, normalmente, varia de acordo com a fase da espermatogênese, ou seja, cistos contendo espermatogônias, espermatócitos ou espermátides jovens, geralmente são esféricos e à medida em que as espermátides se tornam alongadas o cisto também se alonga (Phillips, 1970).

É comum observar nos insetos o desenvolvimento sincrônico das células germinativas dentro de um mesmo cisto e, como as citocineses dos clones são incompletas, formam-se pontes citoplasmáticas que fazem do clone um sincício (Baccetti & Bairati, 1964; Hoage & Kessel, 1968).

### **2.2 MORFOLOGIA GERAL DOS ESPERMATOZÓIDES NOS HYMENOPTERA**

De modo geral, os espermatozóides dos Hymenoptera são semelhantes àqueles considerados típicos para os Pterygota (Baccetti, 1972) e àqueles descritos para a maioria dos insetos (Phillips, 1970). Eles são finos e longos, medindo entre 40 e 250  $\mu\text{m}$  de comprimento (Quicke, 1997), constituídos por uma região de cabeça e uma de cauda (ou flagelo). A cabeça inclui o acrosso, na porção anterior, e o núcleo, e na região de transição observa-se o adjunto do centríolo (Quicke *et al.*, 1992; Jamieson *et al.*, 1999). O flagelo, em geral, é formado por um axonema, dois derivados mitocondriais e dois corpos acessórios.

Em muitos Hymenoptera o acrosso é formado por duas estruturas: vesícula acrossomal e o perforatorium (Wheeler *et al.*, 1990; Jamieson *et al.*, 1999; Newman & Quicke, 1999a). Entretanto, em Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b), Cynipoidea (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999b), Ichneumoidea (Quicke *et al.*, 1992) e Bethyloidea (Quicke *et al.*, 1992) há uma terceira estrutura, formando uma camada extracelular, que reveste todo o complexo acrossomal, além de parte do núcleo.

Entre os Hymenoptera observam-se variações no comprimento do núcleo, que vai de 4  $\mu\text{m}$  (Braconidae, Quicke *et al.*, 1992) a 105  $\mu\text{m}$  (Chalcididae, Lino-Neto, 2001), e no curso que pode ser linear ou em espiral, como observado em Chalcidoidea (Lee & Wilkes, 1965; Wilkes & Lee, 1965; Hogge & King, 1975; Quicke *et al.*, 1992; Quicke, 1997; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b) e Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Na região de transição núcleo-flagelo observa-se uma estrutura denominada adjunto do centríolo, presente em quase todos os insetos, circundando assimetricamente a extremidade anterior dos derivados mitocondriais e do axonema, no local onde estes se prendem ao núcleo (Jamieson *et al.*, 1999). Na maioria dos Hymenoptera o adjunto do centríolo é uma estrutura cilíndrica, longa e localiza-se paralelamente ao axonema, entre a base do núcleo e a extremidade anterior de um (Lino-Neto *et al.*, 2000b) ou dos dois derivados mitocondriais (Wheeler *et al.*, 1990). Aparentemente o adjunto do centríolo tem a função de manter a conexão núcleo-flagelo (Gatenby & Tahmisian, 1959; Gatenby, 1961 apud Baccetti, 1972).

Os dois derivados mitocondriais apresentam cristas e, geralmente, material paracristalino. Os dois podem ser iguais em diâmetro e comprimento (por exemplo, nas

formigas, Wheeler, *et al.*, 1990) ou assimétricos (por exemplo, nas abelhas, Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Cruz-Landim & Beig, 1980a; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980). Em Scelionidae foi observado apenas um derivado mitocondrial (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Nos Hymenoptera, como nos insetos em geral, o axonema possui nove microtúbulos acessórios simples, nove pares de microtúbulos periféricos e um par central (9+9+2) (Baccetti, 1972; Phillips 1970; Báó, 1987). Geralmente os microtúbulos se dispõem paralelamente entre si, entretanto, eles podem apresentar um curso em espiral, como se observa em Chalcidoidea (Lee & Wilkes, 1965; Wilkes & Lee, 1965; Hogge & King, 1975; Quicke *et al.*, 1992; Quicke, 1997; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b) e Scelionidae (Lino-Neto & Dolder, 2001a).

Entre o axonema e os derivados mitocondriais observa-se dois corpos acessórios, que são estruturas longas e, geralmente, possuem aspecto triangular quando observados em corte transversal (Baccetti, 1972; Cruz-Höfling *et al.*, 1970; Wheeler *et al.*, 1990; Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999a; Lino-Neto *et al.*, 2000b).

## 2.3 MEIOSE NOS HYMENOPTERA

A meiose é um tipo de divisão celular que leva a formação dos gametas em organismos que reproduzem sexuadamente, diferenciando-se da mitose por ter o número de cromossomos reduzido à metade nas células filhas, de  $2n$  para  $n$  (John, 1972).

Durante o processo espermatogênico, em machos diplóides, as espermatogônias sofrem duas divisões meióticas sucessivas. Na prófase I, as espermatogônias, diplóides, originam os espermatócitos I e esses por sua vez originam, ao final da primeira divisão meiótica, os espermatócitos II, que são haplóides, sendo esta a etapa reducional (Lino-Neto *et al* 2005).

Na segunda divisão meiótica, os espermatócitos II originam as espermatídes. Apesar de menores, as espermatídes são células semelhantes aos espermatócitos II, apresentando núcleo descondensado, complexo de Golgi e abundante citoplasma quando comparada ao espermatozóide (Lino-Neto *et al* 2005).

Em Hymenoptera, os machos são haplóides, ou seja, originados de ovos não fertilizados, o que leva a uma alteração no processo de espermatogênese para que a ploidia não seja reduzida à metade em cada ciclo meiótico, como ocorre em organismos diplóides

(Cruz-Landim & Beig, 1980b). Como ocorre uma espermatogênese abortiva nos Hymenoptera, ou seja, a primeira divisão da meiose não ocorre de forma tradicional, é expulso um broto citoplasmático anucleado e, a segunda divisão é semelhante à tradicional (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b; Cruz-Landim *et al.*, 1980; Conte, 2004).

Em vespas e formigas foi observado uma citocinese simétrica ao final da segunda divisão meiótica, formando espermátides morfofuncionalmente iguais (Mark & Copeland, 1907). Em abelhas, as duas espermátides não têm o mesmo volume citoplasmático devido a uma citocinese desigual, formando uma espermátide “normal” e a outra com pouco citoplasma (Cruz-Landim & Beig, 1980 a,b). Esta espermátide menor é desprovida de qualquer organela membranosa, possui apenas núcleo e alguns ribossomos (Cruz-Landim & Beig 1980a; Cruz-Landim *et al.*, 1980), sendo inviável (Hachiohe & Onishi 1952; Lino-Neto & Araújo, 2006 – informação pessoal).

Observa-se em *T. lactitarse*, *T. rogenhofrei*, *T. aurifrons* e *T. albitarse* a ocorrência de quatro ciclos mitóticos, o que pode ser determinado pelo número de células por cisto (Moreira *et al.*, 2003).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ESPERMATOGÊNESE NOS INSETOS

Espermatogênese é o processo de formação dos espermatozóides e ocorre nos testículos, havendo, nesse processo, a redução do número de cromossomos à metade, exceto entre os Hymenoptera. A espermatogênese pode ser dividida nas fases meióticas, onde as espermatogônias originam as espermátides e espermiogênica, em que as espermátides originam os espermatozóides. Na fase da espermatogênese denominada espermiogênese, as espermátides passam por alterações que modificarão completamente a sua morfologia, ocorrendo perda de citoplasma, compactação da cromatina, formação do acrossomo a partir do complexo de Golgi e formação dos derivados mitocondriais, adjunto do centríolo e flagelo (Lino-Neto, 1993; Jamieson *et al.*, 1999).

A espermiogênese em *C. sordidus*, pode ser dividida em 10 estádios: 1º - Espermátides jovens esféricas; 2º - condensação de cromatina distribuída pelo núcleo; 3º - formação do flagelo e cromatina condensada na periferia do núcleo; 4º - cromatina granular e formação dos derivados mitocondriais; 5º - núcleo tornando-se fusiforme; 6º - núcleo em alongamento e cromatina grânulo-fibrilar; 7º núcleo oval com duas concavidades do mesmo

lado; 8º - filamentos cromatínicos em cordões espessos e coalescência dos mesmos em massas cromatínicas; 9º - cromatina totalmente compacta e 10º - perda de citoplasma residual (Lino-Neto, 1993).

Nos insetos, as espermátides jovens possuem núcleo centralizado, esférico e cromatina dispersa homogeneamente. Durante a espermiogênese, a cromatina condensa-se e passa a ter distribuição heterogênea, passando de granular para filamentosa e finalmente, tornando-se totalmente compacta (Cruz-Landim, 2004). Já no Coleoptera *C. sordidus*, além do descrito, os filamentos cromatínicos formam cordões espessos e ocorre coalescência dos mesmos em massas cromatínicas, o núcleo diminui de tamanho e alonga-se, processo esse coordenado por microtúbulos (Lino-Neto, 1993)

O acrossomo tem origem a partir da face trans do complexo de Golgi (Beams *et al*, 1956; Clayton *et al*, 1958; Ito, 1960; Lino-Neto, 1993), onde forma-se um grânulo pró-acrossomal justaposto ao núcleo, que move-se até a extremidade nuclear anterior, assumindo forma de calota (Kaye, 1962). A terceira camada, quando presente, é formada durante a espermiogênese, no espaço entre o grânulo acrossomal e o envoltório nuclear (Baccetti, 1972), sendo formada independente do próprio acrossomo ou do complexo de Golgi (Kaye, 1962).

A formação do derivado mitocondrial é semelhante a da maioria dos insetos e, se dá inicialmente pela agregação das mitocôndrias próximo ao núcleo, que formam uma única estrutura denominada complexo mitocondrial ou “Nebenkern”, onde anéis de mitocôndrias são fundidos formando um labirinto (Baccetti *et al*, 1969; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980). Logo em seguida essa estrutura se divide em duas porções, que percorrem o flagelo, ladeiam o axonema, sendo então denominadas derivados mitocondriais (Cruz-landim & Beig, 1979a *apud* Jamieson, 1987).

O adjunto do centríolo, estrutura localizada na transição núcleo flagelo, foi chamado de corpo cromatóide, sendo formado a partir de um material eletrodenso de origem nuclear (Comings & Okada, 1972; Cruz-Landim, 1979), como ribonucleoproteínas (Baccetti *et al*, 1969; Fuge, 1976) ou ainda pela coalescência de ribossomos livres no citoplasma (Fawcett & Phillips, 1970; Cruz-Landim *et al*, 1981). Entre o axonema e os derivados mitocondriais pode-se, às vezes, observar o corpo denso triangular, ou corpo acessório (Jamieson, 1987).

O flagelo na maioria dos insetos implanta-se de maneira que se forme um ângulo obtuso entre a cabeça e a cauda. O axonema é do tipo 9+9+2, tendo os microtúbulos centrais e acessórias um ponto denso no seu interior (Jamieson *et al.*, 1999).

Como os clones das espermatídes, células geneticamente idênticas, podem ficar unidos por pontes citoplasmáticas, em decorrência de citocineses incompletas, observam-se sincícios formados a partir dos mesmos (Baccetti & Bairati, 1964; Hoage & Kessel, 1968). Após a formação dos espermatozóides, esses se situam imbricados em invaginações das células císticas e, mesmo assim formam espermatozóides diferentes, ficando as caudas dos mesmos livres na luz do cisto (Phillips, 1970).

### 3. OBJETIVOS

Descrever a estrutura e a ultra-estrutura da espermatogênese com ênfase na espermiogênese em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*.

Observar se o processo espermiogênico difere para a formação dos dois tipos de espermatozóides encontrados nessa espécie.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DE MACHOS DE *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*.

Os machos adultos de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* foram coletados no apiário da Universidade Federal de Viçosa – UFV, em ninhos-armadilha feitos com bambu. Os ninhos armadilhas tinham diâmetro entre 8 e 15 mm e comprimento entre 12 cm e 20 cm, tendo somente uma das extremidades aberta.

### 4.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Os machos de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* foram colocados a 4°C por 15 minutos para anestesiá-los, colocados em seguida em placa de petri contendo tampão cacodilato de sódio e dissecados utilizando-se microscópio estereoscópico. Os testículos foram retirados e processados para microscopias de luz e eletrônica de transmissão de acordo com o protocolo a seguir:

1. Fixação: Os testículos foram dissecados e os folículos testiculares isolados foram fixados de 4 a 12 horas em solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação os folículos foram lavados por duas horas no mesmo tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas.
2. Desidratação: O material foi desidratado em série alcoólica crescente, 30%, 50%, 70% e 90% (15 minutos cada um), passando por dois banhos de 10 minutos em álcool 100%, 10 minutos em álcool/acetona (1:1) e três banhos de 10 minutos cada em acetona.
3. Infiltração: A infiltração foi feita à 4°C, por 12 horas, com uma mistura de 1:1 de Epon-812 e acetona.
4. Inclusão: O material foi imerso em Epon-812 em moldes de silicone, colocado em placa de Petri e transferida para estufa a 58°C por 72 horas.

5. Obtenção de cortes semifinos: Cortes de 0,5  $\mu$ m de espessura foram obtidos em micrótomo Leica RM 2155 com navalhas de vidro. Os cortes foram coletados com alça metálica e transferidos para lâmina histológicas e em seguida colocados em placa quente a 40°C por 15 minutos para aderência dos cortes à lâmina.
6. Coloração pelo Azul de Toluidina-Borato de Sódio: Solução de Azul de Toluidina-Borato de Sódio (Azul de Toluidina 0,5g, Borato de Sódio 1,0g e 100ml de água destilada) foi gotejada sobre os cortes, por cinco minutos, lavando em seguida os cortes rapidamente em água corrente.
7. As etapas de 1 a 6 ocorreram no Laboratório de Histologia Digestória e Reprodutiva do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa – UFV.
8. Obtenção dos cortes ultrafinos: Estes foram obtidos no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em ultramicrotomo LKB BROMMA/8800 ULTRATOME III com navalha de diamante, aproveitando-se os cortes prateados. Os cortes foram transferidos para grades de cobre de malha 300 mesh previamente lavadas em solução de HCl 0,2 N, água destilada e finalmente em álcool.
9. Contrastação: a contração foi feita em solução alcoólica de Acetato de Uranila a 3%, por 45 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz; posteriormente o material foi colocado em Citrato de Chumbo 0,2%, por cinco minutos, em temperatura ambiente.
10. As observações foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia Celular da UNICAMP, em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906.
11. As imagens dos negativos foram digitalizadas utilizando câmera fotográfica digital e invertidas no programa Photo Shop.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 FORMAÇÃO DE CISTOS E FEIXES ESPERMÁTICOS

O sistema reprodutor masculino de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é formado por um par de testículos, duas glândulas acessórias, vesículas seminais, os ductos eferentes e deferentes e um ducto ejaculatório. Cada testículo é formado por três folículos fusiformes (Figura 1a). Histologicamente, no folículo são reconhecidas cinco regiões, sendo elas, a partir da extremidade distal com relação ao ducto eferente: germário, crescimento, maturação, espermiogênese e espermatozóides (Figura 1b).

Na região de germário estão as células tronco, que por mitose, com citocineses incompletas (Figura 2a), mantêm sua população, da qual se originam as espermatogônias (células germinativas) e as células císticas (somáticas). As células císticas envolvem as espermatogônias e estas se dividem, também por mitose, formando o cisto (Figura 2b). As espermatogônias, após quatro ciclos mitóticos, se diferenciam em espermatócitos I de forma sincronizada. Estes sofrem a primeira “divisão” meiótica, formando os espermatócitos II. Esta divisão é abortiva, forma-se apenas um broto citoplasmático anucleado, o qual é eliminado juntamente com um centríolo, sem redução de ploidia, pois, as espermatogônias já são haplóides (Figura 2c). Os espermatócitos II, após a segunda divisão meiótica, originam as espermátides. Durante as divisões celulares, como as citocineses são incompletas, as espermátides permanecem unidas por pontes citoplasmáticas, formando verdadeiros sincícios até quase o final da espermiogênese (Figura 2d).

No final da espermiogênese ocorre a eliminação das pontes citoplasmáticas, mas as cabeças dos espermatozóides tornam-se imbricadas no citoplasma das células císticas (Figura 2e), a qual mantém os espermatozóides em feixes até a chegada dos mesmos à vesícula seminal.

### 5.2 ALTERAÇÕES NUCLEARES

Durante a espermatogênese, a compactação da cromatina ocorre de duas maneiras e em etapas distintas. A primeira tem como objetivo formar os cromossomos e

antecede as divisões meióticas. A segunda, que ocorre durante a espermiogênese, forma uma estrutura única, altamente compacta e alongada, resultando em uma grande redução do núcleo, o qual ocupa um espaço bastante reduzido no espermatozóide.

Na meiose, a compactação da cromatina ocorre através da formação de grânulos. Inicia-se pela periferia do núcleo (Figuras 3a e 3b) e, em seguida, por todo núcleo (Figura 3c).

A compactação da cromatina na espermatíde jovem inicia-se ainda com o núcleo esférico, se torna filamentosa e inicia-se uma homogeneização da mesma (Figura 4a).

Em fase subsequente, ocorre o alongamento da espermatíde, onde já se observa o derivado mitocondrial e o adjunto do centríolo em formação, a cromatina ainda permanece filamentosa, porém de forma mais homogênea que na fase anterior. Nesta fase observam-se poros nucleares e microtúbulos de manchete ao redor do núcleo (Figura 4b).

Posteriormente, observa-se uma cromatina organizada de forma mais filamentosa, os microtúbulos de manchete ao redor do núcleo, em algumas regiões estão em duas camadas e os poros nucleares não estão mais presentes (Figuras 4c-d). Na fase seguinte, a cromatina se torna bem compacta e algumas regiões eletro transparentes são observadas (Figuras 5a-b). Ao final das alterações nucleares, a cromatina se encontra altamente compactada e é possível diferenciar os espermatozoides de núcleo de diâmetro delgado daqueles de diâmetro maior, todos dentro de um mesmo cisto (Figuras 5c-d).

### **5.3 FORMAÇÃO DO ACROSSOMO**

O acrossomo começa a ser formado já na espermatíde inicial e se origina por fusões de vesículas liberadas pela face trans do complexo de Golgi (Figura 6a). Inicialmente, essas vesículas formam a vesícula pró acrossômica, que se localiza na região anterior do núcleo; observa-se que o axonema se encontra na região posterior do núcleo (Figura 6b). Em seguida, devido à rotação nuclear, a vesícula pró-acrossômica se posiciona na região anterior do núcleo, e torna-se achatada e côncava revestindo a extremidade anterior do núcleo (Figuras 6c-e). Orientada pelos microtúbulos, e acompanhando o alongamento nuclear, a vesícula pró-acrossômica também se alonga e passa a ser denominada vesícula acrossomal (Figura 6f).

A fase final de formação do acrossomo coincide com o final da compactação cromatínica. Nesta fase, a vesícula acrossômica alcança o comprimento médio de 1,2  $\mu\text{m}$ , torna-se mais eletrondensa e é formado o perforatorium, revestido pela vesícula acrossomal, sendo este encaixado em uma pequena cavidade na extremidade anterior do núcleo (Figura 6g).

#### **5.4 FORMAÇÃO DOS DERIVADOS MITOCONDRIAIS**

A formação dos derivados mitocondriais é concomitante com a do axonema e começam nas espermátides iniciais, a partir de mitocôndrias distribuídas homogeneamente pelo citoplasma (Figura 7a). No início da formação dos derivados mitocondriais, as mitocôndrias se agrupam em uma região próxima ao núcleo e ao axonema em formação e começam a se fundirem (Figura 7b), formando duas estruturas enroladas uma na outra em camadas concêntricas, denominada de complexo mitocondrial ou de “Nebenkern”.

Na medida que o comprimento do axonema aumenta, o número de camadas do complexo mitocondrial vai diminuindo e a estrutura como um todo vai tornando-se mais densa e alongada (Figuras 7c-d).

Após a redução total do número de camadas do complexo mitocondrial, as duas estruturas se separam e originam os derivados mitocondriais. Inicialmente, estes se localizam um em cada lado do axonema e apresentam regiões eletrólúcidas. Em corte transversal, são aproximadamente ovais, com diâmetros levemente diferentes e maiores do que o do axonema (Figuras 8a-b). Nesta fase, os microtúbulos da manchete, que orientam todas as alterações morfológicas, são facilmente observados em torno dos derivados mitocondriais (Figura 8c).

Os derivados mitocondriais acompanham o axonema até quase a região terminal do flagelo, entretanto, terminam antes da desorganização do mesmo (Figura 8c).

Ao final da espermiogênese, os dois derivados mitocondriais tornam-se mais eletrondensos e, em corte transversal, bastante desiguais tanto em diâmetro como em forma. O maior apresenta uma leve constrição transversal e com área que ultrapassa duas vezes a do menor, o qual é aproximadamente circular. Os dois corpos acessórios são formados, entre o axonema e cada um dos derivados e os microtúbulos da manchete não são mais observados (Figura 8d).

## 5.5 FORMAÇÃO DO ADJUNTO DO CENTRÍOLO

O adjunto do centríolo é uma das últimas estruturas a iniciar a sua formação. As espermatídes, já com axonema e complexo mitocondrial, ainda não possuem o adjunto do centríolo (Figura 9a). Com a separação dos complexos mitocondriais e conseqüente formação dos derivados mitocondriais, observa-se o início da formação do adjunto do centríolo. Ocorre então acúmulo de material granuloso no local de implantação do axonema no núcleo (Figura 8b). Em seguida, o acúmulo deste material se estende até os derivados mitocondriais, ocorrendo um depósito do mesmo entre os derivados mitocondriais e em volta do axonema (Figura 9b). Posteriormente, ocorre agregação do material granuloso, que se encontrava disperso, na região onde irá se formar o adjunto do centríolo (Figura 9c). Finalmente, ocorre compactação do material granuloso, formando uma estrutura eletrônica densa, que reveste a região de transição núcleo-flagelo; nesta fase o núcleo ainda não está totalmente compactado (Figura 9d). No final da espermiogênese, com núcleo já totalmente compactado, não são observadas diferenças no adjunto do centríolo, desta fase com a anterior (Figura 9e).

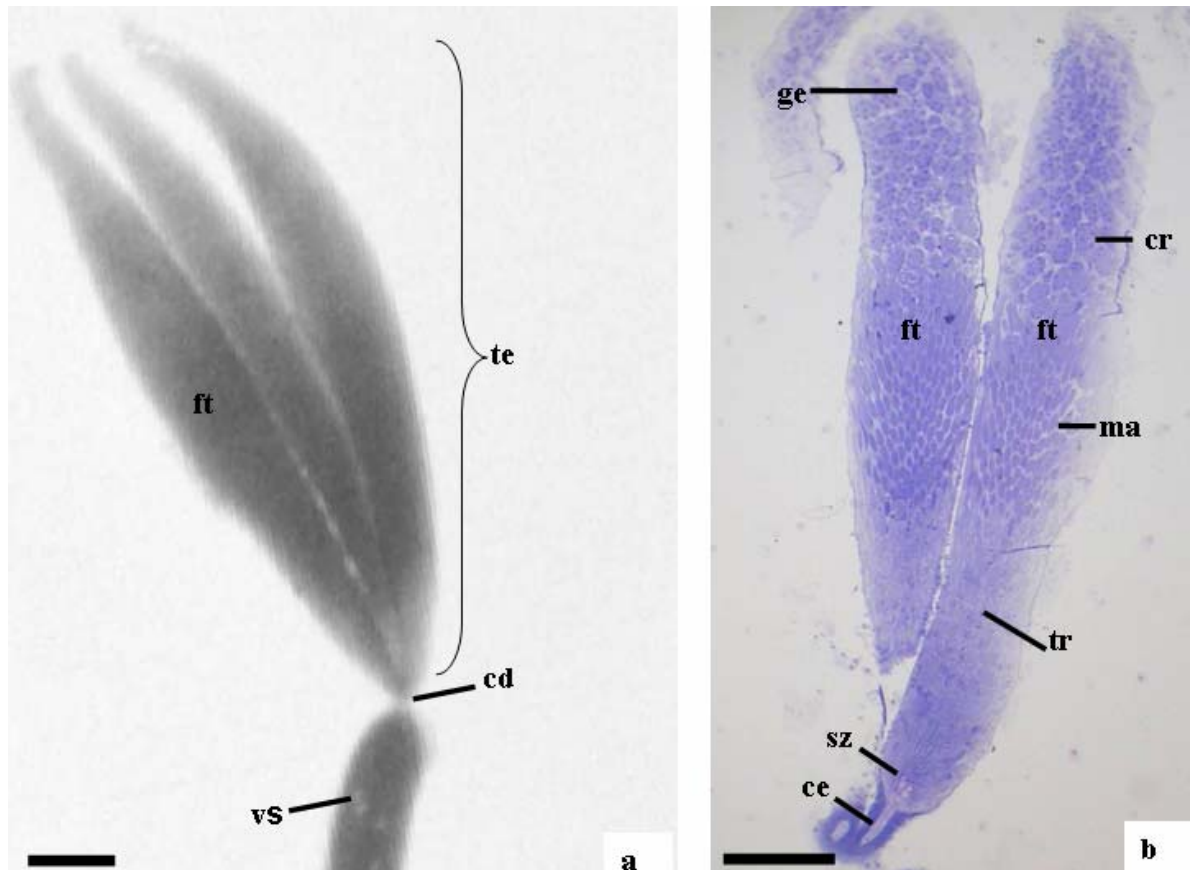
## 5.6 FORMAÇÃO DO AXONEMA

O axonema inicia sua formação nos estádios iniciais da espermiogênese e origina-se na região posterior ao núcleo, a partir do centríolo, na fase em que a espermatíde está formando os complexos mitocondriais (Figura 10a). Em fase posterior, já com os derivados mitocondriais separados, observa-se uma depressão no núcleo, a qual é ocupada pelo centríolo que originou o axonema (Figura 10b).

O padrão de organização do axonema em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é de um par de microtúbulos centrais, nove pares de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (9+9+2). Os microtúbulos acessórios e centrais apresentam acúmulo de material eletrônico denso em seu interior (Figuras 10c-d).

## 5.7 COMPARAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE NOS DOIS TIPOS DE ESPERMATOZÓIDES PRODUZIDOS POR *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*

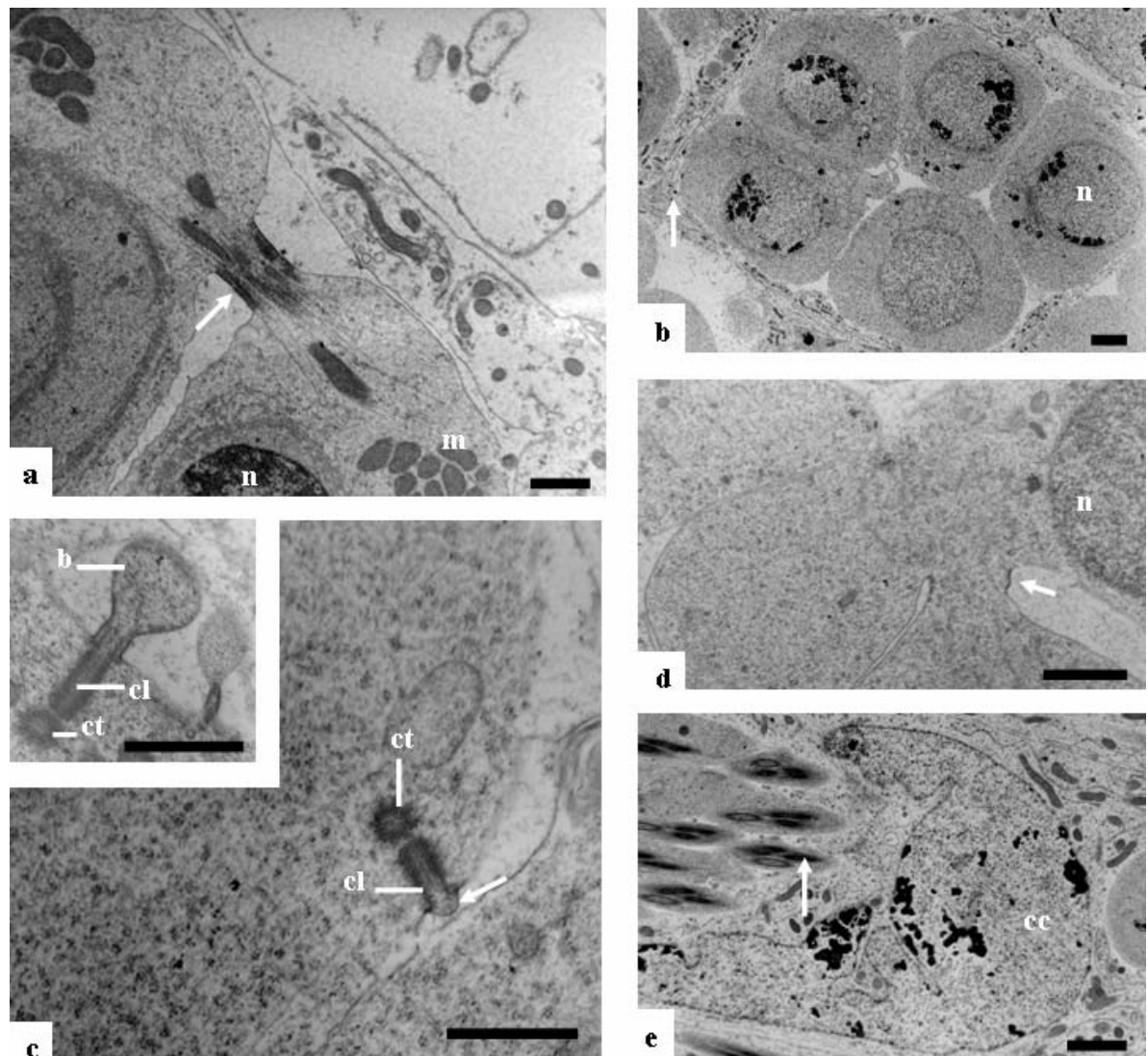
Durante o processo espermatogênico não foi possível observar detalhes que distinguíssem cada um dos dois tipos de espermatozóides (Figuras 11a-b), exceto no final do processo, quando foram facilmente distinguidos. Quando o cisto é seccionado transversalmente na região dos núcleos, se observam espermatozóides de núcleo de diâmetro menor e maior (Figuras 11c-d) que apresentam, respectivamente, núcleos longo e curto.



**Figura 1** – Microscopia de luz do aparelho reprodutor masculino de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*.

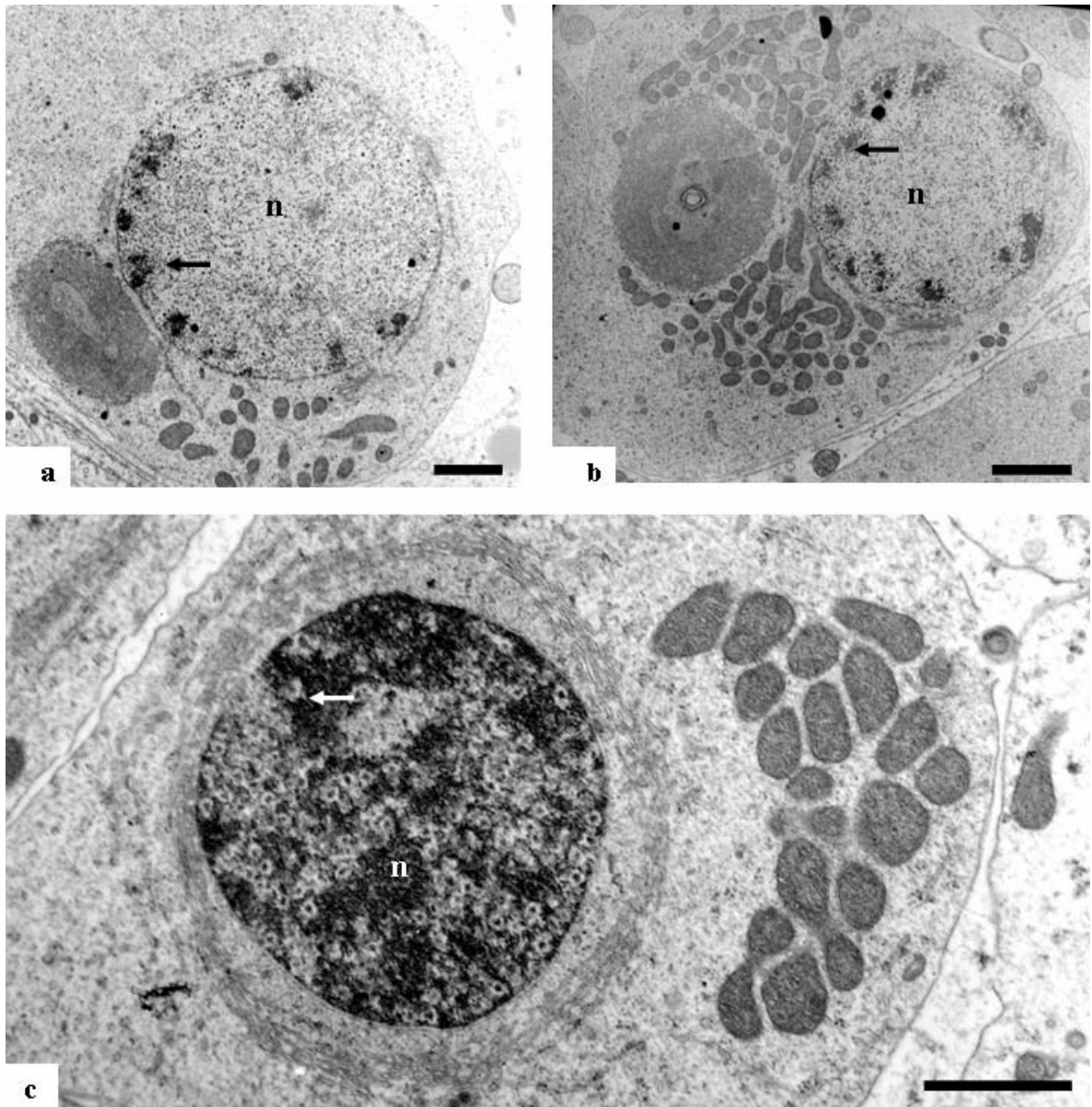
**a.** Montagem total do aparelho reprodutor de *Trypoxylon lactitarse*. folículos testiculares (ft); testículo (te); canal deferente (cd); vesícula seminal (vs). Barra = 50 µm.

**b.** Fotomicrografia de luz dos folículos testiculares (ft) em corte longitudinal. Canal eferente (ce); germário (ge); Zona de crescimento (cr); Zona de maturação (ma); Zona de transformação (tr) e região com espermatozoides (sz). Barra = 50 µm.



**Figura 2.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão, ressaltando fases da espermatogênese.

- a.** Final de uma citocinese. Observar a ponte citoplasmática (seta), mitocôndrias no citoplasma (m) e núcleo celular. Barra = 1  $\mu$ m.
- b.** Cisto contendo 5 espermatogônias. Núcleo (n); seta indicando o limite do cisto. Barra = 3  $\mu$ m.
- c.** Início da meiose abortiva, com posicionamento dos centríolos próximos à membrana, visto em corte longitudinal (cl); centríolo que permanece na espermatíde em corte transversal (ct); início do brotamento (seta). No Detalhe final da formação do broto (b), com D – barra = 1  $\mu$ m; detalhe – barra = 0,5  $\mu$ m.
- d.** Pontes citoplasmáticas entre espermatídes jovens, seta indicando citocinese incompleta; núcleo (n). Barra = 1  $\mu$ m.
- e.** Flagelos de espermatozóides diferenciados (seta), com as cabeças imbricadas no citoplasma das células císticas. Núcleo da célula cística (cc). Barra = 2  $\mu$ m.

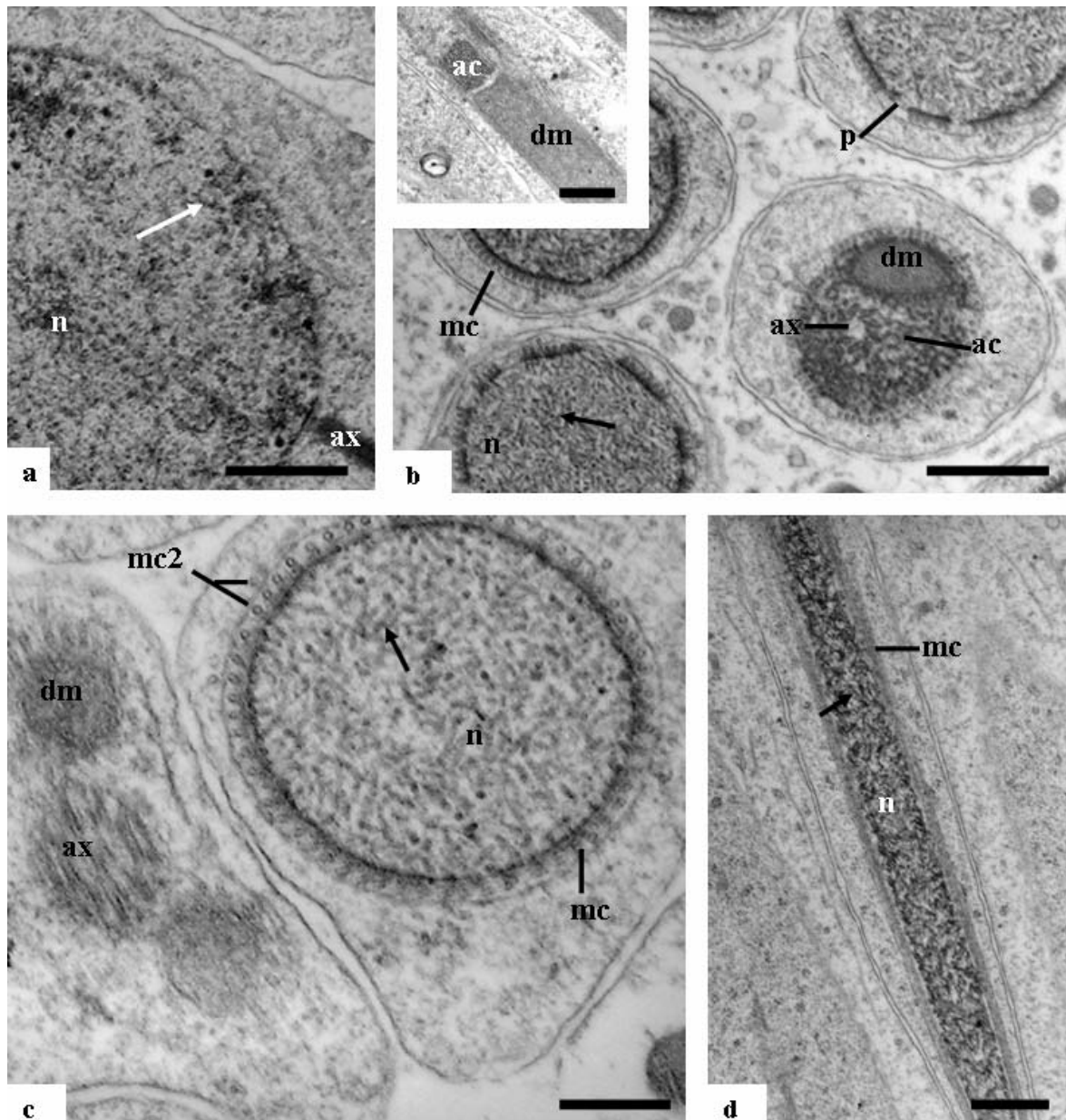


**Figura 3.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão em cortes transversais de espermatócitos, observando-se o aumento do grau de compactação da cromatina.

**a.** Cromatina compacta de forma heterogênea restrita à periferia do núcleo. Núcleo (n); cromatina (seta). Barra = 2  $\mu\text{m}$ .

**b.** Compactação da cromatina, ainda restrita à periferia, porém de forma homogênea. Núcleo (n); cromatina (seta). Barra = 2  $\mu\text{m}$ .

**c.** Cromatina condensada de forma homogênea por todo núcleo. Núcleo (n); cromatina (seta). Barra = 1  $\mu\text{m}$ .



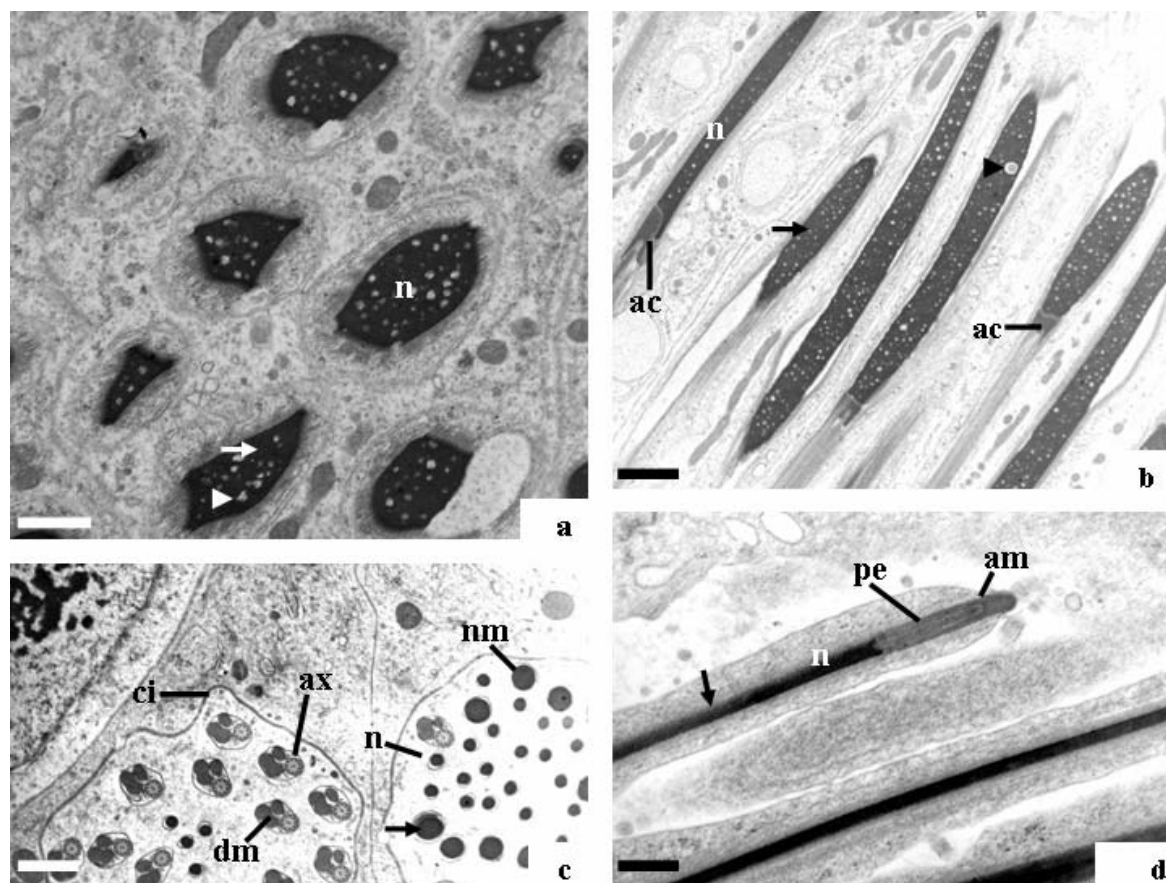
**Figura 4.** Fotomicrografias eletrônica de transmissão de espermatídes em fases iniciais da compactação da cromatina.

**a.** Corte longitudinal de espermatíde jovem, com núcleo ainda arredondado, começando a compactação da cromatina e axonema iniciando a formação. Núcleo (n), axonema (ax). Cromatina condensando (seta). Barra = 1  $\mu$ m.

**b.** Corte transversal de espermatíde em estágio mais avançado que da figura anterior. No detalhe espermatíde em corte longitudinal em fase igual a b. Núcleo (n) alongando, cromatina condensada de forma filamentosa (seta); microtúbulos de manchete em torno do núcleo (mc); poro nuclear (p); derivado mitocondrial (dm); axonema (ax); adjunto do centríolo em formação (ac). Barra = 0,6  $\mu$ m.

**c.** Corte transversal de espermatíde em estágio mais avançado que o da anterior. Núcleo (n); cromatina filamentosa (seta); microtúbulos de manchete (mc) com algumas regiões em duas camadas (mc2); derivado mitocondrial (dm); axonema (ax). Barra = 0,3  $\mu$ m.

**d.** Corte longitudinal do núcleo de espermatíde em estágio igual ao da figura anterior. Núcleo (n); microtúbulos de manchete (mc); cromatina filamentosa (seta). Barra = 0,5  $\mu$ m.<sup>3</sup>



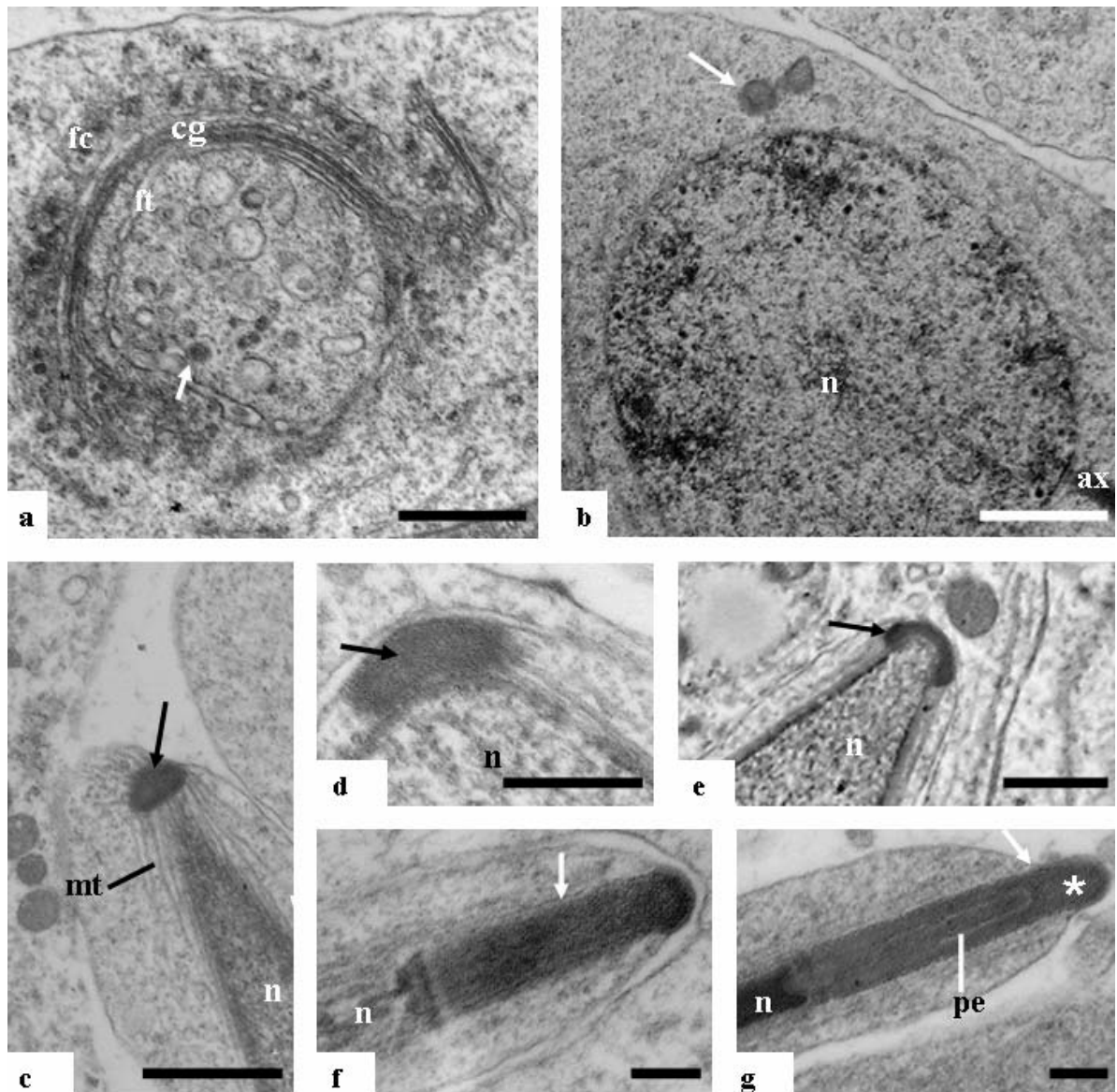
**Figura 5.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão dos estádios finais da compactação nuclear.

**a.** Núcleos de espermatídes em estádios finais da espermiogênese, cortados obliquamente. Núcleo (n); cromatina compactada (seta); regiões nucleoplasmáticas elétrons lúcidas (cabeça da seta). Barra = 1  $\mu$ m.

**b.** Corte longitudinal de espermatíde no mesmo estágio que a anterior. Observar núcleo (n); cromatina compactada (seta); regiões nucleoplasmáticas elétrons lúcidas (cabeça da seta); adjuntos do centríolo (ac). Barra = 1  $\mu$ m.

**c.** Corte transversal de cisto com espermatozóides diferenciados. Observar cisto (ci); núcleo do espermatozóide de diâmetro maior (nm); núcleo do espermatozóide de diâmetro menor (n); cromatina altamente compactada (seta); derivados mitocondriais (dm); axonema (ax). Barra = 1  $\mu$ m.

**d.** Corte longitudinal de espermatozóides diferenciados. Observar núcleo (n); cromatina altamente compactada (seta); acrossomo (am); perforatorium (pe). Barra = ,05  $\mu$ m.



**Figura 6.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão mostrando a seqüência das fases de formação do acrossomo.

**a.** Corte transversal do complexo de Golgi de espermátide jovem. Complexo de Golgi (cg); face cis (fc); face trans (ft); vesículas (seta). Barra = 0,5  $\mu$ m.

**b.** Corte longitudinal de espermátide em estágio mais avançado que a anterior. Observa-se a vesícula pró-acrossômica (seta); axonema (ax); núcleo (n). Barra = 1  $\mu$ m.

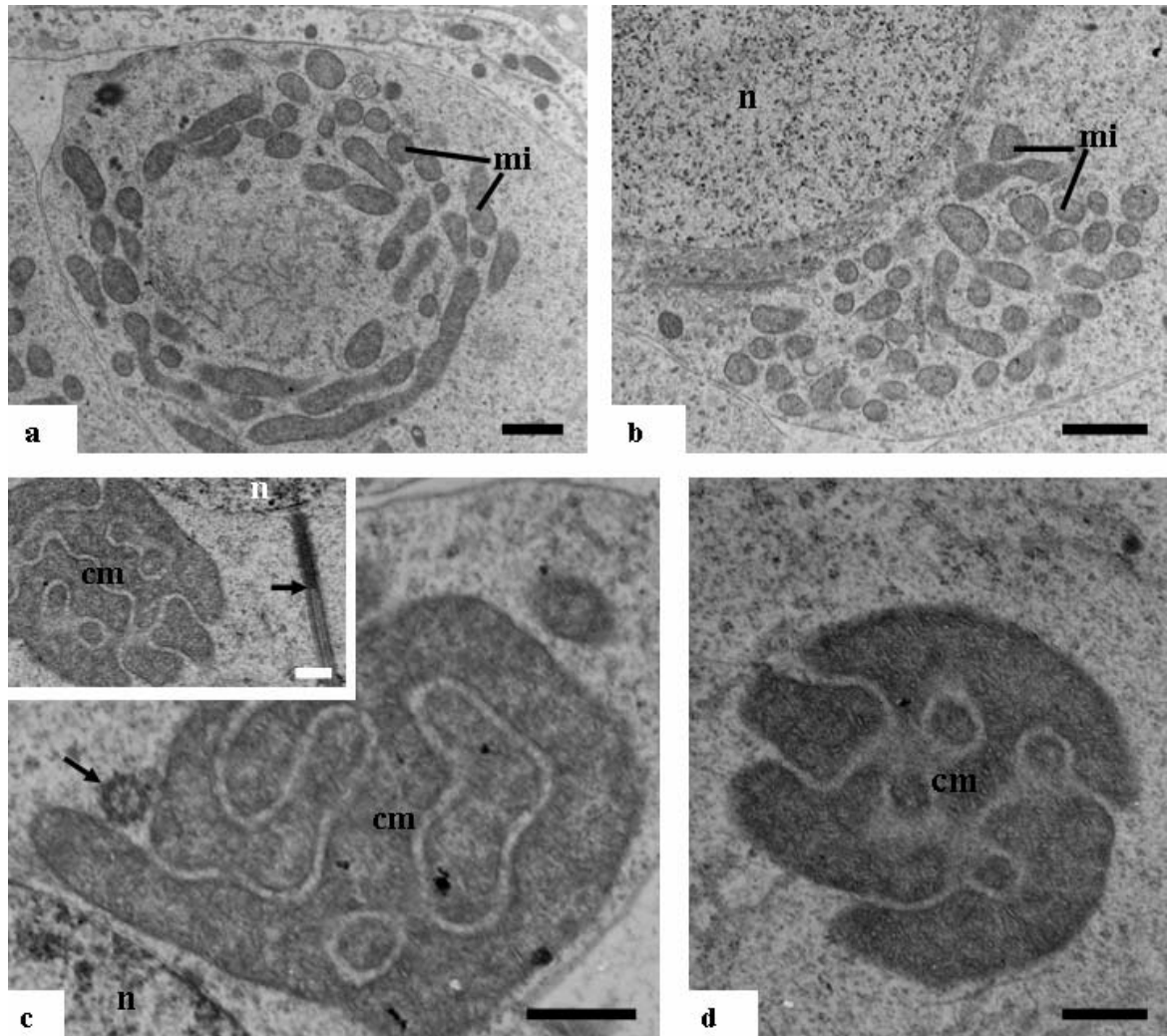
**c.** Corte longitudinal da espermátide. Vesícula pró-acrossômica (seta); microtúbulos (mt); núcleo (n). Barra = 1  $\mu$ m.

**d.** Corte longitudinal de espermátide destacando a vesícula pró-acrossômica (seta) assumindo a forma de calota na região anterior ao núcleo (n). Barra = 0,5  $\mu$ m.

**e.** Corte longitudinal de espermátide em estágio mais avançado que o anterior. Observar vesícula pró-acrossômica (seta); núcleo (n). Barra = 1  $\mu$ m.

**f.** Corte longitudinal de espermátide, destacando o acrossomo em estágio avançado de formação. Observa-se acrossomo (seta); núcleo (n). Barra = 0,2  $\mu$ m.

**g.** Corte longitudinal de espermátide em estágio final de diferenciação. Perforatorium (pe), retração do citoplasma (seta) e vesícula acrossomal (asterisco) formados; núcleo (n). Barra = 0,2  $\mu$ m.



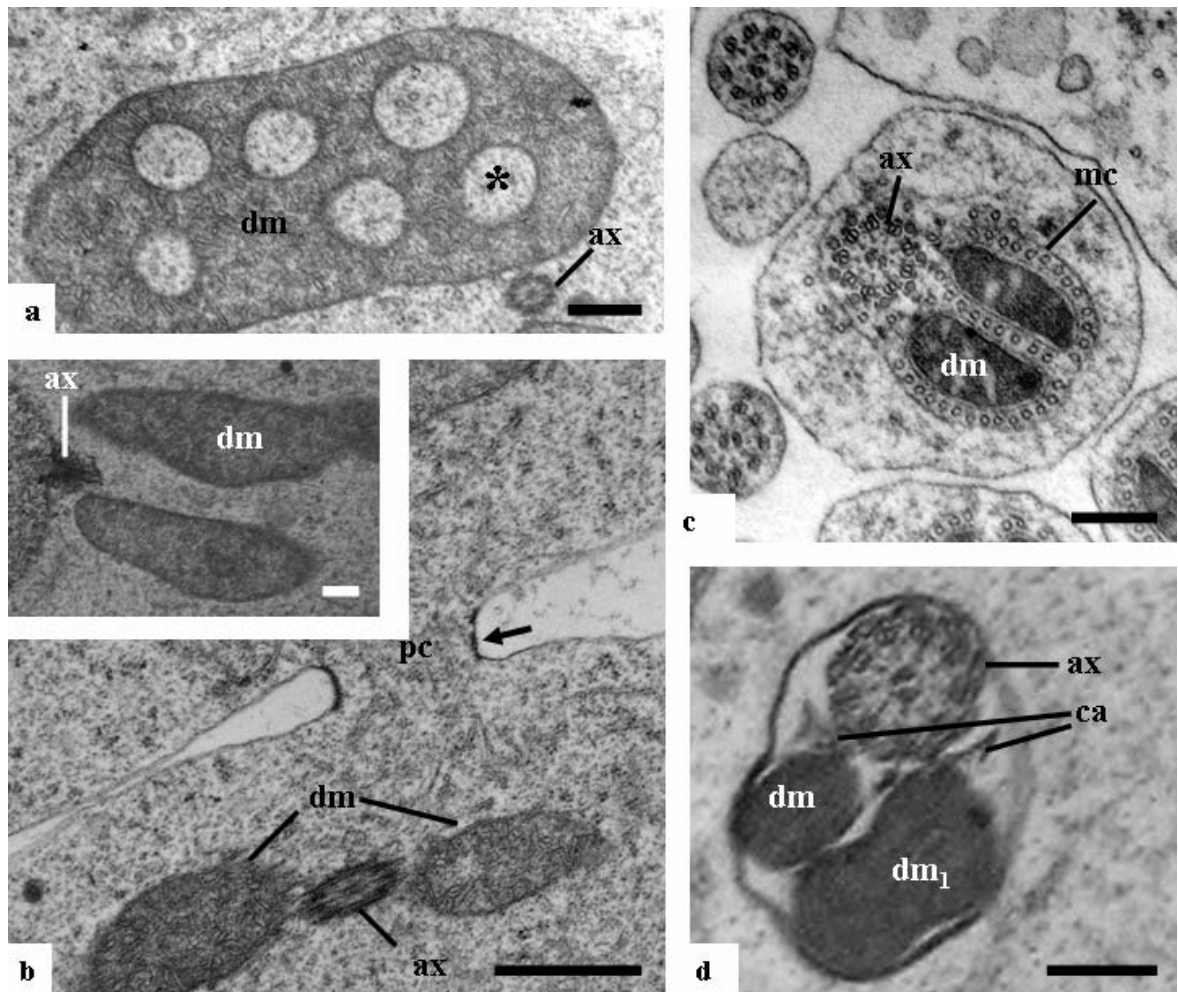
**Figura 7.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão dos estádios iniciais da formação do derivado mitocondrial, com formação primeiro do complexo mitocondrial.

**a.** Corte tangencial ao núcleo de uma espermatíde jovem. Mitocôndrias (mi) distribuídas homogeneamente pelo citoplasma. Barra = 1  $\mu\text{m}$ .

**b.** Corte transversal de uma espermatíde jovem com as mitocôndrias (mi) agrupando-se em uma região do citoplasma. Núcleo (n). Barra = 1  $\mu\text{m}$ .

**c.** Corte transversal de um complexo mitocondrial ou "Nebenkern". No detalhe, corte longitudinal do complexo mitocondrial. Complexo mitocondrial (cm); Axonema (seta). C - Barra = 0,5  $\mu\text{m}$ ; detalhe = Barra = 0,5  $\mu\text{m}$ .

**d.** Corte transversal de um complexo mitocondrial em estágio mais avançado ao anterior. Complexo mitocondrial (cm). Barra = 0,5  $\mu\text{m}$ .



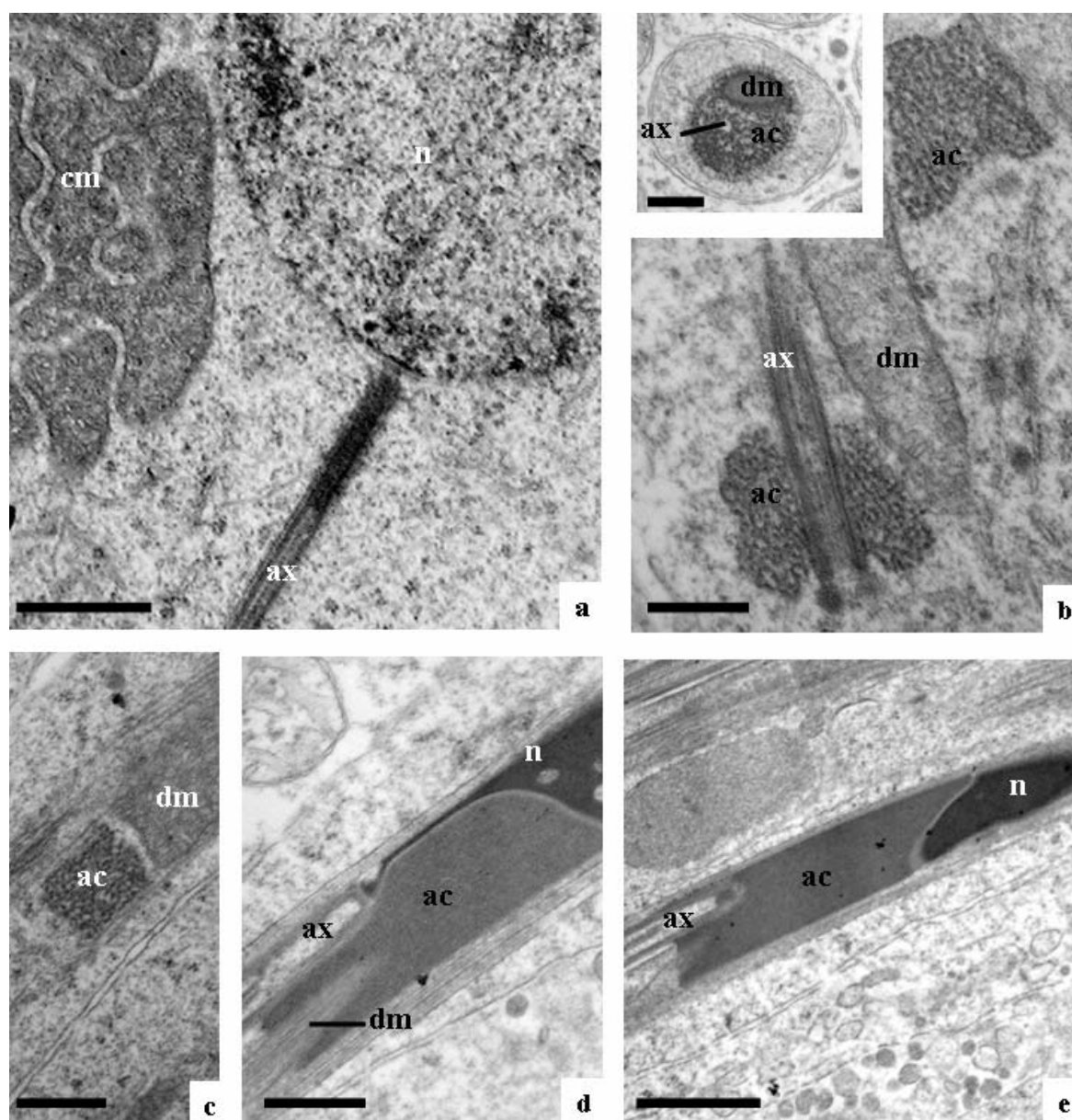
**Prancha 8.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão dos estádios finais da formação dos derivados mitocondriais

**a.** Corte transversal de um derivado mitocondrial. Derivado mitocondrial (dm); axonema (ax); região elétron transparente (asterisco). Barra = 0,4  $\mu$ m.

**b.** Corte transversal do flagelo de duas espermatídes ainda unidas por ponte citoplasmática. No detalhe corte longitudinal do flagelo. Derivado mitocondrial (dm); axonema (ax); ponte citoplasmática (pc); anel contráctil (seta). núcleo (n). B - barra = 1  $\mu$ m. ; detalhe - Barra = 0,4  $\mu$ m.

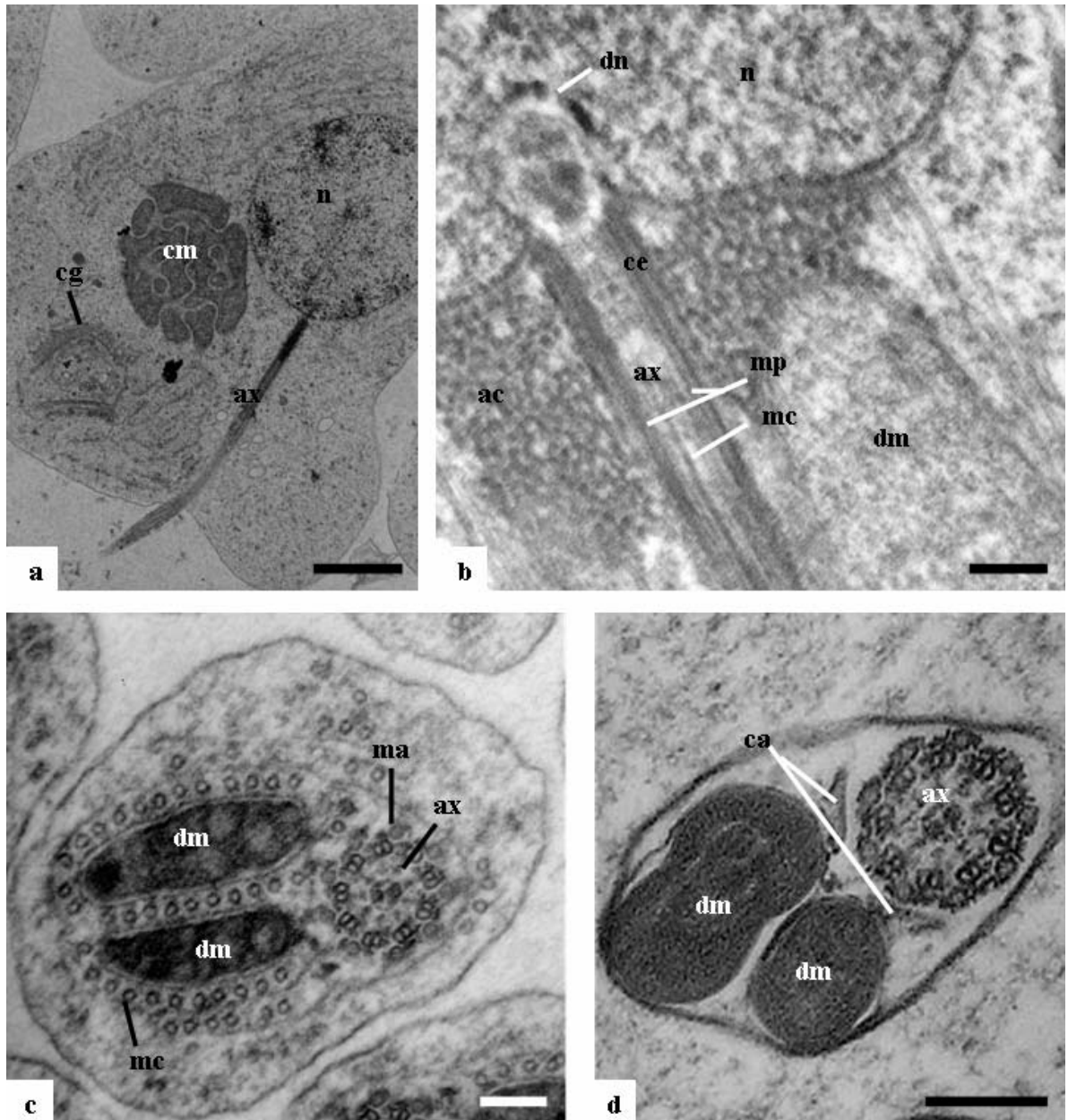
**c.** Corte transversal do flagelo. Derivado mitocondrial (dm); axonema (ax); microtúbulos de manchete (mc). Barra = 0,2  $\mu$ m.

**d.** Corte transversal do flagelo de um espermatozóide diferenciado. Derivado mitocondrial esférico (dm); derivado mitocondrial em forma de "oito" (dm<sub>1</sub>); axonema (ax); corpos acessórios (ca). Barra = 0,2  $\mu$ m.



**Figura 9.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão dos estádios de formação do adjunto do centríolo.

- a. Corte longitudinal da espermatíde. Axonema (ax) e complexo mitocondrial (cm) já estão presentes e o adjunto do centríolo ainda não iniciou a sua formação. Núcleo (n). Barra = 1  $\mu$ m.
- b. Corte longitudinal do flagelo. No detalhe, a mesma região em corte transversal. Adjunto do centríolo (ac); derivado mitocondrial (dm); axonema (ax). B - barra = 1  $\mu$ m; detalhe - barra = 0,5  $\mu$ m.
- c. Corte longitudinal de espermatíde alongada. Derivado mitocondrial (dm) e adjunto do centríolo (ac) mais eletrondenso que na fase anterior. Barra = 0,5  $\mu$ m.
- d. Corte longitudinal da espermatíde em estágio avançado. Núcleo compactado com algumas regiões elétrons-transparentes; adjunto do centríolo (ac); derivado mitocondrial (dm); axonema (ax). Barra = 0,5  $\mu$ m.
- e. Corte longitudinal de espermatozóide diferenciado. Núcleo altamente compactado (n); adjunto do centríolo (ac); axonema (ax). Barra = 1  $\mu$ m.



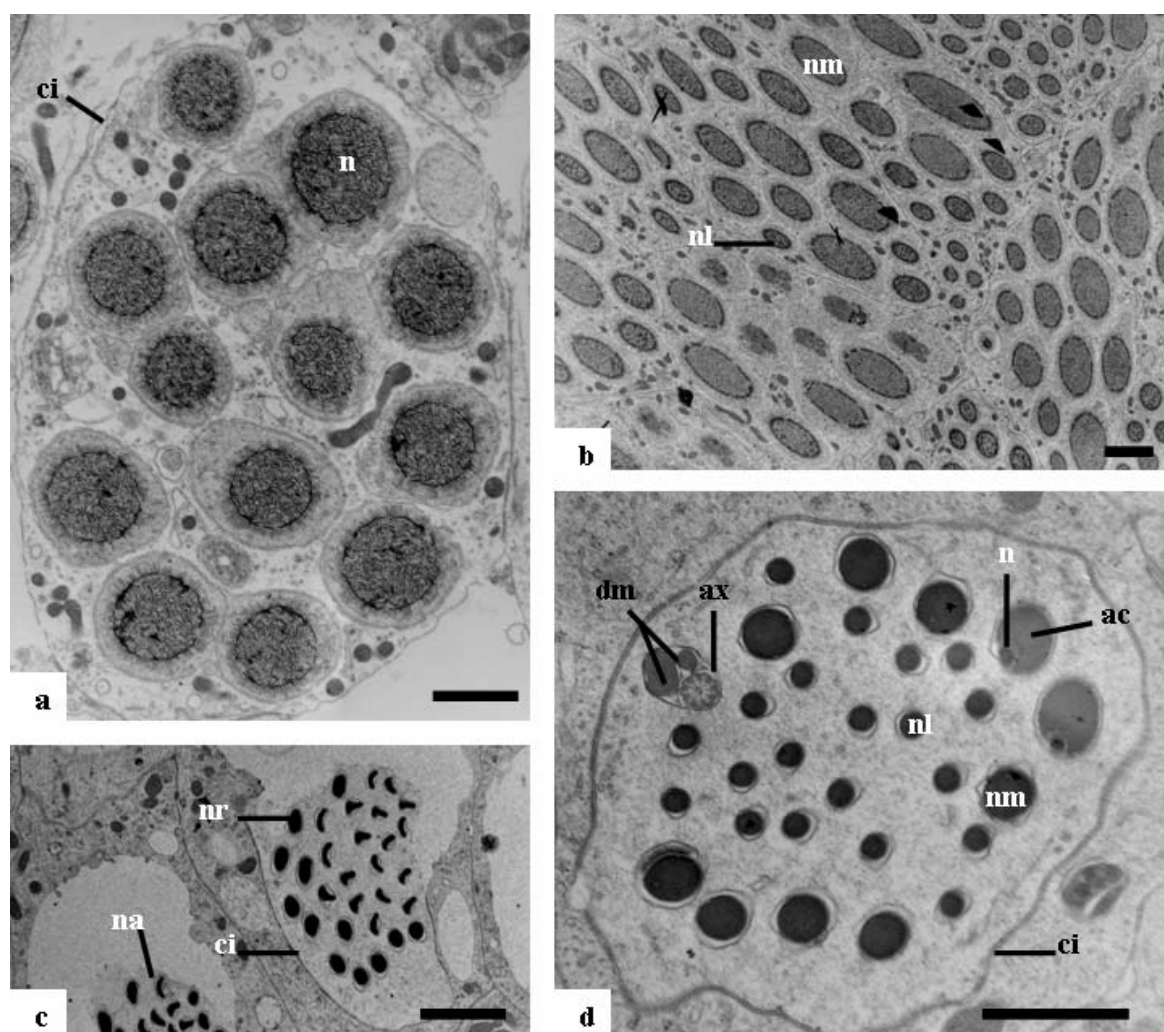
**Figura 10.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão evidenciando a formação do axonema.

**a.** Corte longitudinal da espermátide em fases iniciais da formação do axonema. Complexo mitocondrial (cm); núcleo (n); complexo de golgi (cg) e axonema (ax). Barra = 2  $\mu$ m.

**b.** Corte longitudinal do início da formação do axonema, mostrando a implantação do centríolo (ce) em uma depressão do núcleo (dn). Axonema (ax); núcleo (n); derivado mitocondrial (dm); adjunto do centríolo (ac); microtúbulos periféricos (mp) e centrais (mc). Barra = 0,2  $\mu$ m.

**c.** Corte transversal da espermátide em estágio de formação do axonema mais avançado que o anterior. Axonema (ax); derivado mitocondrial (dm); microtúbulos de manchete (mc) e microtúbulos acessórios (ma). Barra = 0,2  $\mu$ m.

**d.** Corte transversal do axonema de um espermatozóide diferenciado. Corpos acessórios (ca); axonema (ax) e derivados mitocondriais (dm). Barra = 0,2  $\mu$ m.



**Figura 11.** Fotomicrografias eletrônicas de transmissão de cistos em diferentes estádios.

**a.** Corte transversal de cisto com espermátide alongando. Núcleo (n); e limite do cisto (ci). Barra = 1  $\mu$ m.

**b.** Corte oblíquo de região com mais de um cisto. Núcleo de diâmetro menor (nl); núcleo de diâmetro maior (nm). Barra = 2  $\mu$ m.

**c.** Espermatozoides diferenciados imbricados na célula cística. Núcleo redondo (nr); núcleo achatado (na); limite de um cisto (ci). Barra = 2  $\mu$ m.

**d.** Cisto com os 2 tipos de espermatozoides. Limite do cisto (ci); núcleo (n); núcleo de diâmetro menor (nl); núcleo de diâmetro maior (nm); adjunto do centríolo na região de transição núcleo-flagelo (ac); axonema (ax); e derivados mitocondriais (dm). Barra = 1  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

O aparelho reprodutor de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é semelhante ao observado na maioria dos insetos (Chapmann, 1998). As citocineses são parecidas ao observado para outros insetos, como por exemplo, em *Drosophila melanogaster* (Baccetti & Bairati, 1964), com uma meiose abortiva, análoga a *Scaptotrigona postica*, onde há eliminação de centríolo na meiose I, sendo a meiose II de forma convencional (Cruz-Landim *et al.*, 1981). As espermátides jovens de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* são semelhantes às observadas em abelhas (Cruz-Landim, 2004) e no Coleoptera *C. sordidus* (Lino-Neto, 1993).

A compactação da cromatina em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é similar ao escrito para outros insetos (Baccetti, 1972; Cruz-Landim, 2004), mas diferem daquelas vistas em *C. sordidus*, que tem a formação de cordões espessos, formados pela associação da cromatina filamentosa, processo esse que ocorre antes da compactação final (Lino-Neto, 1993). O processo de alongamento do núcleo parece acontecer por atuação de microtúbulos (Kessel, 1996, 1967; Wilkinson *et al.*, 1974, Apud Báó, 1987) e a forma de compactação do núcleo pode ser determinada por um padrão específico de associação do DNA e proteínas durante a condensação da cromatina (Fawcett *et al.*, 1971). Para nós, os microtúbulos são determinantes em ambos os processos.

O processo de formação do acrossomo tem origem semelhante ao descrito para outros insetos (Kaye, 1962; Clayton *et al.*, 1958; Ito, 1960; Lino-Neto, 1993) e após o término da formação do mesmo, ele é similar a outros Hymenoptera que têm o acrossomo formado por duas estruturas (Wheeler *et al.*, 1990; Jamieson *et al.*, 1999; Newman & Quicke, 1999a), já nos Hymenoptera Chalcidoidea (Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000a; Lino-Neto & Dolder, 2001b), Cynipoidea (Quicke *et al.*, 1992; Newman & Quicke, 1999b), Ichneumoidea (Quicke *et al.*, 1992) e Bethyloidea (Quicke *et al.*, 1992) há uma estrutura extracelular que reveste todo o complexo acrossomal.

Os derivados mitocondriais têm origem similar ao observado para outros insetos (Baccetti *et al.*, 1969; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980; Lino-Neto, 1993). A formação dos complexos mitocondriais é semelhante a *C. sordidus* que possui duas estruturas mitocondriais (Lino-Neto, 1993) e difere de *M. histroônica* que possui apenas

uma estrutura mitocondrial (Pratt, 1970). À medida que o axonema alonga, os derivados mitocondriais também alongam, sendo este processo semelhante ao descrito para outros insetos (Baccetti *et al.*, 1969; Cruz-Landim & Silva de Moraes, 1980; Lino-Neto, 1993). A hipótese proposta para diferenciação do complexo mitocondrial em derivado mitocondrial foi formulada em estudo feito com *M. histrionica*, onde a diferenciação se dá através de quebras, retrações e fusões entre os vários segmentos mitocondriais, a partir dos mais externos. Em consequência temos a diminuição do número de segmento até a formação dos dois derivados mitocondriais (Pratt, 1970). Acreditamos que em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*, como a diferenciação do complexo mitocondrial em derivado mitocondrial coincide com o alongamento do axonema, esse alongamento do complexo mitocondrial leve à diminuição do número de camadas, até a separação do complexo mitocondrial e formação dos dois derivados mitocondriais, sendo o processo orientado por microtúbulos, como ocorre em *C. sordidus* (Lino-Neto, 1993).

A formação do adjunto do centríolo é parecida aos Diptera *C. capitata* (Báo, 1987), *C. megacephala* (Messias Jr., 1990) e em várias outras espécies (Brelund *et al.*, 1966). Tem início tardio, onde forma-se um material eletrôn denso finamente granular em torno do centríolo e, posteriormente ocorre a compactação deste. Acreditamos que a função do adjunto do centríolo é manter o flagelo junto ao núcleo, o que foi proposto também para outros insetos (Gatenby & Tahmisian, 1959 e Gatenby, 1961 apud Baccetti, 1972).

O axonema de *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* apresenta a organização clássica descrita para a maioria dos insetos (9+9+2) (Baccetti, 1972; Báo, 1987; Messias Jr., 1990; Lino-Neto, 1993). A sequência dos eventos na formação do axonema, em princípio, não difere daquela descrita para a maioria dos insetos. No início o axonema possui um par de microtúbulos centrais, nove pares de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios, sendo a formação destes posterior àquela dos demais microtúbulos e se forma a partir de um dos dois microtúbulos da dupla. Em seguida ocorre acúmulo de material eletrôn denso nos nove microtúbulos acessórios e nos dois microtúbulos centrais (Phillips, 1970; Baccetti, 1972; Báo, 1987; Messias Jr., 1990).

Foi possível observar que, apesar de haver dimorfismo nos espermatozoides produzidos por *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*, um com núcleo de diâmetro menor e outro maior, o mesmo não foi observado no processo espermatogênico. Apesar das células de um cisto serem clones, e o processo ser morfologicamente igual, formam-se 2 tipos de

espermatozóides. O dimorfismo em outros insetos ocorre, principalmente, no comprimento do flagelo (Beatty & Burgoyne, 1971; Kurokawa *et al.*, 1974; Takamori & Kurokawa, 1986; Hihara & Kurokawa, 1987; Bressac *et al.*, 1991; Pasini *et al.*, 1996), na presença (eupirene) ou ausência (apirene) de núcleo, como ocorre em Lepidoptera (Meves, 1903) e no comprimento do núcleo, como é observado em Hemiptera (Kato, 1956).

## 7. CONCLUSÕES

1. O processo espermatogênico em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é semelhante ao descrito para outros insetos, em particular com os Hymenoptera.
2. A meiose em *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* é do tipo abortiva, com eliminação de um dos centríolos do par que o espermátócito possui, processo semelhante é visto para a maioria dos Hymenoptera.
3. Não foram observadas diferenças no processo espermatogênico dos dois tipos de espermatozóides produzidos por *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*.
4. A compactação nuclear na espermiogênese começa de forma granulosa restrita à periferia do núcleo, passando para todo o núcleo; em seguida a compactação da cromatina torna-se filamentosa e por fim totalmente compactada. Acreditamos que o processo de alongamento nuclear seja desempenhado pelos microtúbulos de manchete e pelo mecanismo de compactação da cromatina. Não foram observadas diferenças na compactação nuclear dos espermatozóides de núcleo longo e delgado para os espermatozóides de núcleo curto espesso.
5. O acrossomo tem o início de sua formação ainda na espermátide jovem, a partir do complexo de Golgi. Inicialmente vesículas brotam da face trans do complexo de Golgi, e migram para a região anterior ao núcleo, ocorre fusão das mesmas e formação da vesícula pró-acrossômica, esta assume forma de calota e origina o acrossomo.
6. Na espermátide jovem, as mitocôndrias agregam-se em uma região do citoplasma, fundem-se e formam o complexo de mitocondrial ou de “Nebenkern”, que é uma estrutura formada de camadas de mitocôndrias fundidas e enroladas sobre si mesmas. Logo em seguida, por ação mecânica do alongamento do axonema, o número de camadas diminui e ocorre separação, originando os derivados

mitocondriais, que inicialmente são simétricos e em fase final de espermiogênese assimétricos, um esférico e o outro com constrição central.

7. O adjunto do centríolo é uma das últimas estruturas a se formar, inicialmente ele tem um aspecto eletronicamente denso de granulação fina, ocorrendo compactação do mesmo em fases subsequentes.
8. O axonema tem origem a partir do único centríolo presente na espermatíde, apresentando o padrão clássico de 9+9+2, descrito para a maioria dos insetos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarante, S. T. P (1991). Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae). Tese de mestrado, USP/SP.
- Baccetti, B. & Bairati, A. (1964). Indagini sull'ultrastruttura delle cele germinali maschili in *Dacus cleae* Geml. E. in *Drosophila melanogaster* Meig (Diptera). Redia, 49: 1-29.
- Baccetti, B. (1972). Insect Sperm Cell. Adv. Insect. Physiol., 9: 315-397.
- Baccetti, B.; Dallai, R. & Gursti, F. (1969). The spermatozoa of arthropoda. VI. Ephemeroptera. J. Ultrastruct. Res., 29: 343-351.
- Baccetti, B.; Dallai, R. & Rosati, F (1969). The spermatozoon of Arthropoda III. The lowest holometabolic insects. J. Microsc., v.8, p.233-248.
- Bairati, A. & Perotti, M. E. (1970). Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: Baccetti, B. (ed.) Comparative Spermatology. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei. p 333-345.
- Báo, S. N. (1987). Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante “olho-róseo” comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Tese de mestrado, UNICAMP/SP.
- Beams, H. W.; Tahmisian, T. N.; Devine, R. L. & Anderson, E. (1956). Electron microscope studies on the dictyosomes and acroblasts in the male germ cells of the cricket. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2 (Suppl): 123-130.
- Beatty, R.A. & Burgoyne, P.S. (1971) Size classes of the head and flagellum of *Drosophila* spermatozoa. Cytogenetics, 10: 177-189.
- Brelland, O. P.; Gassner, G.; Riess, W. R. & Bieseke, J. J. (1966). Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. Can. J. Genet. Cytol., 8: 759-781.
- Bressac, C.; Joly, D.; Devaux, J.; Serres, C.; Feneux, D. & Lachaise, D. (1991). Comparative kinetics of short and long sperm in sperm dimorphic *Drosophila* species. Cell Motil. Cytoskel., 19: 269-274.
- Brockmann, H. J. (1992). Male behavior, courtship and nestin in *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). J. Kansas Entomol. Soc., 65: 66-84.

- Cameron, S. A. (1993). Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8687-8691.
- Chapman, R. F. (1998). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Clayton, B.P.; Deutsch, K. & Jordan-Luke, B. M. (1958). The spermatid of the house-cricket, *Acheta domesticus*. *J. Microsc. Sci.*, 99: 15-23
- Comings, D. E. & Okada, T. A. (1972). The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastruct. Res.*, 39: 15 – 23.
- Coville, R. E. & Coville, P. L. (1980). Nesting biology and male behavior of *Trypargilum tecnocitlan* in Costa Rica (Hymenoptera: Sphecidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 73: 110-119.
- Crespi, B. J. & Yanega, D. (1995). The definition of eusociality. *Behav. Ecol.*, 6: 109-115.
- Cross, E. A.; Stith, M. G. & Bauman, T. R. (1975). Bionomics of the organ-pipe mud dauber, *Trypoxylon politum* (Hymenoptera: Sphecidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68: 901-915.
- Cruz-Höfling, M. A., Cruz-Landim, C. & Kitajimma, E. W. (1970). The fine structure of spermatozoa from the honeybee. *Am. Acad. Bras. Cienc.*, 42: 69-78.
- Cruz-Landim (2004). *Biologia do desenvolvimento em abelhas*. [www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina.html](http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina.html).
- Cruz-Landim C.; Beig, D. & Silva De Moraes, R. L. M. (1980). Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, 33: 1-15.
- Cruz-Landim, C. (1979). Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Myogrillus sop.* (Orthoptera, Grillidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 39: 783-791.
- Cruz-Landim, C. & Beig, D. (1980a). An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Inver. Rep. Dev.*, 2: 271-283.
- Cruz-Landim, C. & Beig, D. (1980b). Meiose nos Hymenoptera. *Ciência e Cultura*, 3: 937-966.

- Cruz-Landim, C. & Siva de Moraes, R. L. M. (1980). Observations on the mitochondria complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Meipona quadrifasciata anthidioides* Lep. Cytobios, 27: 167-175.
- Cruz-Landim, C.; Silva de Moraes, R. L. M. & Beig, D. (1981). Caracterização de material eletrondenso de origem nuclear, durante a espermiogênese de abelhas (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Biol., 41, 2, p.421-426.
- Dowton, M. & Austin, A. D. (1994). Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera : Apocriten relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91: 9911-9915.
- Dowton, M.; Austin, A. D.; Dillon, N. & Bartowsky, E. (1997). Molecular phylogeny of the apocritan wasps: the Proctotrupomorpha and Evanomorpha. Syst. Entomol., 22: 245-255.
- Evans, H. E. & West-Eberhard M. J. (1970). The Wasps. University of Michigan. Press, Ann Arbor.
- Fawcett, D. W.; Anderson, W. A. & Phillips, D. M. (1971). Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Develop. Biol., 26: 220-251.
- Fawcett, D.W. & Phillips, D.M. (1970). Recent observations on the ultrastructure and development of the mammalian spermatozoon. In: B. Baccetti, (Ed.) Comparative spermatology. Academic Press, New York, p.13-28.
- Fuge, H. (1976). Ultrastructure of cytoplasmic nucleolus-like bodies and nuclear RNP particles in late prophase of Tipulid spermatocytes. Chromosoma, 56: 363-379.
- Gallo, D. et al. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- Garcia, M. V. B. & Adis, J. (1995). Comportamento de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em uma floresta inundável de várzea na Amazônia central. Amazoniana, 13: 259-282.
- Gaston, K. J. (1991). The magnitude of global insect species richness. Conserv. Biol., 5: 283-296.
- Gaston, K. J. (1992). Spatial patterns in the description and richness of the Hymenoptera. In: J. LaSalle and I. D. Gauld (Ed.) Hymenoptera and Biodiversity, pp. 277-293. C.A.B International, UK.
- Gauld, I. & Bolton, B. (1996). The Hymenoptera. Oxford University Press. London.

- Hachiohe, K. & Onishi, W. (1952). On the meiosis of the drone of honey bee (*Apis mellifera*). Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, G3: 83-87.
- Hanson, P. E. (1995). Economic importance of Hymenoptera. In The Hymenoptera of the Costa Rica, P. E. Hanson & I. D. Gauld, (ed.) pp. 89-100. Oxford University Press, New York.
- Hihara, F. & Kurokawa, H. (1987). The sperm length and the internal reproductive organs of *Drosophila* with special references to phylogenetic relationships. Zool. Sci., 4: 167–174.
- Hoage, T. R. & Kessel, R. G. (1968). An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera*) with special reference to centriole replicacion and elimination. J. Ultrast. Mol. Struct. Res., 24: 6-32.
- Hogge, M. A. F. & King, P. E. (1975). The ultrastructure of spermatogenesis in *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). Journal Submicroscopic Cytology, 7: 81-96.
- Ito, S. (1960). The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells *Drosophila virilis*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7: 433-442.
- Jamieson B. G. M.; Dallai R & Afzelius B. A. (1999). Insects: their spermatozoa and phylogeny. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.
- Jamieson, B. G. M. (1987). The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press. Cambridge.
- John, B (1972). Meiosis. Developmental and Cell Biology. Cambridge University Press: New York, Australia.. 396pp.
- Kato, M. (1956) The Biology of the Cicadas, Bulletin of the Cicadae Museum. Scientist Company, Tokyo (Japanese).
- Kaye, J. S. (1962). Acrossome formation in the house cricket. J. Cell Biol., 12: 411-431.
- Kurokawa, H.; Matsuo, Y. & Hihara, H. (1974). A study on sperm length and body size of *Drosophila bifasciata*. Annot. Zool. Japon., 47: 140–146.
- Lee, P. E. & Wilkes, A. (1965). Polymorphic spermatozoa in the Hymenoptera wasp *Dahlbominus*. Science, 147: 1445-1446.

- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001a). Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera; Platygastroidea) with phylogenetic considerations. *Zool. Scr.*, 30: 89-96.
- Lino-Neto, J. & Dolder, H. (2001b). Redescription of sperm structure and ultrastructure of *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Trichogrammatidae). *Acta Zool Stockholm*, 82: 159-164.
- Lino-Neto, J.; Bão S. N. & Dolder, H. (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). *Int. J. Insect Morphol.*, 28: 253-259.
- Lino-Neto, J. (1993) Estudo Ultra-estrutural da Espermiogênese e dos Espermatozoides de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Tese de Mestrado. UNICAMP/SP.
- Lino-Neto, J. (2001). Estrutura e Ultra-estrutura dos Espermatozoides de Alguns Hymenoptera (Insecta). Tese de Doutorado. UNICAMP/SP.
- Lino-Neto, J.; Bão S. N. & Dolder H. (2000a). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Acta Zool. Stockholm*, 81: 205-211.
- Lino-Neto, J.; Bão, S. N. & Dolder, H. (2000b). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue Cell*, 32: 322-327.
- Lino-Neto, J.; Bahamondes, L.; Carrel, D. T. & Carvalho, H. F. (2005). Espermatozoides em Células uma abordagem multidisciplinar, editores Carvalho, H. F. & Collares-Buzato, C. B., 291 – 301. Barueri, SP: Editora Manole Ltda.
- Mark, E. L. & Copeland, M. (1907). Maturation stages in the spermatogenesis of *Vespa*. *Proc. Am. Acad.*, 43: 69-74.
- Messias JR., N. S. (1990). Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomya megacephala* Fab (Diptera, Calliphoridae). Tese de mestrado. UNICAMP/SP.
- Meves, F. (1903). Ueber den von La Valette Saint-George entdeckten Nebenkern (Mitochondrienkörper) des Samenzellen. *Arch. Mikrosk. Anat.*, 56: 553-606.
- Moreira, J. C. S.; Brito, P. & Lino-Neto, J. (2003). Morphology and number of spermatozoa per cyst in *Sceliphron* sp. and *Trypoxylon albitarse* (Hymenoptera

- Sphecidae). In Proceedings of the XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis, Caxambu, MG.
- Newman, T.M. & Quicke, D. L. J. (1999a). Ultrastructure of imaginal spermatozoa of Sawflies (Hymenoptera: Symphyta). *J. Hym. Res.*, 8: 35-47.
- Newman, T. M. & Quicke, D. L. J. (1999b). Ultrastructure of spermatozoa in *Leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *J. Hym. Res.*, 8: 197-203.
- Pasini, M. E.; Redi, C. A.; Cavaglia, O. & Perotti, M. E. (1996). Ultra structural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue Cell*, 28 (2): 165–175.
- Phillips, D. M. (1970). Insect sperm: structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 44: 243-277.
- Pratt, S. (1970). Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of the Hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. In: Baccetti, B. (ed) *Comparative Spermatology*. Rome, Accademia Nazionale dei Lincei. p 301-310.
- Quicke, D. J. L. (1997). Preimaginal development: from gametogenesis to syngamy. In *Parasitic Wasps* (Ed. Quicke, D.J.L). Chapman & Hall, London. p. 79-101.
- Quicke, D. L. J.; Ingram, S. N.; Baillie, H. S. & Gaitens, P. V. (1992). Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zool. Scr.*, 21: 381-402.
- Rasnitsyn, A. P. (1988). An outline of evolution of the Hymenoptera insects (Order Vespida). *Orient. Insects*, 22: 115-145.
- Ronquist, F.; Rasnitsyn, A. P.; Roy, A.; Eriksson, K. & Lindgren, M. (1999). Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data *Zool. Scr.*, 28: 13-50.
- Rosati, F.; Selmi, G. & Mazzini, M. (1976). Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. *J. Submicr. Cytol.*, 8 (1): 51-67.
- Takamori, H. & Kurokawa, H. (1986). Ultrastructure of the long and short sperm of *Drosophila bifasciata* (Diptera: Drosophilidae). *Zool. Sci.*, 3: 847–858.
- Wheeler, D. E.; Crichton, E. G. & Krutzsch, P. H. (1990). Comparative ultrastructure of ant spermatozoa (Formicidae: Hymenoptera). *J. Morphol.*, 206: 343-350.
- Wilkes, A. & Lee, P. E. (1965). The ultrastructure of dimorphic spermatozoa in the hymenopteran *Dahlbominus fuscipennis* (Zett.) (Eulophidae). *Can. J. Genet. Cytol.*, 7: 609-619.