

# **Estudos anatômicos e histológicos sôbre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae)**

## **X. Parte: Espermiohistogênese do *Triatoma infestans* (\*)**

**Rudolf Barth**

Instituto Oswaldo Cruz

(com 87 figuras em 17 estampas)

### **A. INTRODUÇÃO**

Em continuação a quinta parte dos estudos sôbre os Triatomíneos (1) comunicamos, em seguida, os resultados de nossas observações sôbre as células germinativas masculinas, durante a histogênese dos espermios. No trabalho citado consideramos as modificações, que os espermiogônios primordiais sofrem durante a evolução até o estado dos espermídeos. Na figura 1, tentamos apresentar, de modo muito esquematizado, estas fases evolutivas, bem como a continuação das transformações, que as células germinativas percorrem até chegarem à forma definitiva. Temos de chamar a atenção que, neste desenho, foi encurtado o comprimento total do folículo em comparação com sua largura e, que o número de cistos foi reduzido quase à metade, especialmente, na região das divisões de multiplicação e de crescimento, bem como na zona dos espermiócitos. Resumiremos, em seguida, as fases da citogênese — neste resumo os números e as letras correspondem os da figura 1:

1. Conjunto das células germinativas primordiais (espermiogônios primordiais)
2. Núcleos das paredes dos cistos
3. Fases de multiplicação dos espermiogônios:
  - a) Espermiogônio primordial em divisão
  - b) Estádio com 2 espermiogônios secundários
  - c) Estádio com 4 espermiogônios secundários
  - d) Estádio com 8 espermiogônios secundários
  - e) Estádio com 16 espermiogônios secundários

---

\* Trabalho realizado sob os auspícios do Conselho Nacional de Pesquisas. Recebido para publicação em 1 de setembro de 1958.

- f) Estádio com 32 espermiogônios secundários
  - g) Estádio com 64 espermiogônios secundários
  - h) Estádio com 128 espermiogônios secundários
  - i) Estádio com 256 espermiogônios secundários
4. Fase presináptica, com ligeiro crescimento celular
  5. Fase de contração:
    - a) Emaranhado sináptico
    - b) Fios bivalentes do paquíteno, forte crescimento nuclear
  6. Fase dos cromosomas difusos, forte crescimento nuclear
  7. Profase da primeira divisão de maturação:
    - a) Condensação dos cromosomas
    - b) Formação de tétrades
    - c) Primeira divisão de maturação
  8. Segunda divisão de maturação
  9. Espermídeos
  10. Fases de translações das organelas
  11. Fases de alongamento
  12. Espérmios maduros, passando para o vaso eferente.

A histogênese dos espérmios começa com as primeiras translações dos componentes celulares do espermídeo (correspondendo ao cisto 9 da figura 1). Tôda a fase de maturação ou histogênese, é subdividida, convencionalmente, em período de translações e de alongamentos. No primeiro verifica-se, no interior da célula, uma migração dos centríolos, mitocôndrios e partes do aparelho de Golgi para, finalmente, êstes componentes chegarem aos seus lugares definitivos, no espérmio maduro. No segundo período estas organelas mudam profundamente o seu aspecto para poderem exercer as funções predestinadas, e para encontrarem espaço adequado na mínima extensão, no interior do espermídeo, no sentido transversal.

## B. TÉCNICA

Durante o estudo da citogênese, os métodos convencionais em histologia e citologia satisfizeram as necessidades das observações. Mencionamos, aliás, na publicação citada (1), o efeito desfavorável do ácido acético como componente dos fixadores. Encontramos nas observações histogenéticas numerosos obstáculos, que pudemos evitar, sòmente, por métodos especiais ou adaptados à certas finalidades. A primeira dificuldade é a delicadeza das estruturas e o percorrer das transformações e translações no interior de um espaço muito reduzido, de maneira que, várias estruturas desaparecem em virtude de superposição, caso que empregamos apenas os métodos citados na mencionada publicação. Aproveitando dos vários métodos de fixação, conseguimos suprimir certas estruturas e realçar outras que, pela superposição, ficaram escondidas. Por intermédio de uma diferenciação mais curta ou mais prolongada, pudemos extrair a hemateína em vários graus, de modo que

a organela fica com uma coloração mais intensa do que outros componentes da célula. Não é possível comunicar regras generalizadas deixando, aliás, o escolhe das técnicas à experiência e capacidade do observador. Para o estudo das transformações da cromatina empregamos o método segundo BOUIN-DUBOSCQ-BRASIL; para a fixação do citoplasma e dos seus derivados obtivemos bons resultados pelo fixador segundo HELLY que, sobretudo, conserva os mitocôndrios. Observamos que após a fixação com este líquido, a massa mitocondrial, nos primeiros estádios dos espermídeos, apresenta em sua estrutura camadas concêntricas (fig. 31), fato este que, ao meu ver, é provocado por extração parcial de certos componentes desta organela. Os mitocôndrios, depois de fixados segundo HELLY, e corados subseqüentemente com hematoxilina férrica segundo HEIDENHAIN (original), não se tingem em preto, mas sim em amarelo-marron.

Para fixação de mitocôndrios, aparelho de GOLGI, centríolos, fios axiais e restos de fusos, usamos inicialmente o soluto de FLEMMING sem ácido acético. Observamos ainda, uma extração do material de algumas estruturas celulares e, para diminuir a perda de substâncias durante a fixação, trabalhamos depois, exclusivamente com  $\text{OsO}_4$  puro e tamponado ( $p_H$  7,25) a 1%, conforme o método de STERN, que segue em baixo (o tampão foi composto pelo colega FIRMINO TÔRRES DE CASTRO, a quem agradeço cordialmente):

Soluto-mãe: Dissolve-se 9,714 g de acetato de sódio ( $-3 \text{ H}_2\text{O}$ ) e 14,714 g de "veronal-sódico" em água bidestilada (livre de  $\text{CO}_2$ ) ad 500 ccm. Mistura-se 5 partes do soluto-mãe com 2 partes de um soluto de cloreto de sódio a 8,5% em água bidestilada; é este líquido que chamamos "soluto base". Para obter um certo  $p_H$  adiciona-se a 7 ccm de soluto base "a" ccm n/10 HCl e (18 —a) ccm água bidestilada, conforme a seguinte tabela:

"a"	$p_H$	"a"	$p_H$	"a"	$p_H$
0,00	9,64	5,00	7,42	11,00	4,33
0,25	9,10	5,50	7,25	12,00	4,13
0,50	8,90	6,00	6,99	13,00	3,88
0,75	8,68	6,50	6,75	14,00	3,62
1,00	8,55	7,00	6,12	15,00	3,20
2,00	8,18	8,00	5,32	16,00	2,62
3,00	7,90	9,00	4,93		
4,00	7,66	10,00	4,66		

Os valores intermediários podemos calcular por interpolação linear. Para a fixação usamos um  $p_H$  de 7,25. A duração da fixação é de 90 até 120 minutos, para material com o diâmetro menor de 1,5 até 2,0 mm. Coloração dos cortes com hematoxilina férrica segundo HEIDENHAIN. Podemos obter uma coloração de contraste mais acentuado por uma

modificação do método clássico de HEIDENHAIN: em cortes finos (1 a 2 micra) diminui-se o tempo de exposição no alúme de ferro até 2 ou 3 horas. Depois da coloração em hematoxilina, decora-se os cortes totalmente em alúme de ferro e cora-se, a seguir, novamente em hematoxilina, repetindo êste processo duas ou três vêzes.

Para a análise do flagelo do espermio, deixamos os espermios maduros (tirados da vesícula seminalis) 20 horas em água destilada em temperatura de 5° a 7° na geladeira. Conseguimos, assim, desintegrar as fibrilas para depois, no microscópio eletrônico, constatar o número dos mesmos. Aparentemente, os fios *axiais* possuem uma constituição menos estável do que os filamentos mitocondriais, pois na maioria das preparações os axiais desaparecem, sendo os mesmos, somente, conservados em espermios cuja cauda sofreu u'a maceração menos acentuada. Verificamos que o método indicado por WU e MCKENZIE (2), aplicando várias concentrações de NaOH (0,2 — 0,02/n NaOH), acelera ainda mais a maceração, cremos ser a desintegração da cauda em água destilada um método mais suave para espermios de insetos.

### C. TERMINOLOGIA

Neste trabalho usamos a mesma terminologia, que nos serviu na publicação citada (1), pois consideramos esta mais simples e significativa. Em seguida usamos:

em vez de espermatogônios .....	espermiogônios
em vez de espermatócitos da primeira ordem	espermiócitos
em vez de espermatócitos da segunda ordem	prespermídeos
em vez de espermatídeos .....	espermídeos
em vez de espermatozóides .....	espermios

Em relação à terminologia dos vários componentes do espermídeo — que representa o estágio inicial da histogênese — evitamos o termo “Nebenkern” pois em certos trabalhos êste designa o conjunto dos mitocôndrios (3), e em outros os restos dos fusos. O “idiosoma”, segundo MEVES (4), é a zona de protoplasma condensado que, em espermiogônios e espermiócitos, inclui o centríolo; outros autores empregam êste termo para a parte do aparelho de GOLGI, que depois forma o acrosoma (bibliografia veja no trabalho de OTTE — 5). A fim de excluir certas dúvidas, não usaremos a palavra idiosoma. Sob mitocôndrios compreende-se as estruturas da célula descritas por BENDA; sob o aparelho de GOLGI aquelas introduzidas, na citologia, por GOLGI. Consideramos, conforme esta exposição, como componentes do espermídeo os seguintes elementos que, em virtude de deslocamentos e transformações, formam o espermio, ou são eliminados do corpo da célula germinativa durante a fase de histogênese:

1. Membrana celular
  2. Protoplasma
    - a) Citoplasma (incluindo os cromídeos e os microsomas sub-microscópicas)
    - b) Massa dos restos dos fusos
    - c) Aparelho de GOLGI
    - d) Mitocôndrios
    - e) Centríolos
- } Diferenciações do citoplasma
3. Núcleo celular com os seus típicos componentes:
    - a) Membrana nuclear
    - b) Sistema de cromatinas e lininas
    - c) Líquido nuclear
    - d) (Não foi possível provar a existência de um nucléolo nem em fases ativas, nem em períodos de repouso).

#### D. FASE DE TRANSLAÇÃO

Na fase dos cromosomas difusos, do espermiócito (fig. 1, cif. 6; fig. 2, MI), os mitocôndrios formam cadeias de grânulos, mais ou menos compridas, que se distribuem igualmente sôbre todo o citoplasma, sempre orientadas no sentido concêntrico em relação ao núcleo. No fim desta fase, as fileiras de mitocôndrios aproximam-se à membrana nuclear formando uma zona esférica em redor do núcleo (fig. 3). Durante a fase de formação dos tétrades (diacinese) esta região sofre uma condensação ainda mais forçada (fig. 4, MI) até, no momento da desintegração do corpo heteropicnótico (composto dos autosomas A, B e C e dos heterocromosomas x e y), incluir o núcleo em forma de um manto compacto (figs. 5 e 6, MI).

Na fase terminal do estágio dos cromosomas difusos, o aparelho de GOLGI é desintegrado, apresentando-se, então, em forma de numerosas partículas (figs. 2 e 3, GO), espalhadas irregularmente sôbre o espermiócito. Estas partes são fragmentos da rede de substância de GOLGI que, durante a fase de crescimento do espermiócito, inclui o núcleo numa maneira mais ou menos perfeita. Parece que, no início da fase do forte crescimento, a rede é completa, mas, em virtude do rápido aumento do volume nuclear ela se desintegra e a sua matéria condensa-se em várias partículas de tamanho, aproximadamente igual, arredondando-se em forma de placas ovais. O material periférico destas tingem-se com mais intensidade do que o do centro; assim a placa, aparentemente, forma uma borda saliente, mas na realidade, entretanto, a grossura da placa, em tôdas as partes, é igual. A condensação da substância basófila na periferia da placa, visto obliquamente, faz o observador crer que se trate de duas partes ligadas, intimamente, uma à outra; é esta observação um efeito óptico que realmente não existe. Durante a formação dos tétrades, as porções do aparelho de GOLGI con-

centram-se num plano anular em redor do núcleo, que corresponde ao futuro equador da primeira divisão de maturação (figs. 5 e 6, GO); observação esta que é provada pela posição dos dois centríolos (figs. 5 e 6, CO).

Durante o período de crescimento do espermiócito, e no estágio dos cromosomas difusos, o centríolo é um grânulo simples e redondo, tendo menos de um micron de diâmetro. Este difere-se do corpo cromatóide, freqüentemente observado (de função desconhecida), pelo seu tamanho reduzido, bem como pela zona citoplasmática que circunda o centríolo em forma de uma esfera e, que se apresenta, num corte, como um halo ou uma aréola. Por meio destes caracteres consegue-se, com certa facilidade, localizar o centríolo. Esta citada porção do citoplasma (aréola), que inclui o centríolo, apresenta-se, nas diferentes fases de transformações celulares, em vários aspectos: No período dos cromosomas difusos (fig. 2, CO) a aréola é condensada e tingem-se intensamente com hemateína, enquanto que, no início da diacinese (fig. 3, CO) ela se apresenta de coloração fraca, dando a impressão de se tratar de um vacúolo. Ao terminar a diacinese a aréola novamente aparece como u'a massa compacta (fig. 5, CO). Nesta altura o centríolo já se dividiu em dois grânulos iguais, que se localizam em dois pólos opostos do núcleo. A divisão do centríolo e a translação dos seus fragmentos, aparentemente, estão relacionadas à modificação qualitativa da aréola. Pela translação, a polaridade do núcleo da primeira divisão de maturação, é definitivamente fixada. As partes do aparelho de GOLGI e as fileiras dos mitocôndrios acumulam-se no plano equatorial, fixado pela posição dos centríolos (fig. 6).

Em seguida, o espermiócito sofre as duas divisões de maturação (figs. 7, 8 e 9), já descritas no trabalho citado (1). Sem deixar perceber qualquer mecanismo especial, os mitocôndrios são distribuídos, por ocasião da divisão do corpo protoplasmático, em porções iguais para os dois prespermídeos e, durante a segunda anafase, para os quatro espermídeos. Também os fragmentos do aparelho de GOLGI passam, nas mesmas fases, para os prespermídeos e espermídeos. Não foi possível observar os pormenores deste processo. No espermiócito encontram-se sempre numerosas placas do aparelho de GOLGI; o número é aproximadamente 10 mas, aparentemente, não é constante. O espermídeo, depois da segunda telofase de maturação, possui sempre apenas um corpúsculo da substância de GOLGI. Este fato leva à presunção de que não se trate de uma simples distribuição dos fragmentos para as células-filhas, pois a célula materna possui sempre, pelo menos, mais do que quatro placas desta substância. Não observamos a eliminação de uma parte do aparelho de GOLGI nestes estádios; mas certos aspectos dos perspermídeos nos dão a impressão, que permite com certas restrições concluir, que durante a anafase e telofase (não nas metafases) há uma conjugação de algumas placas de substância de GOLGI, diminuição esta que, finalmente, reduz o nú-

mero de aproximadamente 10 à somente 4. Temos de acrescentar, entretanto que, também, em cortes finos, não conseguimos obter bastante aspectos positivos; assim a resposta à questão em aprêço só pode ser dada como opinião a favor da conjugação mencionada. O centríolo sofre cada vez uma partição, antes da primeira divisão de maturação, no estágio da diacinese, assim como na interfase. Além disso há mais uma divisão no fim da última telofase (fig. 14). *Este grânulo duplo passa, inalteradamente, para o espermídeo.* Esta passagem, por muito tempo, ficou absolutamente fora de observação, pois o centríolo duplo da última telofase sempre desapareceu no momento da torsão dos núcleos recémformados do novo espermídeo. O centríolo foi encontrado, somente depois da regeneração completa da célula, de modo que não foi possível provar a identidade dos centríolos dos espermídeos, com os da última telofase. Somente em cortes com uma grossura de menos do que um micron, corados com hemotoxilina férrica e fortemente diferenciados, conseguimos encontrar os centríolos no interior da massa dos restos de fusos. Estes últimos formam, depois da divisão do prespermídeo em espermídeos, u'a massa condensada (corpo dos restos dos fusos). Em virtude da extração forçada da laca de hemateína pelo alúme de ferro (1%), esta condensação protoplasmática descora-se, de tal maneira que permite, observar o centríolo duplo, que possui uma afinidade para o corante, um pouco mais acentuada do que a massa dos restos dos fusos. Os centríolos sempre estão situados no interior da citada massa, circundados por uma estreita área mais transparente, a aréola (fig. 15). Neste estágio o núcleo já avançou na sua regeneração já tendo saído do conjunto dos fusos, em virtude da torsão já conhecida. Em cortes finos constatamos que a torsão dos núcleos tem início no mesmo momento em que se forma a membrana do novo núcleo. Até o ponto culminante da telofase a massa dos cromosomas fica ligada ao pólo da figura dos fusos; pela nova membrana nuclear ela perde este contato e o núcleo, que em virtude da desintegração da cromatina e embebição por uma certa quantidade de líquidos, é mecânicamente forçado a sair do complexo restante dos fusos. O centríolo duplo, entretanto, permanece em contato com os fusos e, durante o processo subsequente de contração e arredondamento, sofre uma inclusão no interior desta condensação transitória do protoplasma (fig. 16, CO). Mais tarde o corpo dos restos dos fusos é assimilado pelo citoplasma, desaparecendo, e deixando os centríolos isolados no seu lugar. Encontramos o grânulo duplo do centríolo nos novos espermídeos, que ainda não terminaram a separação dos seus corpos protoplasmáticos, depois da última telofase (fig. 15, CO).

Depois da separação dos dois corpos protoplasmáticos, o novo espermídeo passa por um curto período de crescimento. Neste intervalo a célula, bem como o núcleo, o aparelho de GOLGI e os mitocôndrios sofrem um aumento dos seus volumes, que no caso do núcleo chega a ser duplo (compare as figuras 15 e 20). O aumento do volume do núcleo limita-se, exclusivamente, em uma simples infiltração do líquido nuclear, enquanto que a massa cromática se mantém com a mesma

quantidade. No fim do período de crescimento do espermídeo os mitocôndrios concentram-se, formando um corpo volumoso. Este último processo inicia-se com a desintegração das cadeias de grânulos mitocondriais, que se encontram ainda com uma forma típica, depois da última telofase (fig. 15). Durante o período de crescimento (fig. 16), que sempre inclui alguns cistos vizinhos de um só folículo, os mitocôndrios acham-se irregularmente distribuídos sobre todo o protoplasma, apresentando-se em forma de grânulos mais ou menos grosseiros. Logo depois, porém, estes se concentram perto do centríolo e confluem, finalmente, para formar um corpo, aproximadamente, esférico (fig. 20) que, no início, quase tem o diâmetro do núcleo, sendo sua matéria apenas pouco condensada. Logo depois da fusão das partículas de mitocôndrios, o interior do corpo mitocondrial sofre uma série de modificações, que podem ser interpretadas como simples efeitos de condensação. Este processo inicia-se no centro do corpo (por muitos autores chamado de "Nebenkern"). Da massa central compacta partem cordões de material condensado, que chegam até a periferia (fig. 20). Durante estes acontecimentos, o corpo mitocondrial diminui rapidamente de volume, e, em estádios mais avançados, êle atinge, somente, uma fração do tamanho do núcleo (figs. 21 a e 21 c). Também nesta fase, observamos estruturas no seu interior, que indicam que a atividade da matéria mitocondrial ainda está continuando (fig. 21 c, MI).

No espermídeo recémformado, o aparelho de GOLGI consta de uma só placa (fig. 16, GO). Durante o período de crescimento, esta aumenta até o dôbro ou mesmo triplo do seu volume inicial (fig. 20, GO) e, em seguida, como acontece com a massa mitocondrial, sofre uma condensação e diminuição do seu tamanho (fig. 21c). Inicialmente, no novo espermídeo, os quatro componentes (restos dos fusos, centríolo duplo, mitocôndrios e aparelho de GOLGI) encontram-se concentrados numa parte da célula, que corresponde ao futuro pólo apical do espermio. No fim do período de crescimento, o aparelho de GOLGI começa a migrar em redor do núcleo, para chegar ao seu pólo oposto (fig. 20, GO). Durante esta fase, o centríolo duplo é libertado do corpo dos restos dos fusos (fig. 20, CO), translocando-se no mesmo sentido que o aparelho de GOLGI. Finalmente, o corpo mitocondrial e os restos dos fusos percorrem o mesmo caminho (fig. 21 b). Este último, nos estádios subseqüentes, começa a desintegrar-se, sendo assimilado depois, completamente, pelo citoplasma (em geral ainda antes da formação do fio axial).

O centríolo duplo, durante a sua translação para o pólo oposto da célula, que doravante será chamado pólo basal, em virtude das diferenciações subseqüentes, pode passar perto do núcleo ou perto da parede celular; aparentemente, nesta translação, não existe qualquer regra. Uma certa irregularidade observamos, também, na seqüência cronológica dos citados movimentos dos quatro componentes pois, muitas vezes, o aparelho de GOLGI permanece ainda na posição inicial, enquanto que os centríolos já iniciaram ou mesmo terminaram a translação (fig.



21 a). Em virtude desta nova distribuição dos componentes protoplasmáticos, o núcleo sofre uma nítida translação no sentido da extremidade apical da célula. No pólo oposto forma-se, provocado pela adaptação do contorno da célula, com as suas vizinhas, um prolongamento protoplasmático em forma de cone (fig. 22). O espermídeo modifica, assim, o seu aspecto redondo em um piriforme. O início da formação do cone basal representa o começo da segunda fase da histogênese dos espermídeos.

Durante os primeiros estádios da fase de translação (isto é, nos espermídeos mais novos), a cromatina se desintegra em várias partículas grosseiras (figs. 15 e 17). Estas continuam a dividir-se, e os pequenos grânulos cromáticos juntam-se à parede nuclear, revestindo, em seguida, grandes áreas do lado interno da membrana do núcleo (fig. 18). Uma certa quantidade de cromatina fica ainda no interior do núcleo, desintegrando-se em minúsculas granulações, que em virtude do tamanho reduzido, se tingem apenas, ligeiramente, com hema-teína, e dando ao líquido uma fraca turvação (figs. 22 e 23). Somente o heterocromosoma heteropicnótico permanece com o mesmo grau de condensação (figs. 20 e 21 c, HE).

## E. FASES DE ALONGAMENTO

### 1. *Alongamento dos centríolos*

Depois da fase de translações, o centríolo duplo está situado no pólo basal do núcleo. Ao seu lado encontram-se a massa mitocondrial e o aparelho de GOLGI, bem como ainda alguns vestígios dos restos dos fusos, que por sua vez, podem permanecer em posição apical e, aos poucos, vão sendo dissolvidos (fig. 23). Os dois grânulos do centríolo, um junto ao outro, justapõem-se sobre a membrana do pólo basal do núcleo. Cada um dos dois corpúsculos, emite um filamento em direção ao cone protoplasmático basal, que imediatamente se reúnem para compor um único fio axial (figs. 27 e 28). O corpo mitocondrial, no início desta fase ainda em forma de um único corpo mais ou menos redondo (figs. 23 e 24), sofre uma divisão longitudinal em duas porções iguais, incluindo entre si — isto é, no plano da sua fenda longitudinal — o fio axial ou as duas partes iniciais do mesmo (fig. 26). No interior do corpo mitocondrial ainda ocorrem modificações, em virtude de condensação, que se manifestam, conforme a fixação e coloração, sempre em diferentes aspectos microscópicos, e que mostram uma grande variabilidade, de modo que não se pode constatar qualquer regra fixa. Somente depois de um certo prosseguimento no alongamento do espermídeo, aparece, com regularidade, uma zona central de condensação que, lentamente e em direção centrifugal, se estende sobre todo o corpo mitrocondrial (fig. 28).

O aparelho de Golgi está situado, lateralmente, ao complexo simétrico que inclui o corpo mitocondrial, os centríolos e os fios axiais. Esta organela começa, mais cedo (fig.33) ou mais tarde (fig.37), a

formar um corpúsculo redondo e compacto, situado dentro da própria matéria, e que se tingem fortemente por hematenia. Ele separa-se, em seguida, do corpo materno para, mais tarde, formar o acrosoma. Em virtude desta propriedade, o aparelho de Golgi foi chamado de "acroblasto" por numerosos autores. Sendo esta designação, um sinônimo do termo aparelho de Golgi, e não havendo qualquer razão para aumentar o número de termos técnicos sem uma necessidade justificada, resolvemos manter este último que, ao nosso ver, é o mais adequado.

Não foi observada uma imigração do fio axial para o interior do núcleo, como foi descrita por Meves (6) em *Paludina* e por Bonnewie (7 e 8) em *Enteroxenos*. Aspectos que levam à tal dedução podem ser reproduzidos por deformações, como por exemplo, reentrâncias e saliências que, às vezes, em consequência de uma fixação incompleta aparecem no pólo do núcleo. Estas irregularidades ocorrem, facilmente, no ponto de justaposição dos dois centríolos ao núcleo pois, aí, o manto interno de cromatina é interrompido, deixando uma janela mais ou menos redonda no pólo basal, e que é fechada, somente, pela membrana nuclear. Conseguimos eliminar estas fontes de aspectos falsos, por meio de cortes com uma grossura de menos que um micron, e por observação, sem coloração, com contrastes de fases. Em cada caso do exame da inserção do fio axial notamos, que este não ultrapassa os centríolos em direção apical; sempre constatamos que o citado fio nasce dos dois centríolos e se dirige, em linha reta, ao cone basal do espermídeo.

Não é possível enquadrar a formação do fio axial no esquema de Bowen (9), relativo à organização e gênese dos espermídeos dos heterópteros, pois neste, o fio nasce de um só centríolo. Em *Triatoma infestans* a formação dupla do filamento manifesta-se não, somente, nos aspectos citológicos, apresentados até agora neste trabalho, mas também, nos resultados das observações obtidas em material macerado (veja em baixo), que provam a presença de dois fios no filamento axial da cauda do espermídeo maduro.

Como resultado principal do estudo sobre os centríolos podemos realçar, que os dois grânulos do centríolo sempre estão nitidamente separados um do outro, e que os dois se justapõem, um ao lado do outro, sobre a parede do pólo basal do núcleo, sendo, assim, impossível fazer uma distinção entre centríolos proximal e distal, pelo menos em *Triatoma infestans*. Aparentemente, não existe uma diferença fisiológica entre os dois centríolos, pois ambas se comportam da mesma maneira, fornecendo cada um, uma metade do filamento axial.

O fio axial cresce, continuamente, e penetra no cone protoplasmático basal, que continua a se prolongar. Neste processo, em nenhuma das observações, seja em cortes, seja em esfregaços, foi constatado, que o fio axial atravessa a membrana celular na extremidade do cone, para continuar como "parte terminal nua"; fato este, frequentemente, mencionado por numerosos autores em outras espécies de animais. Mesmo em esfregaços de espermídeos maduros observa-se o manto protoplasmático até a extremidade da cauda (observado em contraste de fases e em

campo escuro). Muitas vezes o fio axial, aparentemente, atravessa a membrana celular. Um exame em cortes finos prova, entretanto, que sempre se trata de superposições dos limites culares, pois o filamento prolonga-se, em direção do eixo maior do cone protoplasmático basal do espermídeo, e este, por sua vez, projeta-se entre as células vizinhas. A possibilidade de observações erradas é dada em cistos, com espermídeos novos, onde tôdas as células se justapõem umas as outras, sem deixar espaços intercelulares.

Neste estágio, caracterizado pelos corpos mitocondriais ainda em forma esférica (fig. 28), as células dos espermídeos orientam-se em posição radial, com os pólos apicais em direção à parede do cisto (fig. 29). Mais tarde, com os espermídeos fortemente alongados, verifica-se uma translação, de maneira que tôdas as cabeças se orientam num só lado, em geral na região proximal do cisto. Assim, todos os 1 024 espermídeos de um cisto formam um feixe (fig. 30) que, em virtude do crescimento contínuo, enrola-se em espiral (fig. 1).

## 2. *Alongamento da massa mitocondrial*

Até esta fase a massa mitocondrial fica situada no pólo basal do núcleo, em forma de um corpo esférico, composta de duas metades hemisféricas, entre as quais passa o fio axial (fig. 28). As duas hemisferas começam a alongar-se em direção paralela ao filamento axial. Este processo tem início no momento quando o fio axial atinge um comprimento que corresponde, aproximadamente, 8 ou 10 vezes o do núcleo. O cone protoplasmático basal, concomitantemente, possui, então, a mesma extensão (fig. 31). Às vezes, dentro da massa mitocondrial, aparecem estruturas fibrilosas concêntricas, de natureza transitória (figs. 31 a, c e d), e que, provavelmente, são efeitos de uma fixação incompleta (veja em cima). No interior de cada hemisfera formam-se quatro concentrações da substância mitocondrial, não bem limitadas (fig. 32 a), e cujo diâmetro diminui continuamente em direção à extremidade distal do futuro flagelo (figs. 32 b e c). Em estádios, com cauda mais alongada, os quatro filamentos internos de cada metade da massa mitocondrial, ficam ainda finas até, finalmente, não ser mais possível, mesmo com os aumentos maiores do microscópio de luz comum, identificar as unidades que, então, formam dois corpos situados, lateralmente, ao fio axial (fig. 35, FMI).

O alongamento da massa mitocondrial não se realiza uniformemente, mas sim em uma seqüência de dilatações que, em forma de ondas se estendem sobre todo o comprimento do fio axial. A zona periférica da substância mitocondrial é, consideravelmente, mais condensada do que a interna (fig. 33). Entre as dilatações, a zona periférica justapõe-se, diretamente, ao filamento axial que, por sua vez, não está em posição central mas sim, extremamente, excêntrica (fig. 34). Em estádios ainda mais avançados, as dilatações, com material menos condensado, diminuem em número e tamanho (fig. 35), até desaparecerem nas células definitivamente alongadas. Podem-se confundir estas dilata-

ções, facilmente, com acumulações de protoplasma encontradas em vários pontos do flagelo, mesmo ainda no espermio maduro, e que representam material eliminado, ainda aderente ao filamento caudal.

Em espermídeos fortemente alongados, a substância mitocondrial, na região entre as dilatações, acumula-se em dois grupos, justapondo-se, lateralmente, ao fio axial, como já foi mencionado em cima (fig. 35). Esta organização ainda pode ser observada em espermios maduros. O fio axial, bem como os dois filamentos mitocondriais, que acompanham o primeiro, ficam revestidos por um manto de protoplasma, que vai diminuindo com a maturação do espermio.

Os estádios de dilatação do flagelo oferecem certas facilidades para a observação da extremidade da cauda. Nota-se que, a substância mitocondrial se estende até a extremidade do fio axial onde, além disso, muitas vezes, se encontram acumulações protoplasmáticas, mais ou menos volumosas.

Durante a fase de alongamento da massa mitocondrial, a cromatina continua a desintegrar-se em pequenas partículas; porém uma ou, às vezes algumas porções, permanecem ainda em estado integral, por um tempo prolongado. Trata-se, talvez, de partes de heterocromatina, mas esta suposição fica em dúvidas pois as partículas possuem diferente afinidade para os corantes. Observa-se, entretanto, na maioria das células, um elemento da massa cromática, que sempre mantém a mesma forma e o mesmo grau de condensação, seja em posição apical (fig. 36), central (fig. 39) ou basal (fig. 33). Como tudo indica, êste corpo pode ser o heterocromosoma (x ou y). As partículas menores deslocam-se em direção à periferia nuclear, justapondo-se à membrana em forma de um revestimento interno. Êste processo inicia-se com um reforçamento irregular da parede nuclear, no começo da fase de alongamento dos mitocôndrios (fig. 31); mais tarde, na zona apical, o revestimento de cromatina é contínuo (fig. 36). A formação dêste manto cromático prossegue em direção à base até que, na altura da formação do acrosoma (figs. 41 e 43) tôda a membrana nuclear fica revestida de cromatina.

### 3. Formação do acrosoma

Como foi mencionado, o aparelho de GOLGI passa para o novo espermídeo em forma de uma única placa grosseira e de contôrno oval (figs. 20 e 21). A sua zona marginal é composta de uma substância mais condensada; esta região, em estádios mais avançados — em geral no início do alongamento do corpo mitocondrial — começa a formar uma dilatação (fig. 31). Esta, depois, condensa e separa-se do outro material da placa formando um corpo esférico (com um diâmetro de menos que um micron) (fig. 33) que, em seguida, é expulso do aparelho de GOLGI (fig. 37). O corpo restante permanece ainda em sua posição no pólo basal do núcleo e, mais tarde, sem relação aos outros acontecimentos no interior da célula, desloca-se para a periferia (figs. 40 a 43) sendo, finalmente, eliminado da célula junto com uma porção do proto-

plasma, mais ou menos volumoso (figs. 43 e 44). O derivado esférico do aparelho de GOLGI, que se tingem fortemente com hemateína, começa a migrar em redor do núcleo em direção ao pólo apical do mesmo (figs. 40-43), onde se justapõe, externamente, sobre a membrana nuclear (figs. 44 e 45), formando a extremidade apical do futuro espermio. É este o chamado acrosoma. O protoplasma, na região apical e lateral do núcleo, forma apenas um revestimento muito fino.

Durante este processo, o lado interno do núcleo vai sendo coberto, progressivamente, por cromatina. Como já foi mencionado acima, este revestimento verifica-se de uma maneira irregular, deixando, temporariamente, pequenas regiões membranosas (fig. 46) que, em seguida, também são revestidas, com exceção de uma pequena área redonda, situada exatamente no pólo basal do núcleo. Neste ponto membranoso, encontram-se os dois centríolos (fig. 47). Inicialmente, estes são bem separados um do outro. Em seguida, entretanto, formam uma única placa, ligeiramente côncava, na qual não se pode mais individualizar, ópticamente, os dois componentes. Esta adapta-se, precisamente, à forma da área polar, fechando-a. A implantação íntima da placa dos centríolos é facilitada pela membrana nuclear flexível na região da janela (figs. 49).

#### 4. *Primeira fase de alongamento do núcleo*

Depois de ter terminado as translações e os alongamentos dos elementos celulares, citados até esta altura da transformação de espermídeo em espermio, o núcleo ainda possui forma redonda (fig. 45). No seu pólo apical, o acrosoma insere-se em forma de um curto cone. Na extremidade oposta, os dois centríolos encaixam-se na janela basal do revestimento cromático. Nas figuras 49 a, b e c estão apresentados três exemplos da implantação dos centríolos; em figura 49 d este processo é esquematizado. A cromatina, que em fases anteriores já começou a desintegração e translação para a parede nuclear, formando um revestimento sobre a membrana, continua ainda com este processo, de maneira que, no interior do núcleo, encontram-se agora, somente, partículas cromáticas muito pequenas, colocadas sobre uma rede incompleta de linina (fig. 49 a) e, além destas, um corpúsculo cromático, fortemente condensado (fig. 49 c), situado na parte basal do núcleo. Este último, provavelmente, corresponde ao heterocromosoma.

O estágio caracterizado acima, é sempre facilmente encontrado pois, em virtude da cromatina, parcialmente em suspensão, o interior do núcleo oferece um aspecto mais ou menos homogêneo, de cor azul-preta, depois coloração pela hematoxilina férrica que tingem as partículas no líquido nuclear. Depois de ter terminado todas as transformações da cromatina, o núcleo começa a alongar-se no sentido do seu eixo longitudinal (fig. 50). Concomitantemente, o acrosoma sofre uma condensação e um ligeiro alongamento, sendo após, mais pontagudo (figs. 50 a, 52 etc.). O manto interno de cromatina, inicialmente, ainda fica irregular (fig. 50 b), mas em núcleos mais ovais sua espessura já é

igual em tôdas as regiões (fig. 51). A cromatina parietal continua a condensar-se e os restos dos fragmentos cromáticos, mais cedo ou mais tarde, diminuem e desintegram-se definitivamente (figs. 52-55).

O núcleo alonga-se gradativamente (fig. 55), ficando cada vez mais estreito, com o seu eixo longitudinal algumas vêzes maior do que o transversal. Os centríolos, que formam a citada placa côncava na base do núcleo, adaptam-se à nova forma do núcleo aumentando, sempre mais, a sua concavidade (figs. 53 e 54). Finalmente, a placa forma um cone invertido (fig. 55) que, no seu interior, abriga a base do núcleo. Esta forma pode ser observada, somente, em cortes finos que foram feitos, exatamente, no sentido mediano (fig. 55). Este dispositivo do cone basal, provavelmente, reforça a inserção dos filamentos axiais da cauda sobre a base do núcleo.

O alongamento do flagelo continua, também, durante a fase destas transformações do núcleo e dos centríolos. O seu diâmetro diminui continuamente. O crescimento da cauda, em sentido longitudinal, percorre mais acelerado do que o estreitamento do núcleo.

##### 5. Segunda fase de alongamento do núcleo

Na primeira fase de alongamento do núcleo, foi completado pela cromatina o revestimento do lado interno da membrana nuclear (fig. 54). Depois de um alongamento, que atinge 3 vêzes mais, do que o maior diâmetro do núcleo, o "tapetum" de cromatina começa a formar dois reforçamentos, ou arestas longitudinais. Estas duas saliências, que se estendem entre os dois pólos do núcleo, encontram-se em posição assimétrica de maneira que, em corte transversal, a circunferência é subdividida em um arco maior (fig. 56, AG) e outro menor (fig. 56, AP). A orientação das arestas longitudinais é em forma de espiral, em torno do eixo longitudinal do núcleo (fig. 59). Esta organização verifica-se, focalizando um corte transversal de um núcleo em várias alturas subsequentes, como é apresentado na figura 59 a-d. As saliências giram, no sentido inverso do indicador do relógio, isto é, da direita para a esquerda, começando com *a* em focalização baixa, passando através de *b* e *c* para o plano mais elevado em *d*, ponto este, que está situado mais perto da extremidade apical do núcleo. Sendo os desenhos da figura 59 feitos por intermédio de tubo de projeção, tipo Zeiss, a inversão da imagem no microscópico já foi corrigida, de modo que a giração em torno do eixo longitudinal do núcleo, realmente, é contra o sentido do relógio. O mesmo fato pode ser observado na figura 60, onde se encontra uma série de cortes transversais da região perto da base do núcleo. Na figura 60 c foi cortada a borda superior do cone invertido dos centríolos, em uma pequena região. As figuras subsequentes (d-f) mostram cortes do cone em várias alturas até o seu vértice (h). O núcleo, inclusive o acrosoma, como também a cauda, estão revestidos por um manto protoplasmático, cuja grossura depende muito da fixação (fig. 60). Na figura 60 i é apresentado um corte transversal pela cauda com o fio axial e os dois corpos de matéria mitocondrial. Focalizando este corte em

vários planos (grossura do corte de 5 micra), observa-se que os dois filamentos dos mitocôndrios não correm em linha reta, paralelamente, ao eixo longitudinal, mas sim ligeiramente inclinados, e assim em linha espiral. A amplitude dêste espiral atinge, aproximadamente, 130-150 micra. Cada um dos dois filamentos mitocondriais descrevem, assim, 2 até 2,5 giros em torno do fio axial. Os dois elementos giram no mesmo sentido, que é contra o sentido do relógio.

O alongamento do núcleo continua nos cistos subseqüentes de um folículo. O arco menor, do corte transversal (fig. 56, AP), fica absolutamente reto formando-se, assim, a figura de uma ferradura (fig. 61). Esta forma de corte transversal permanece por muito tempo (figs. 62-67). A distância entre as duas arestas diminui durante a continuação do alongamento de modo que estas estruturas cromáticas salientes se aproximam até entrar em contato direto entre si (figs. 67-70). Dest'arte, no espermio, quase maduro (fig. 70), existe apenas uma pequena cavidade, repleta de líquido nuclear, que durante a última fase de condensação, ainda é eliminado. Tanto no microscópio de luz comum, quanto no microscópio eletrônico, o corte transversal do núcleo sempre aparece como uma figura redonda, de substância compacta e muito densa, que não permite observar qualquer estrutura interna. O revestimento de protoplasma na região da cabeça consta de um manto fino como uma membrana delicada, enquanto que na cauda a quantidade de protoplasma ainda é relativamente grande, pois êste preenche, também, os espaços entre os elementos fibrilares (veja em baixo).

## F. ESPÉRMIOS

O comprimento total do espermio atinge 300 micra, dos quais 38 micra pertencem à cabeça. Estas medidas são valores médios; as oscilações são relativamente pequenas, aproximadamente entre 5 e 10 %. Com excessão da subdivisão do espermio em acrosoma, cabeça e cauda (fig. 71), não se pode observar diferenciações estruturais pelo microscópio de luz comum e pelos métodos complementares como contraste de fases, luz polarizada ou campo escuro. O acrosoma distingue-se bem da cabeça por suas qualidades ópticas (fig. 72), como também pela estrutura, pois forma um prolongamento da cabeça, ligeiramente curvado (fig. 71 e 73). Na fotografia, pelo microscópio eletrônico (fig. 72), o acrosoma apresenta-se como um corpo, nitidamente distinto da cabeça, composta de uma substância menos densa do que aquela. A matéria da cabeça é compacta; o revestimento protoplasmático não é visível e, provavelmente, existe somente uma película fina como resto do manto de protoplasma, que ainda observamos nos estádios de evolução nos espermídeos. A cauda (lado esquerdo da figura 72) possui os elementos fibrilares (o fio axial duplo e os dois grupos da substância mitocondrial). Êstes são visíveis na fotografia como sendo a parte preta, indicando que a sua matéria é mais densa. Sendo êste complexo de posição excêntrica, observamos o manto protoplasmático apenas em

um lado, em forma de uma zona mais transparente em virtude da menor densidade do material. Não é possível descrever mais minúscias do espermio em estado integral, em vista dos nossos atuais recursos ópticos.

Considerando os resultados, obtidos pelo estudo da histogênese, podemos concluir, que o espermio possui a seguinte organização, que deve ser aprovada por intermédio de outros métodos:

- a) Acrosoma em forma de um cone, ligeiramente curvado, inserindo-se na extremidade do núcleo;
- b) Núcleo, formando a cabeça, atingindo um comprimento de, aproximadamente, 38 micra. Sua base é incluída por uma parte dos centríolos. Provavelmente, esta formação representa uma inserção forte do fio axial da cauda.
- c) Cauda ou flagelo, com um comprimento médio de 300 micra. Este compõe-se do fio axial duplo, oriundo dos centríolos, e de duas porções de filamentos periféricos, de origem mitocondrial. Fica ainda duvidosa, se a extremidade do fio axial é revestida por protoplasma ou se ela representa, realmente, uma peça terminal nua, pois não foi observado que o fio, durante seu crescimento, sai do revestimento protoplasmático do espermídeo.

A fim de analisar a composição da cauda, o espermio foi submetido a vários processos de maceração, métodos estes que já foram aplicados por BALLOWITZ (10-12), WU et MAKENZIE (2) e outros. Depois das primeiras experiências, deixamos o emprego dos líquidos caústicos (em geral várias concentrações de hidróxidos, ácidos ou NaCl) pois, além do manto protoplasmático, havia destruição, também, do fio axial. Usamos, como método mais suave, água destilada fervida, como meio hipotônico, a fim de provocar uma embebição e desintegração do revestimento do flagelo. Os espermios maduros são tirados da vesícula seminalis e colocados, durante 10 a 40 horas em água destilada, mantendo o preparado numa temperatura de 5° até 8° na geladeira. Observamos que, o fio axial é destruído após 20 horas de exposição. A dilaceração do flagelo em 10 horas de maceração é insuficiente. O tempo mais favorável é entre 16 e 18 horas, sendo nestes preparados o fio axial, em geral, ainda bem conservado mas já dividido em seus dois componentes. Depois de 18 horas, a água é retirada parcialmente, e adicionado um soluto de ácido ósmico a 1% em água, tamponado com p<sub>H</sub> 7,25. Deixamos o ácido gotejar na suspensão, de modo que depois de 1 hora o líquido fixador completa a suspensão até o dôbro; assim a concentração do ácido ósmico é diminuída até aproximadamente 0,5%.

Os espermios, desta maneira fixados e limpos são sombreados com cromo, sob um ângulo de 30°, em alto vácuo, e, em seguida, fotografados no microscópio eletrônico por H. МУТН, a quem agradecemos pela valiosa colaboração.



A maceração já pode ser provocada depois de 50 minutos, e seu resultado observado no microscópio de luz comum sob contraste de fases: coloca-se uma gota de uma suspensão de espermios, em água destilada sobre a lâmina, mantendo-a, como gota pendente, em 25° até 27°. Depois de 50 a 60 minutos, espalha-se a gota e coloca-se a lâmina em uma placa de Petri, com algumas gotas de um soluto de ácido ósmico a 1 ou 2%. A fixação é suficiente depois de 10 a 15 minutos. Observa-se os espermios no mesmo líquido, cobertos por uma lamínula, com imersão a óleo e contraste de fases. O resultado são os aspectos da figura 73, com aparecimento agora de três filamentos. Um destes (FA), em geral, continua em linha reta e em sentido do eixo longitudinal da cabeça (CA), e, provavelmente, corresponde ao fio axial duplo. Os dois outros filamentos são idênticos com os derivados das duas metades da massa mitocondrial (FMI) do espermio; estes, em geral, enrolam-se em espiral irregular, o que indica que no espermio integral fica acumulada uma certa tensão unilateral, que é libertada pela destruição do manto protoplasmático. A identificação dos três filamentos com o fio axial e os complexos mitocondriais é provada pela observação de cortes transversais dos espermios no microscópio eletrônico (veja em baixo). A desintegração do flagelo em três fios, já foi mencionada por BALLOWITZ (10, figs. 18 e 22 do trabalho deste autor) em espermios de *Apis mellifica*, depois de maceração em NaCl.

O material dilacerado em água destilada, e depois sombreado com cromo, é observado no microscópio eletrônico, que dá os seguintes aspectos: em virtude da embibição com o líquido hipotônico, grandes regiões do flagelo desintegram-se em seus componentes mais finos, pois o manto de protoplasma é destruído pela hipertensão, provocada pela intensa entrada de água enquanto que todos os seus derivados, como filamentos e fibrilas, permanecem na sua forma original. As fibrilas do manto protoplasmático aparecem nas fotografias, feitas no microscópio eletrônico, em forma de fios muito delicados, de diâmetros variáveis, e cuja matéria é semitransparente para os raios eletrônicos (figs. 74-76; 78 e 79). Nas partes do flagelo, que em virtude da embibição, sofreram uma dilatação, mas ainda não foram dilaceradas, notamos duas estrias longitudinais, fortemente condensadas (figs. 76 e 77). No momento da dilaceração completa, estas duas estruturas desintegram-se, dando origem à quatro microfibrilas cada uma (fig. 76). Sendo estas estruturas idênticas aos dois derivados dos mitocôndrios, constatamos a presença de oito microfibrilas mitocondriais. O fio axial, aparentemente, é muito sensível contra a água destilada, pois somente é encontrado em material que não permanece mais do que 16 horas na água, ou, aliás, em lugares da cauda que foram fixados no momento do início da dilaceração. Nas figuras 74-77 o fio axial não é conservado pois o material ficou mais do que 20 horas na água destilada. A dilaceração neste caso já cessou, pois os fios mitocondriais não se enrolam tanto como em material que ainda se encontra em plena reação. Nos espermios das figuras 78 e 79 (com 16 horas de maceração), o aspecto é diferente. A dilaceração no momento da fixação está em plena atividade, o que se pode concluir pelos

fios isolados, que se enrolam em espiral. Nas figuras 76-79 observa-se, nitidamente, a desintegração das duas estrias longitudinais, citadas em cima, com o resultado de duas vezes quatro microfibrilas. Na figura 78, o fio axial também mostra sua composição de dois elementos (FA).

Comparamos estas observações com fotografias de cortes transversais da cauda de espermios maduros, feitas no microscópio eletrônico. O material, incluído em metacrilato, foi cortado por H. MUTH num micrótomo para cortes ultrafinos, construído por êste colega. O flagelo deixa observar a sua composição, que consta de um fio axial, de dois corpos em forma de vírgula, e de um revestimento protoplasmático, apenas, parcialmente, conservado nos cortes.

Em certas partes dos cortes, casualmente mais finos, observa-se a estrutura interna dos corpos em forma de vírgula, composto de quatro elementos e incluídos numa massa menos densa (seta na figura 81).

Baseando-se nestes fatos, citados até agora, podemos reconstruir um corte transversal do flagelo (fig. 82). Êste consta de:

- a) fio axial, de posição excêntrica, composto de dois elementos, intimamente fundidos entre si, de modo que aparece um só fio redondo.
- b) dois corpos em forma de vírgula, derivados da massa mitocondrial do espermídeo. Cada um dos corpos possui quatro microfibrilas, incluídas numa massa não diferenciada. Esta, por sua vez, não é idêntica ao citoplasma pois durante a dilatação reage diferente, e tem uma densidade maior do que aquêle. Cada um dos dois corpos é circundado por uma película.
- c) manto protoplasmático, incluindo os três grupos de filamentos, citados em cima, e composto de componentes fibrilares finos, que estão incluídos em citoplasma não diferenciado.

Na figura 86 apresentamos uma reconstrução de um setor da cauda, em três dimensões.

A presença de oito fios mitocondriais no flagelo está em contradição às apresentações de FREY-WYSSLING (13). Êste, em suas comunicações atuais, sôbre a composição de undulipódios em animais e vegetais, generaliza os resultados dizendo, que tôdas estas organelas constam, "quase sem exceção, de 11 microfibrilas", das quais duas, em posição central, pertencem ao fio axial, enquanto que as nove restantes (mitocondriais) estão localizadas na periferia, orientadas sôbre uma linha circular concêntrica. Dos insetos, êle menciona apenas a "barata"; infelizmente, por falta de uma indicação bibliográfica exata, não conseguimos examinar êste fato. Qualquer generalização, a respeito do número dos filamentos mitocondriais, pode ser feita apenas com certas restrições, pois, pelo menos, em *Triatoma infestans* encontra-se, além do duplo fio axial, somente 8 fios mitocondriais. O mesmo dito vale também para a posição dos fios "periféricos", distribuídos em *Triatoma infestans* sôbre dois grupos. Comparamos êstes fatos com o espermio de um Ouriço do Mar, tratado pelos mesmos métodos, como foi citado em cima. Verificamos

neste a presença de um duplo fio axial, de posição central (fig. 87, FA, FA) e de nove fibrilas periféricas, unidas em três grupos de três fibrilas cada um (fig. 87: 1-3; 4-6; 7-9). Provavelmente, o tratamento convencional com hidróxidos, ácidos e sais dilacera, também, as películas que circundam cada corpo em forma de vírgula.

A presença de oito fibrilas mitocondriais nos fagelos dos espermios, não é um achado novo, pois já em 1890 E. BALLOWITZ (14) em *Calathus*, *Hydrophilus piceus* e outras espécies de insetos, bem como K. BALLOWITZ (10), em 1894, em *Gryllus vulgaris* e *Gryllotalpa vulgaris*, encontraram 1 fio duplo central e 8 fios periféricos, conforme os desenhos feitos por eles.

### G. RESUMO

No trabalho apresentado, descrevemos a evolução do espermio maduro de *Triatoma infestans*, iniciando-se a observação das transformações a partir dos espermídeos. Destacamos, em seguida, os principais resultados:

1. A histogênese dos espermios é subdividida em 6 fases que se superpõem, parcialmente, a respeito do cronismo dos acontecimentos celulares:
  - a) Fase de translações (translações dos centríolos, mitocôndrios e do aparelho de GOLGI do pólo apical para o pólo basal da célula).
  - b) Alongamento dos centríolos (formação do filamento axial).
  - c) Alongamento da massa mitocondrial (formação dos fios periféricos).
  - d) Formação do acrosoma (divisão do aparelho de GOLGI em acrosoma e corpo restante, que é eliminado da célula; além disto, translação do acrosoma para o pólo apical).
  - e) Primeira fase de alongamento do núcleo (alongamento do núcleo e condensação da cromatina).
  - f) Segunda fase de alongamento do núcleo (alongamento definitivo do núcleo para formar a cabeça do espermio).
2. Os centríolos, em *Triatoma infestans*, podem ser observados, continuamente, dos estádios da profase (estádio dos cromosomas difusos) até o fim da formação do espermio. Para esta observação precisamos de cortes finos com, aproximadamente, um micron de espessura.
3. Os centríolos, depois da última divisão de maturação, ficam escondidos no interior do corpo dos restos dos fusos.
4. Não se pode distinguir o centríolo distal do proximal. Os dois justapõem-se, um ao lado do outro, sobre a parede do núcleo.
5. O fio axial tem origem dos dois centríolos, sendo este um fio duplo.

6. Observamos a transformação dos mitocôndrios em microfibrilas da cauda bem como a de uma parte do aparelho de GOLGI em acrosoma.
7. Depois da condensação da cromatina sôbre a parede do núcleo, formam-se duas saliências longitudinais cromáticas, que são orientadas em espiral com torsão em sentido inverso do relógio. Por isso, o corte transversal do núcleo, fortemente alongado, tem o aspecto de ferradura.
8. O espermio maduro é composto pelos seguintes elementos, cuja existência é provada, no microscópio eletrônico, por intermédio de cortes e dilacerações:
  - a) Acrosoma (em forma de um cone, ligeiramente curvado).
  - b) Núcleo, formando a "cabeça" do espermio, sem qualquer estrutura visível no seu interior.
  - c) Cone basal do núcleo, formado pelos centríolos.
  - d) Fio axial, composto de duas microfibrilas dos centríolos.
  - e) Oito fios longitudinais mitocondriais, unidos em dois grupos (corpos em forma de vírgula), e incluídos em uma massa homogênea. Cada um dos corpos em forma de vírgula é revestido por uma película.
  - f) Manto protoplasmático, que reveste núcleo e acrosoma, em forma de uma película fina, que no flagelo, entretanto, preenche o espaço entre fio axial e os corpos em forma de vírgula, incluindo perifêricamente, tôda a cauda.
9. Como tudo indica, também, a extremidade do flagelo é revestida por protoplasma de modo que, aparentemente, não existe uma parte extracelular.
10. O comprimento total do espermio é de 300 micra, inclusive a cabeça, com 38 micra de comprimento. Estas medidas oscilam apenas ligeiramente. O diâmetro da cabeça é de 0,5 a 0,6 micra, o da parte central da cauda é de 0,17 a 0,18 micra.

#### H. ZUSAMMENFASSUNG.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung der reifen Spermien von *Triatoma infestans*, ausgehend von den Spermiden, geschildert. Es ergaben sich folgende bemerkenswerte Resultate:

1. Die Histogenese des Spermiums wird in folgende Phasen eingeteilt, die sich zeitweise in ihrem zeitlichen Ablauf ueberdecken:
  - a) Umlagerungsphase (Verlagerung der Centriole, Mitochondrien und des Golgiapparates zur Basis des Kerns).
  - b) Streckung der Centriole (Bildung des Achsenfadens).
  - c) Streckung der Mitochondrialmasse (Bildung der peripheren Faeden).

- d) Bildung des Acrosoms (Teilung des Golgiapparates in Acrosom und Restkoerper, der aus der Zelle ausgestossen wird; ausserdem Verlagerung des Acrosoms zum Apikalpol).
  - e) Erste Streckungsphase des Kerns (Streckung des Kerns und Kondensierung des Chromatins).
  - f) Zweite Streckungsphase des Kerns (endgueltige Streckung des Kerns, der den Spermienkopf bildet).
2. Die Centriole koennen bei *Triatoma infestans* von den Stadien der Prophase (Stadium der diffusen Chromosome) bis zum Schluss der Spermienbildung verfolgt werden. Hierzu sind Duennschnitte um 1 micron fuer das Lichtmikroskop erforderlich.
  3. Die Centriole verbergen sich nach der letzten Reifungsteilung im Spindelrestkoerper.
  4. Die Centriole sind nicht in distales und proximales zu differenzieren. Beide legen sich, eng aneinander gerueckt, der Kernwand an.
  5. Die Bildung des Achsenfadens erfolgt von beiden Centriolen, so dass er als Doppelfaden gebildet wird.
  6. Es wird der Uebergang der Mitochondrien in die Geisselfaeden und die Umwandlung eines Teils des Golgiapparates in das Acrosom verfolgt.
  7. Nach der Kondensierung des Chromatins an der Kernwand bilden sich an dieser zwei spiralig gewundene Laengswuelste aus Chromatin. Hierdurch erfahrt der Querschnitt des staerker gestreckten Kerns ein hufeisenfoermiges Aussehen.
  8. Das fertige Spermium baut sich aus folgenden Elementen auf, die an Hand von Dilazerationen und Schnitten im Elektronenmikroskop nachgeprueft wurden:
    - a) Acrosom, in Form eines kurzen, etwas gebogenen Kegels.
    - b) Kern, ohne feinere Stuktur im Inneren.
    - c) Basalkegel des Kerns, aus den Centriolen gebildet.
    - d) Axialfaden, aus zwei Mikrofibrillen der Centriole aufgebaut.
    - e) Acht mitochondriale Laengsfaeden, die in zwei Gruppen (kommafoermige Koerper) zusammengefasst und in einer homogenen Masse eingebettet sind. Jeder dieser Koerper ist von einer Pellicula ueberzogen.
    - f) Protoplasmamantel, der Acrosom und Kern als duenne Pellicula ueberzieht, in der Geissel jedoch den Raum zwischen Axialfaden und Komma-Koerper ausfuellt und die gesamte Geissel einhuellt.
  9. Allem Anschein nach ist auch das Endstueck der Geissel von Protoplasma umhuellt, so dass ein extrazellularer Teil der Geissel nicht zu bestehen scheint.

10. Die Laenge des Spermiums betraegt etwa 300 micra, wovon 38 micra auf den Kopf entfallen. Die Laenge schwankt nur in geringem Masse. Der Durchmesser des Kopfes liegt bei 0,5-0,6 micra, der des Mittelstueckes bei 0,17-0,18 micra.

### I. ABREVIACÕES NAS FIGURAS.

As abreviações, não contidas nas legendas das figuras, indicam:

ACR	Acrosoma
AG	Arco maior
AL	Aresta longitudinal
AP	Arco menor
CO	Centríolo
FA	Fibrila axial
FC	Fibrila axial
FMI	Fibrilas mitocondriais
GO	Aparelho de Golgi
GOR	Restos do aparelho de Golgi
HE	Heterocromosoma
MI	Mitocôndrios
PRT	Protoplasma pericaudal
RF	Restos dos fusos
TE	Tétrades

Nos casos em que a legenda não indique outro aumento, significa que todas as figuras foram desenhadas com um aumento de 3 450 vezes.

### K. BIBLIOGRAFIA.

1. BARTH, R., 1956, Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). V. Parte: Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Osw. Cruz, 54: 135-229, 113 figs.
2. WU, S. F. et MCKENZIE, F., 1954, Electron Microscopic Study of Spermatozoa. Science, 119: 212-213.
3. V. LA VALETTE ST. GEORGE, A., 1885-1887, Spermatologische Beiträge Arch. mikrosk. Anat., Vols. 25 e 30.
4. MEVES, F., 1900, Ueber den von v. La Valette St. George entdeckten Nebenkern (Mitochondrienkoerper) in Samenzellen. Arch. mikrosk. Anat., Vol. 56.
5. OTTE, H., 1907, Samenreifung und Samenbildung bei *Locusta viridissima*. Zool. Jb. (Anat.), 24: 431-520, 2 figs., 3 pl.
6. MEVES, F., 1902, Ueber oligoprene und apyrene Spermien von *Paludina* und *Pygaera*. Arch. mikrosk. Anat., Vol. 61.
7. BONNEVIE, K., 1905, Das Verhalten des Chromatins in den Keimzellen von *Enteroxenos*. Anat. Anz., Vol. 26.
8. BONNEVIE, K., 1906, Beobachtungen an den Keimzellen von *Enteroxenos*. Jena. Z. Naturw., Vol. 41.

9. BOWEN, H. R., 1924, Studies on insect spermatogenesis. Journ. of Morph., Vol. 39.
10. BALLOWITZ, K., 1924, Zur Kenntnis der Samenkoerper der Arthropoden. Z. f. Anat. Physiol., Vol. 11.
11. BALLOWITZ, E., 1891, Weitere Beobachtungen ueber den feineren Bau der Saeugethierspermatozoen. Z. wiss. Zool., Vol. 52  
(com indicação da bibliografia mais antiga do mesmo e de outros autores).
12. BALLOWITZ, E., 1894, Bemerkungen zu der Arbeit von Dr. phil. Karl Ballowitz. Z. f. Anat. Physiol., Vol. 11
13. FREY-WYSSLING, A., 1955, Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Em: Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung. Vol. II A2, Wien 1955  
(O trabalho contém a bibliografia antiga e recente).
14. BALLOWITZ, E., 1890, Die Spermatozoen der Insekten (I. Coleopteren). Zeitschr. wiss. Zool., Vol. 50.

### ESTAMPA 1

Fig. 1: Esquema de um folículo em corte longitudinal para indicar as zonas das modificações das células germinativas até a formação do espermio maduro. Explicações veja no texto.

Fig. 1 — Schema eines Follikels im Laengsschnitt, um die Zonen der Modifikationen der Keimzellen bis zur Bildung des reifen Spermiums zu zeigen. Erklarungen siehe Text.



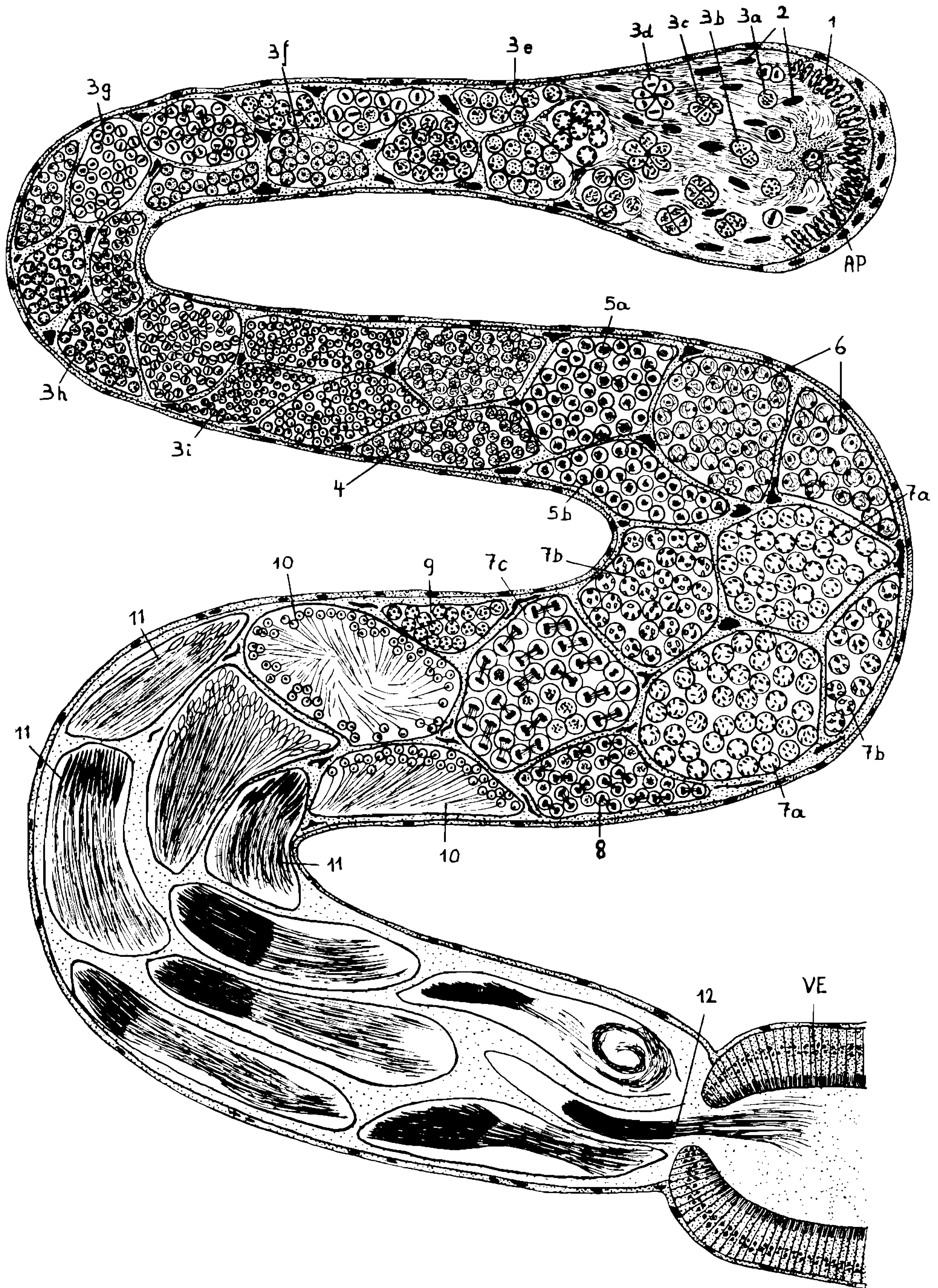


Fig. 1

## ESTAMPA 2

- Fig. 2: Espermiócitos em fase dos cromosomas difusos. A célula à esquerda em corte mediano; a célula à direita em corte tangencial. O corpo cromático condensado inclui os cromosomas A, B, C, x e y (heteropicnóticos).
- Fig. 3: Microfotografia de uma parte de um cisto contendo espermiócitos na fase dos cromosomas difusos. Aumento de 450 vêzes.
- Fig. 4: Microfotografia de uma parte de um cisto contendo espermiócitos em fase inicial da formação de tétrades (diacínese). Aumento de 450 vêzes.
- Fig. 5: Microfotografia de uma parte de um cisto contendo espermiócitos em fase da dissolução do corpo heteropicnótico, com tétrades dos pequenos autosomas (AU). Aumento 450 vêzes.

Fig. 2 — Espermiocyte in der Phase der diffusen Chromosomen. Die Zelle links im medianen Schnitt; rechts im Tangentialschnitt. Der dichte Chromatinkoerper schliesst die Chromosomen A, B, C, x und y (heteropycnotische) ein.

Fig. 3 — Microfografie eines Teils einer Zyste mit Spermiozyten in der Phase der diffusen Chromosomen. Vergroesserung 450 fach.

Fig. 4 — Microfografie eines Teils einer Zyste mit Spermiocyten in der Anfangsphase der Tetradenbildung (Diakinese). Vergroesserung 450 fach.

Fig. 5 — Microfografie eines Teils einer Zyste waehrend der Aufloesung des heteropycnotischen Koerpers mit Tetraden der kleinen Autosomen (AU). Vergroesserung 450 fach.

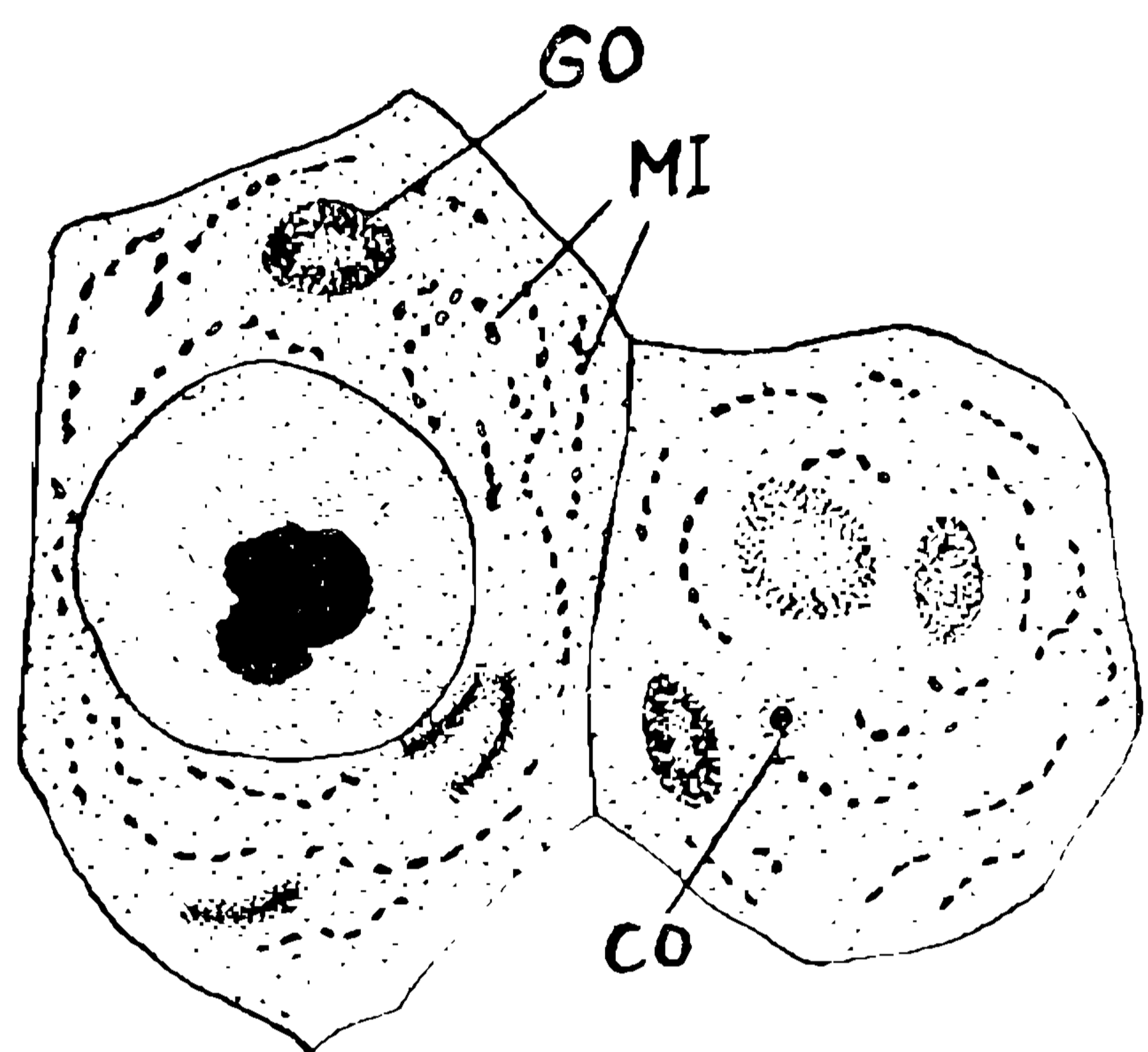


Fig. 2

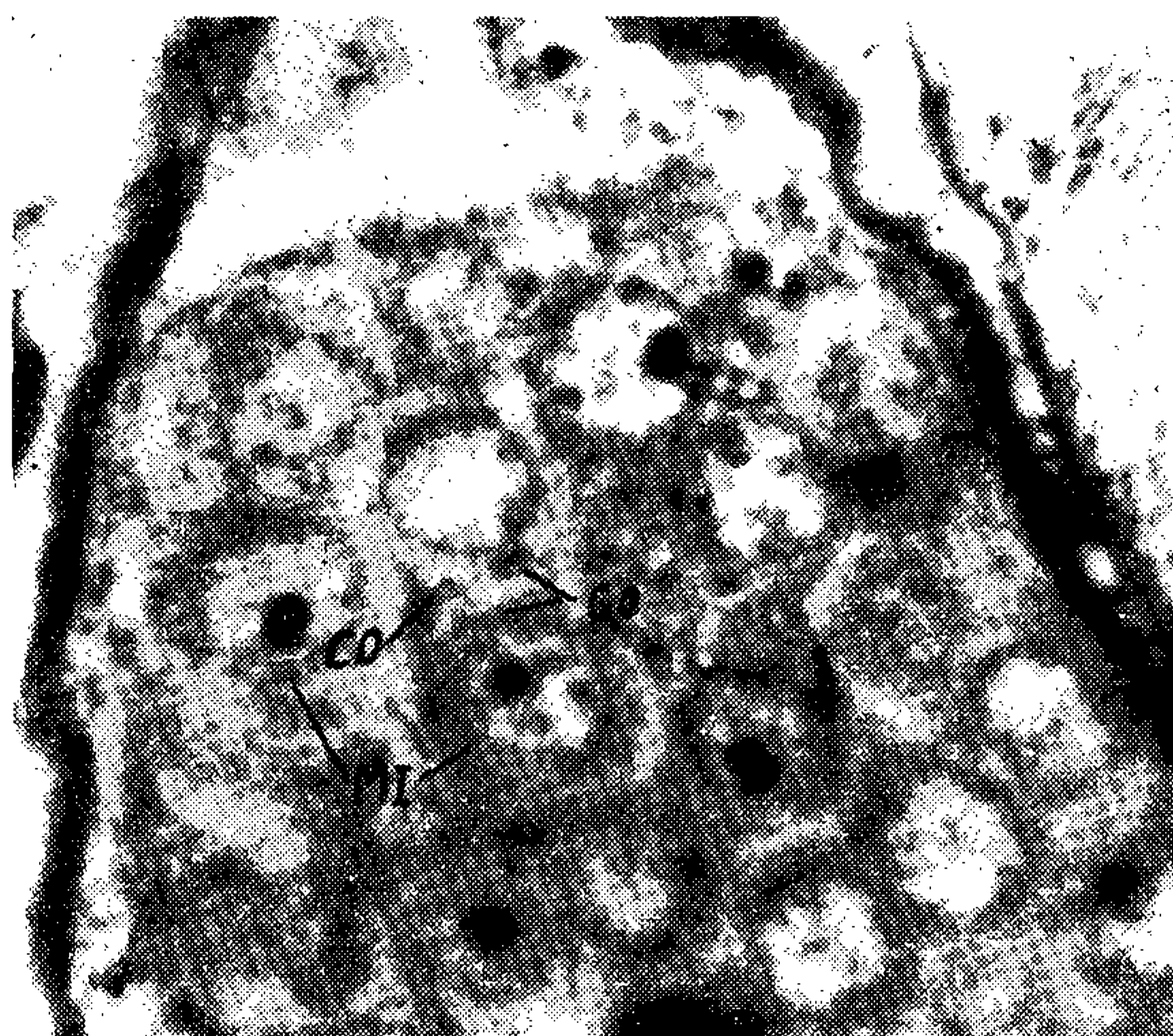


Fig. 3

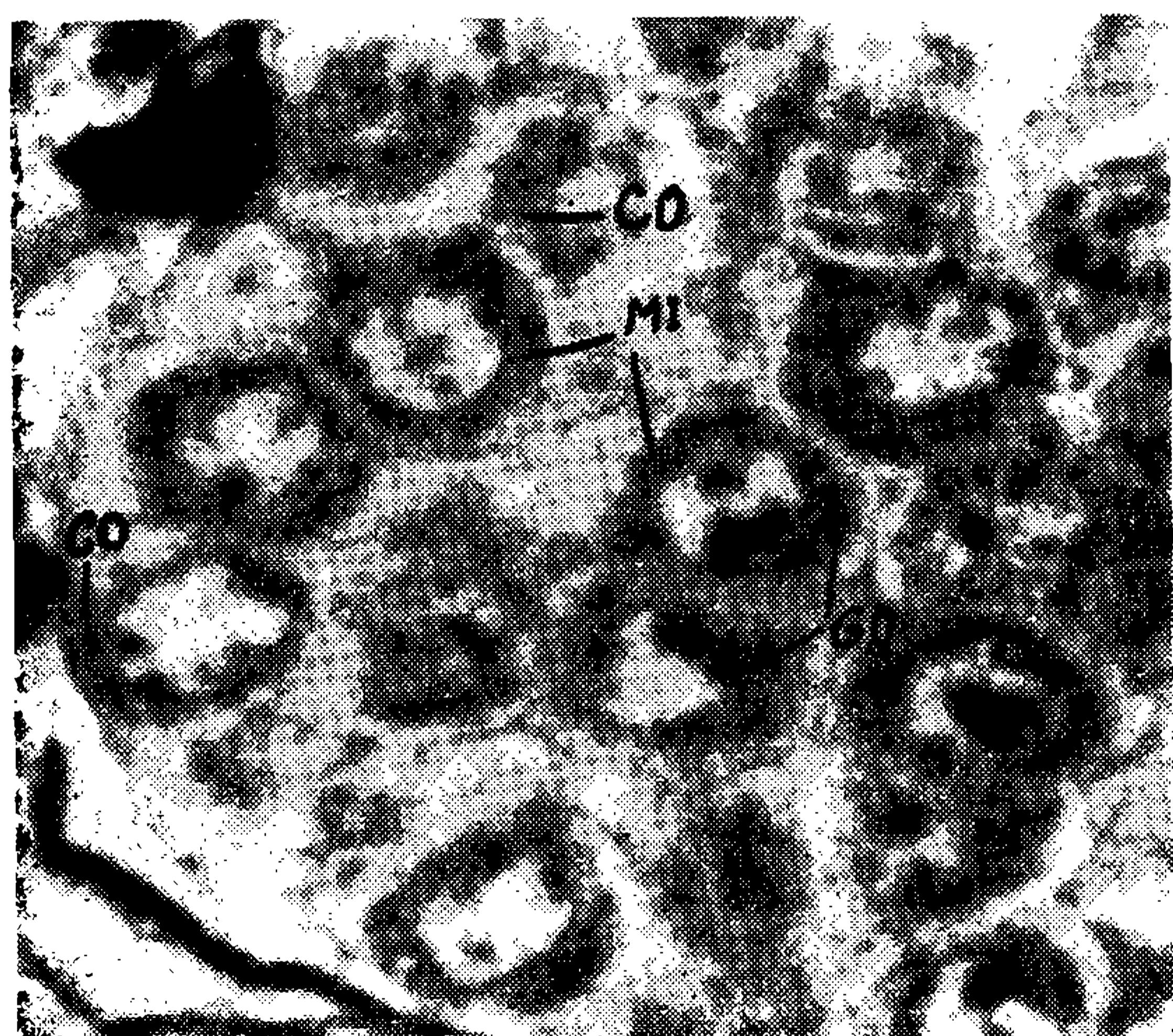


Fig. 4



Fig. 5

### ESTAMPA 3

- Fig. 6: Espermiócito na fase de diacinese contendo tétrades perfeitas e dois centríolos em posição oposta.
- Fig. 7: Placas equatoriais da primeira divisão de maturação.
- Fig. 8: Placas equatoriais da segunda divisão de maturação.
- Fig. 9: Segunda divisão de maturação; à esquerda o pólo dos fusos com o centríolo já duplicado; à direita, em aspecto lateral, com dois cromosomas e os centríolos duplos (parcialmente em superposição), e com o aparelho de Golgi e mitocôndrios; êstes acumulados no plano equatorial.
- Fig. 10: Microfotografia de metafase da primeira divisão de maturação. Aumento 450 vêzes.
- Fig. 11: Microfotografia da metafase da segunda divisão de maturação. Aumento 450 vêzes.

Fig. 6 — Spermioocyte in Diakinese mit vollstaendigen Tetraden und zwei sich gegeneberstehenden Centriolen.

Fig. 7 — Aequatorialplatten der ersten Reifeteilung.

Fig. 8 — Aequatorialplatten der zweiten Reifeteilung.

Fig. 9 — Zweite Reifeteilung; links der Spindelpol mit schon verdoppeltem Centriol; rechts, in Seitenansicht, mit zwei Chromosomen und den doppelten Centriolen (teilweise ueberlagert), sowie mit Golgiapparat und Mitochondrien; letztere sind in der Aequatorialgegend angereichert.

Fig. 10 — Microfotografie der Metaphase der ersten Reifeteilung. Vergroesserung 450 fach.

Fig. 11 — Microfotografie der Metaphase der zweiten Reifeteilung. Vergroesserung 450 fach.

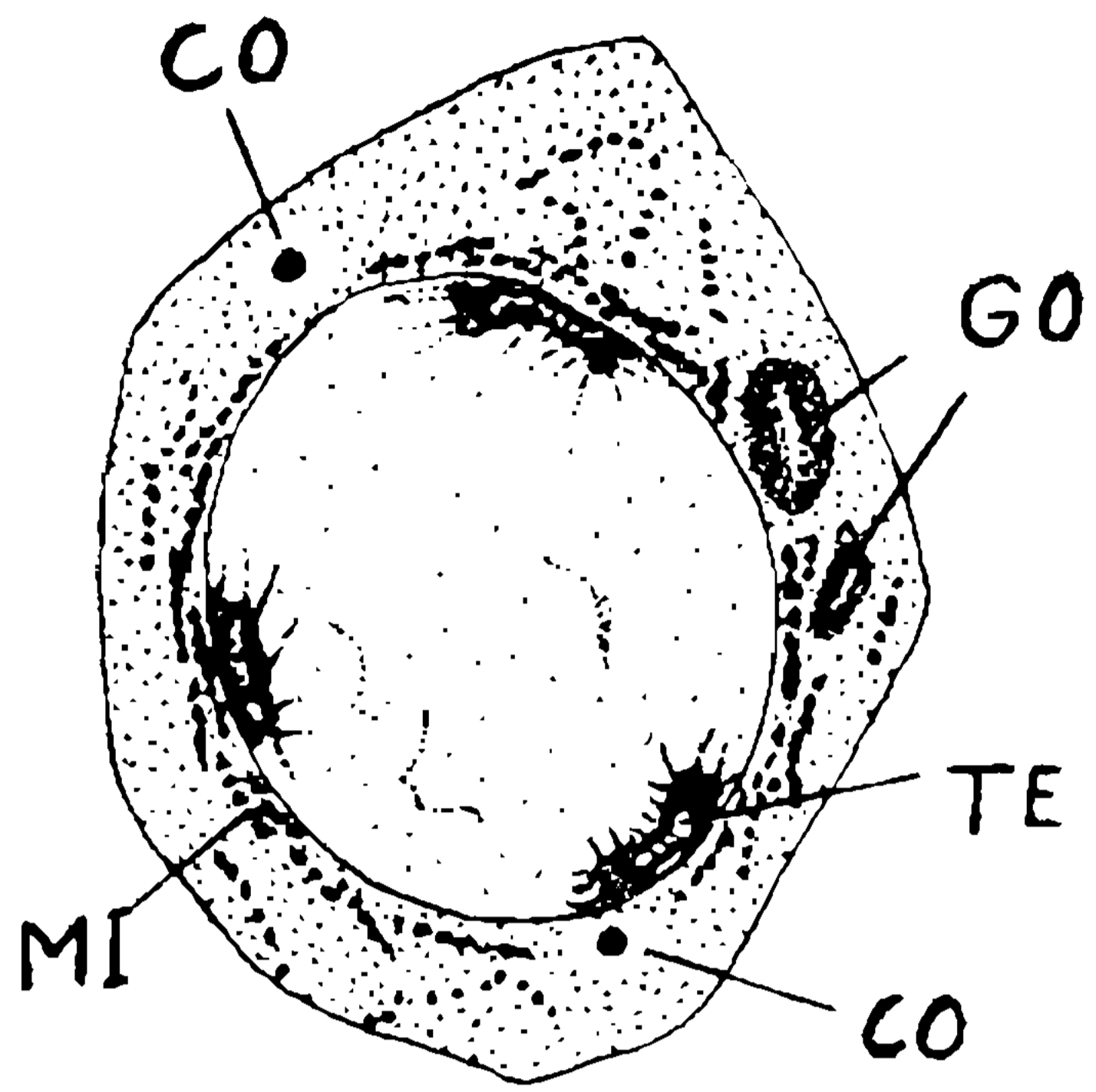


Fig. 6

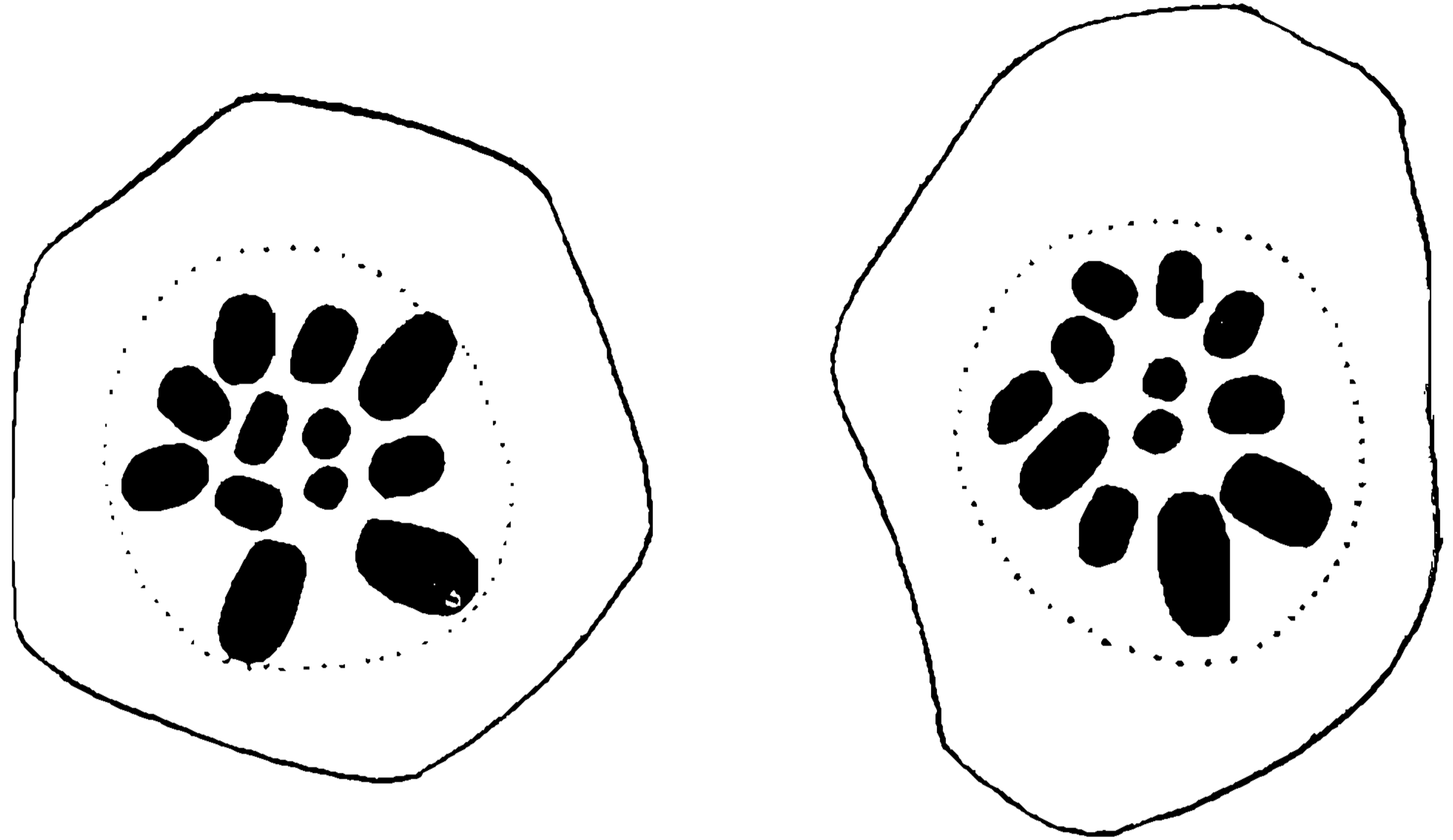


Fig. 7

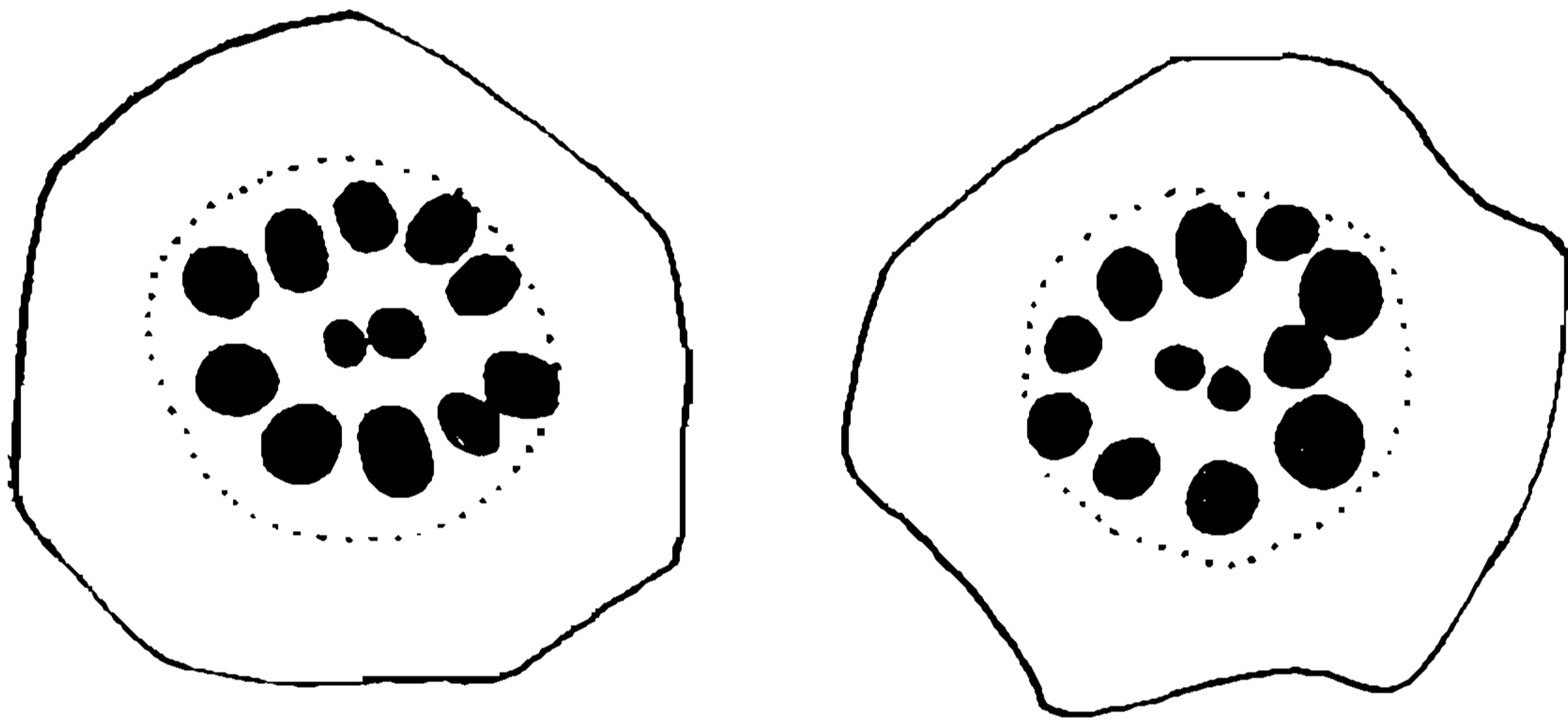


Fig. 8

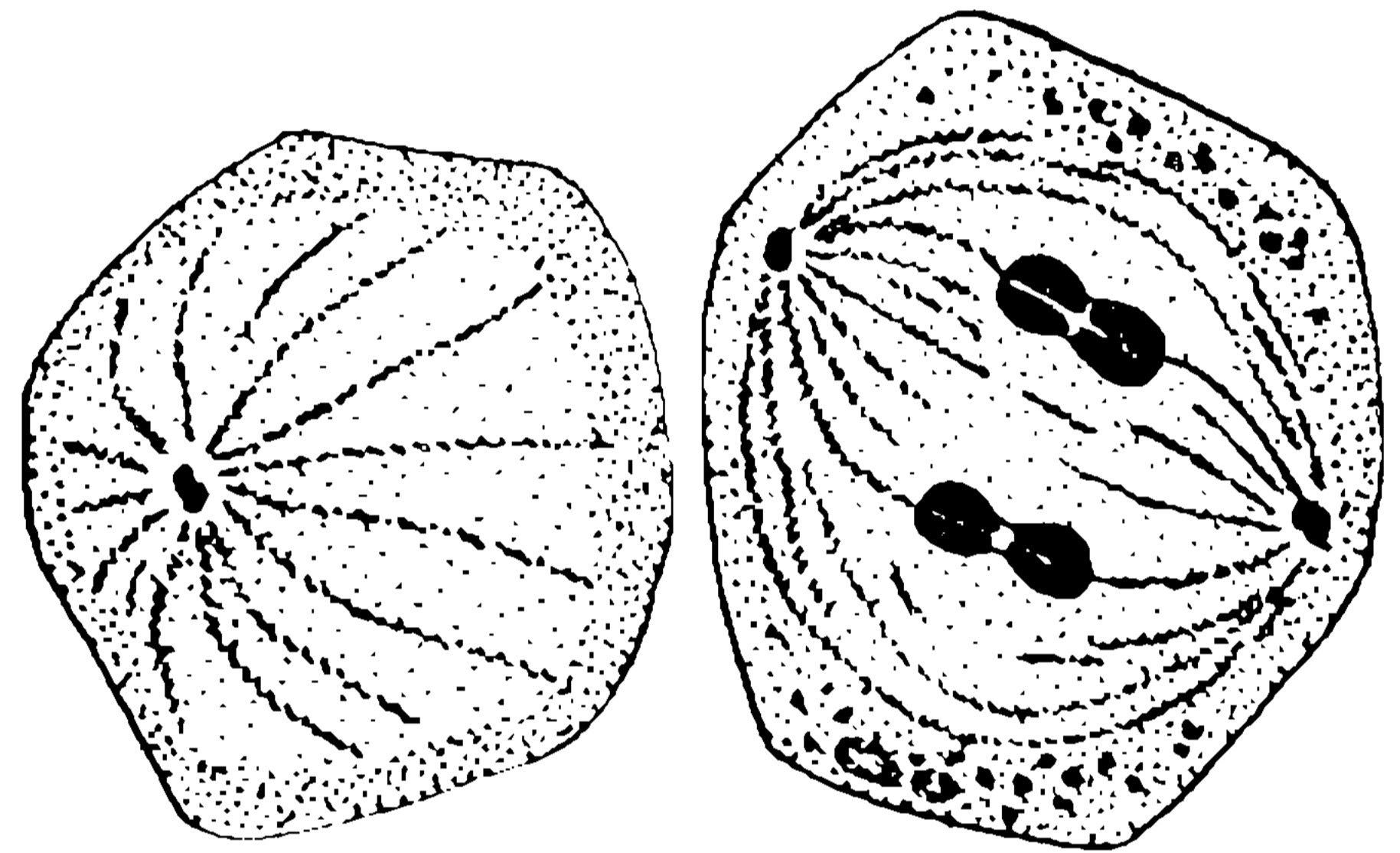


Fig. 9

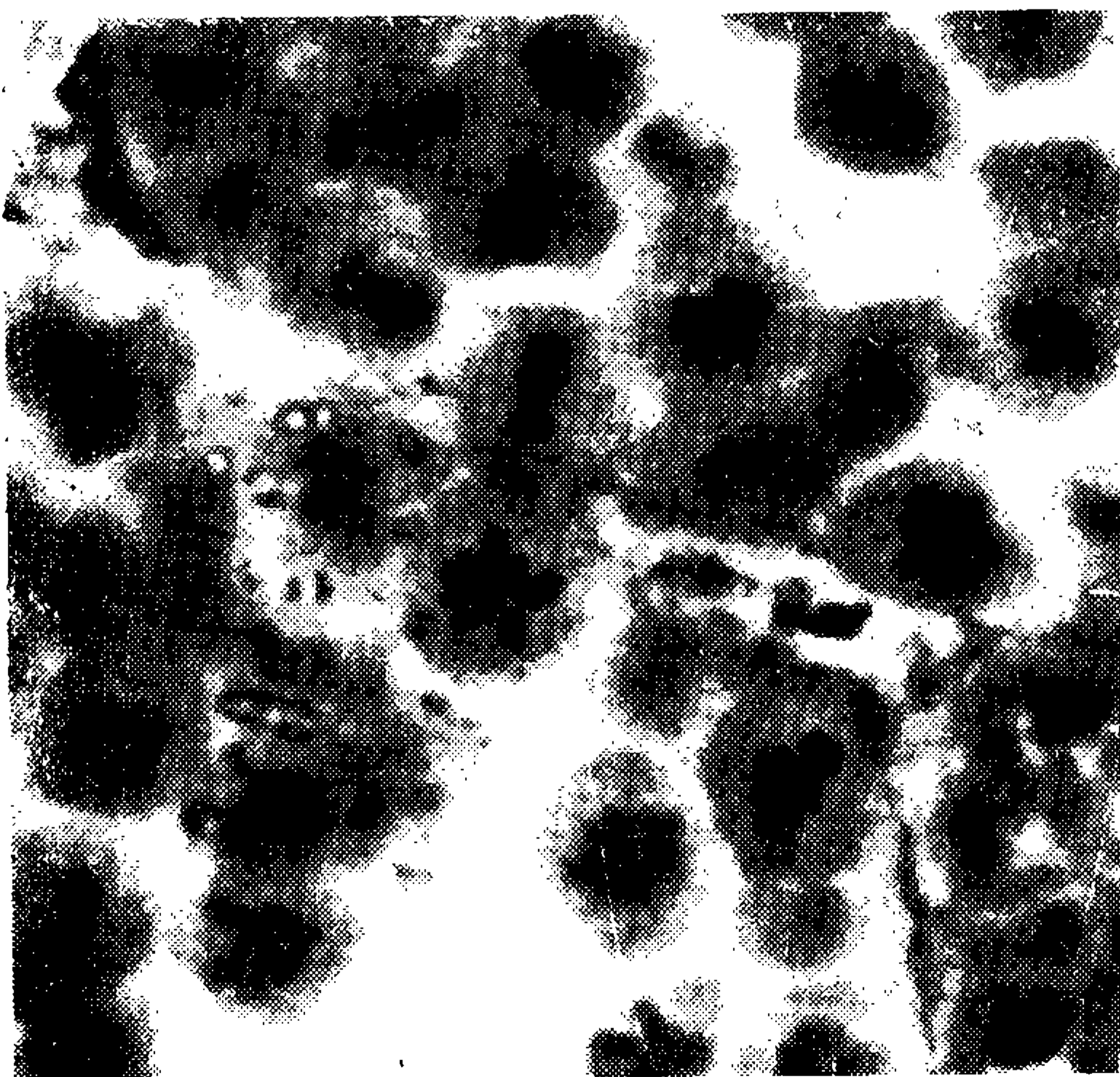


Fig. 10

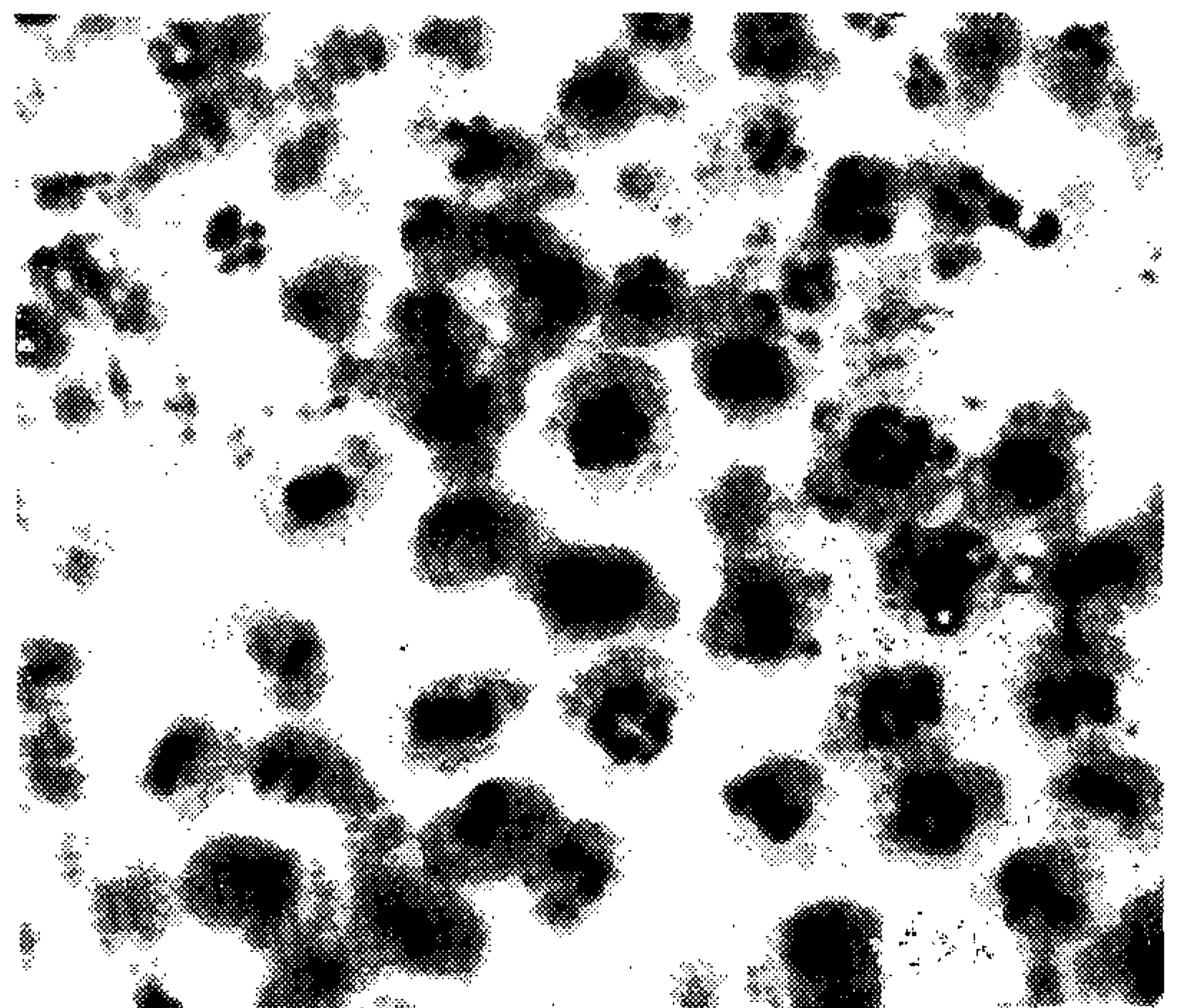


Fig. 11

#### ESTAMPA 4

- Fig. 12: Microfotografia da segunda divisão de maturação com estados em metafase (M) e em anafase(A). Aumento 450 vezes.
- Fig. 13: Telofase da segunda divisão de maturação. As duas partes do centríolo em superposição.
- Fig. 14: Telofase da segunda divisão de maturação. Em baixo o pólo da célula visto de cima. ZDI — divisão celular da primeira divisão de maturação.
- Fig. 15: Telofase da segunda divisão de maturação em fase final com os centríolos dentro da massa de fusos, estágio depois da torsão dos núcleos.
- Fig. 16: Espermídeos. A célula direta em corte equatorial; a da esquerda somente a porção superior com o centríolo duplo.
- Fig. 17: Núcleos de espermídeos recém-formados.

Fig. 12 — Microfotografie der zweiten Reifungsteilung mit Metaphasestadien (M) und Anaphasestadien (A). Vergrößerung 450 fach.

Fig. 13 — Telophase der zweiten Reifeteilung. Die beiden Teile des Centriols sind uebereinander gelagert.

Fig. 14 — Telophase der zweiten Reifungsteilung. Unten der Zellpol von oben. ZDI — Zellteilung der ersten Reifungsteilung.

Fig. 15 — Telophase der zweiten Reifungsteilung mit den Centriolen innerhalb der Spindelmasse, Stadium nach der Drehung der Kerne.

Fig. 16 — Spermiden. Die Zelle rechts im Aequatorialschnitt, links nur der obere Zellteil mit dem doppelten Centriol.

Fig. 17 — Kerne junger Spermiden.

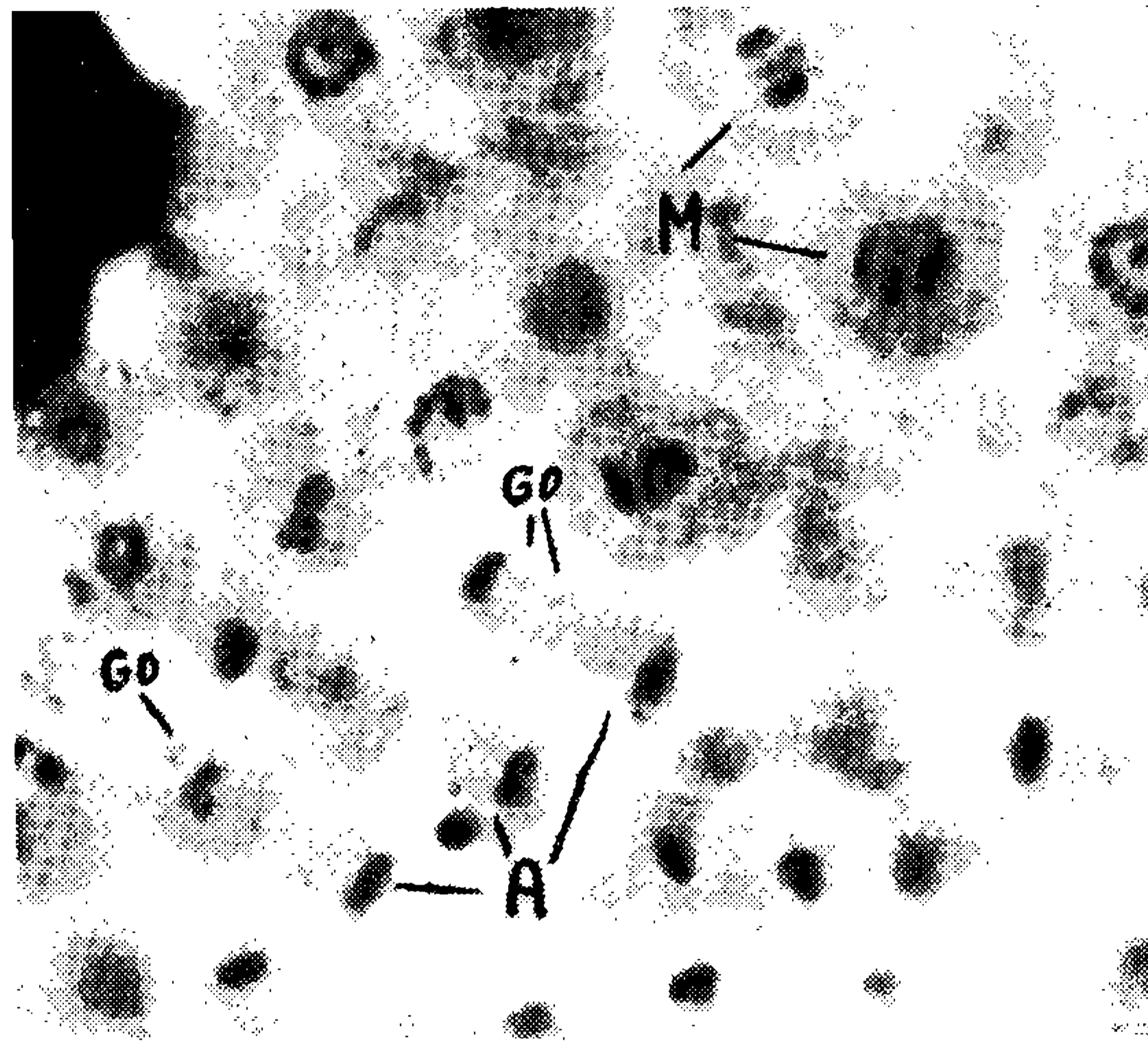


Fig. 12

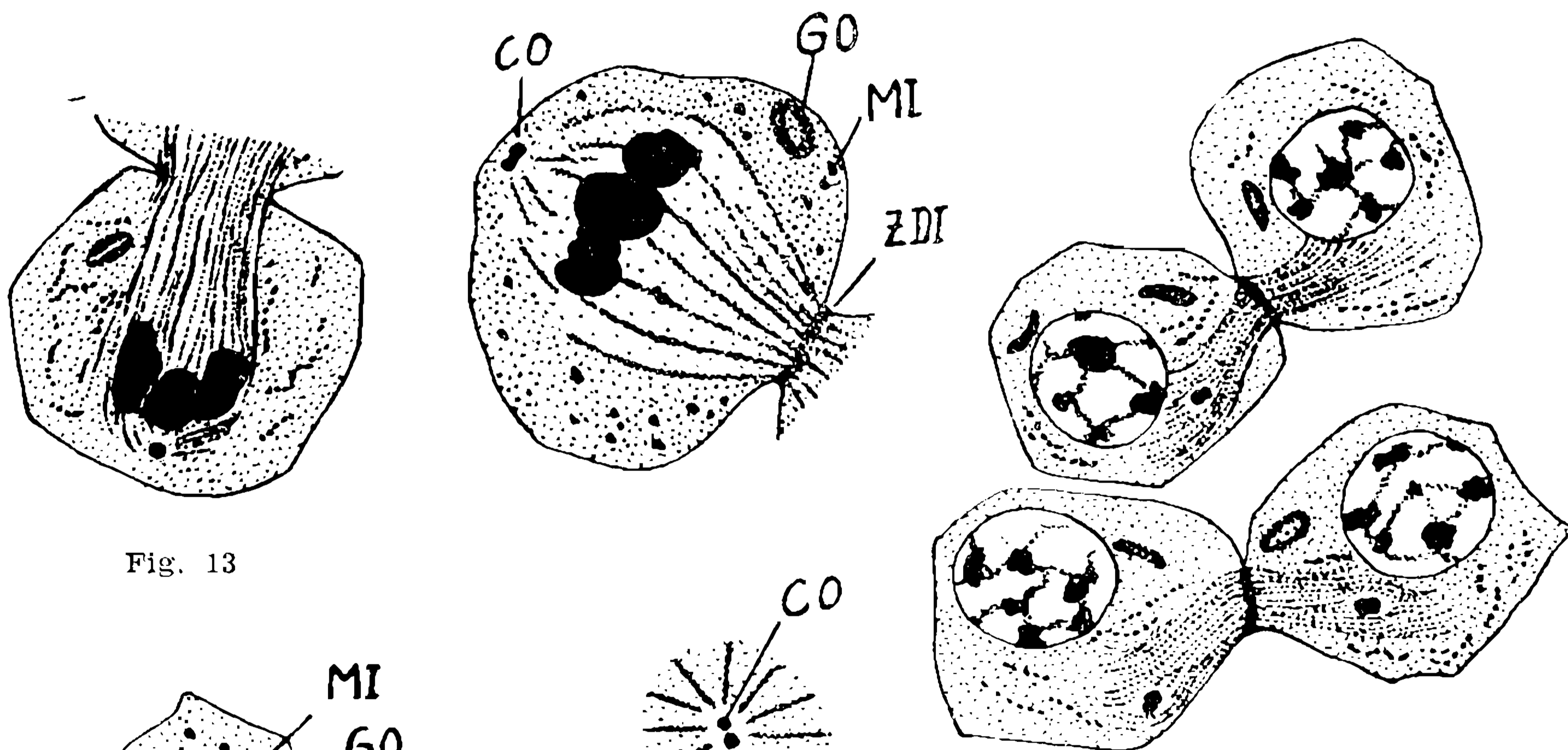


Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

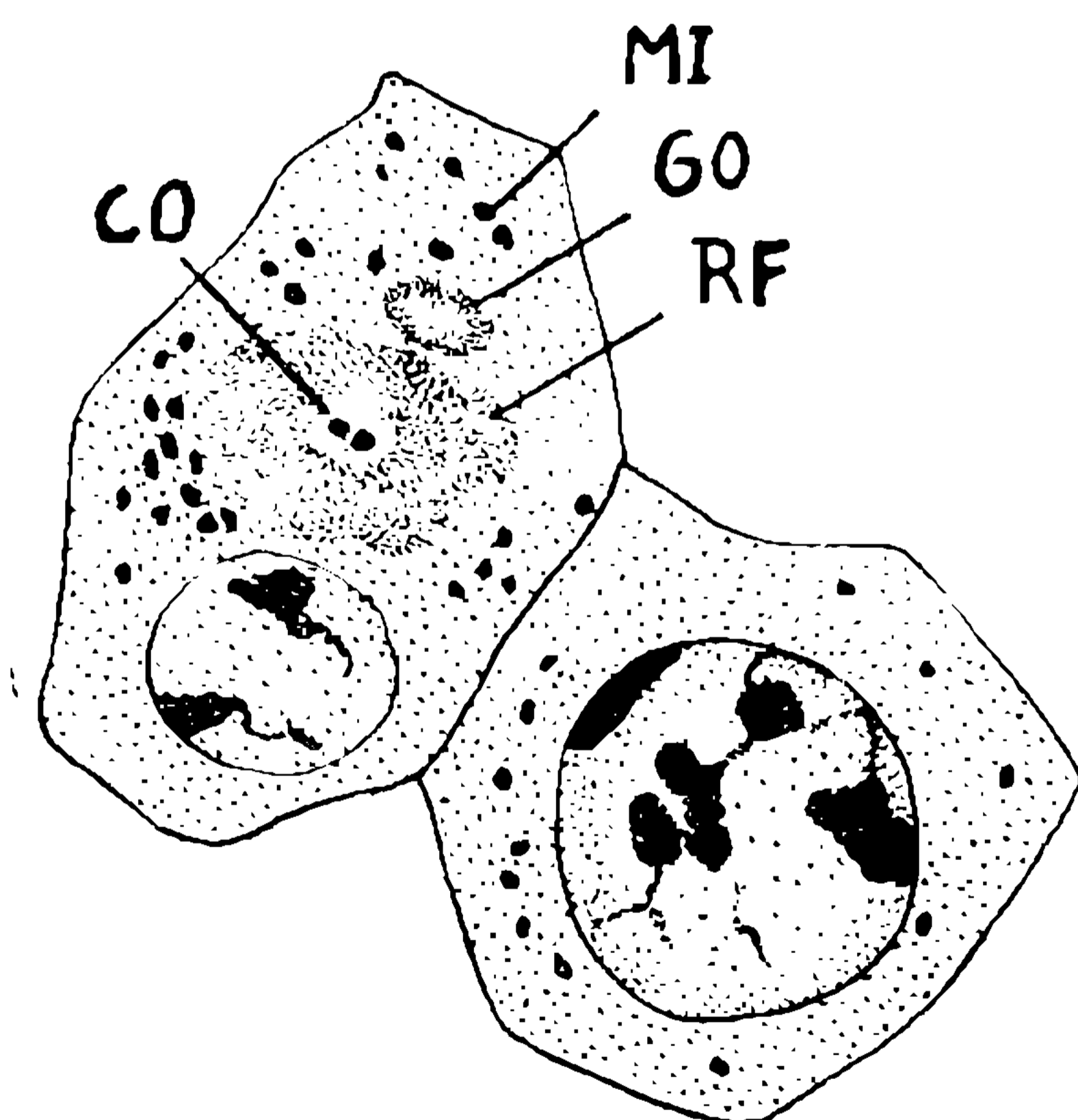


Fig. 16

Fig. 17

## ESTAMPA 5

- Fig. 18: Núcleos de espermídeos depois da translação da cromatina para a parede do núcleo.
- Fig. 19: Microfotografia de espermídeos recém-formados (em cima) e durante o período de crescimento (em baixo). Chamamos a atenção para a diferença entre os diâmetros dos núcleos das duas formas. Aumento 450 vezes.
- Fig. 20: Espermídeo antes da fase de translação dos componentes protoplasmáticos. O heterocromosoma (HE) ainda condensado; os autosomas em desintegração.
- Fig. 21: Espermídeos na fase de translação dos componentes protoplasmáticos. a) Aparelho de Golgi, restos dos fusos e mitocôndrios no futuro pólo basal; o centríolo duplo ainda em posição apical. b) O centríolo duplo translocando-se para o pólo basal. c) Todos os componentes no pólo basal. d) Aparelho de Golgi e centríolo duplo no pólo basal do espermídeo.

Fig. 18 — Spermidenkerne nach der Verlagerung des Chromatins an die Kernwand.

Fig. 19 — Microfotografie junger Spermiden (oben) und Spermiden waehrend des Wachstums (unten). Es wird auf die Differenz der Durchmesser der Kerne beider Formen aufmerksam gemacht. Vergroesserung 450 fach.

Fig. 20 — Spermide vor der Verlagerung der Protoplasmakomponenten. Das Heterochromosom noch kondensiert (HE), die Autosomen in Zerfall.

Fig. 21 — Spermiden waehrend der Umlagerung der Protoplasmakomponenten. a) Golgiapparat, Spindelfaserrest und Mitochondrien am spaeteren basalen Zellpol; das doppelte Centriol noch in apikaler Stellung. b) Das Doppelcentriol verlagert sich zum basalen Zellpol. c) Alle Komponenten befinden sich am basalen Pol. d) Golgiapparat und Centriolen am basalen Pol der Spermide.



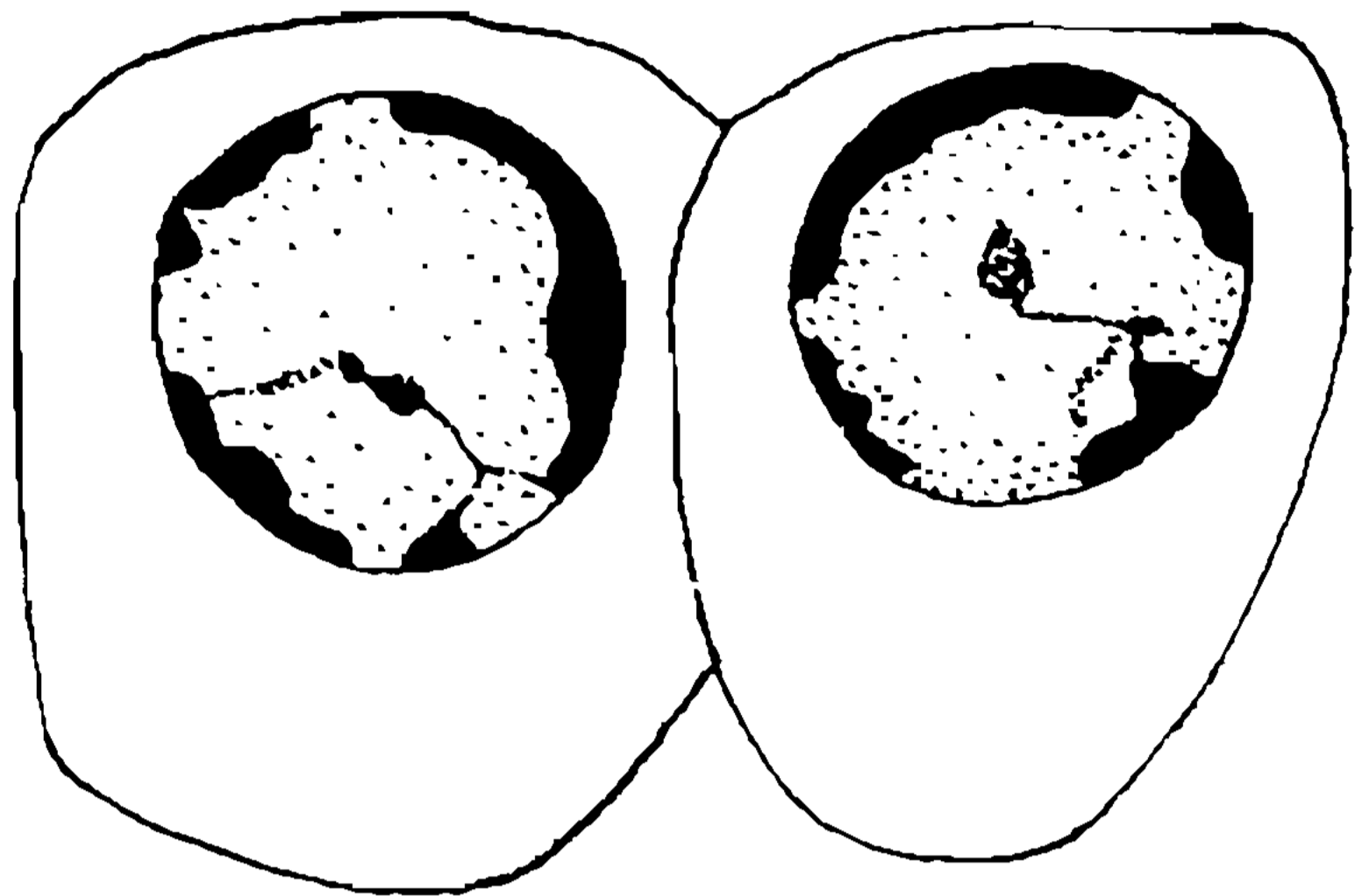


Fig. 18

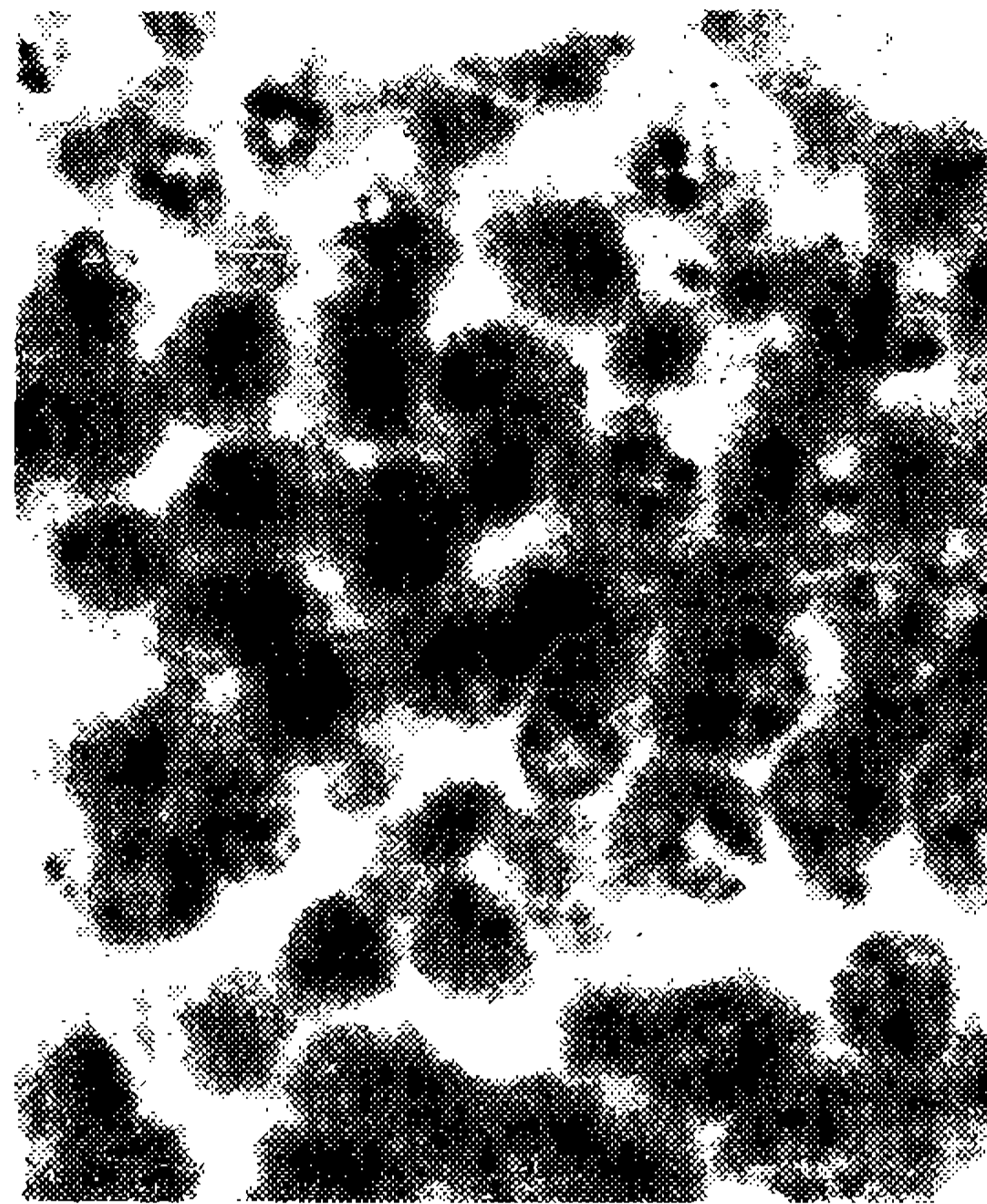


Fig. 19

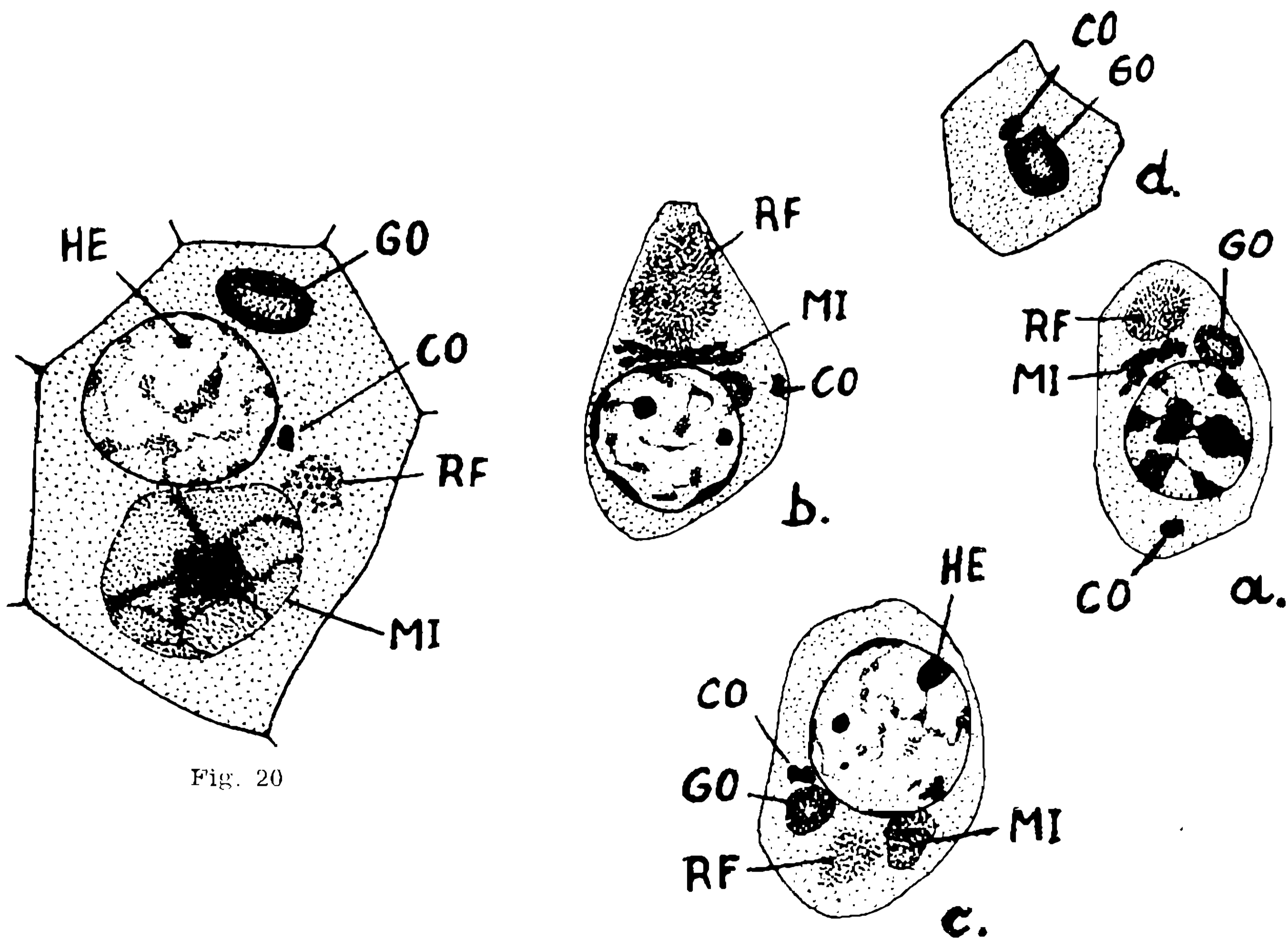


Fig. 20

Fig. 21

## ESTAMPA 6

- Fig. 22: Espermídeos no início da fase de alongamento. Aparelho de Golgi ainda não condensado.
- Fig. 23: Espermídeo no início da fase de alongamento com os vestígios da massa de fusos (RF).
- Fig. 24: Espermídeo no início da fase de alongamento.
- Fig. 25: Espermídeo no início da fase de alongamento.
- Fig. 26: Corte transversal do espermídeo do estadio da figura 25.
- Fig. 27: Espermídeo na fase de alongamento com aparelho de Golgi e mitocôndrios em posição irregular no ápice da célula. À esquerda três diferentes aspectos do corpo mitocondrial em estado de condensação.
- Fig. 28: Espermídeo alongado, e corte transversal na altura dos mitocôndrios.

Fig. 22 — Spermiden im Anfang der Streckungsphase. Golgiapparat noch nicht kondensiert.

Fig. 23 — Spermide im Anfang der Streckungsphase mit Resten der Spindelfasern.

Fig. 24 — Spermide im Anfang der Streckungsphase.

Fig. 25 — Spermide im Anfang der Streckungsphase.

Fig. 26 — Querschnitt durch eine Spermide im Stadium der Figur 25.

Fig. 27 — Spermide in der Streckungsphase; Golgiapparat und Mitochondrien in unregelmässiger Stellung am oberen Zellpol. Links drei verschiedene Stadien des mitochondrialen Koerpers im Stadium der Kondensation.

Fig. 28 — Gestreckte Spermide und ihr Querschnitt in der Hoehe der Mitochondrienmasse.

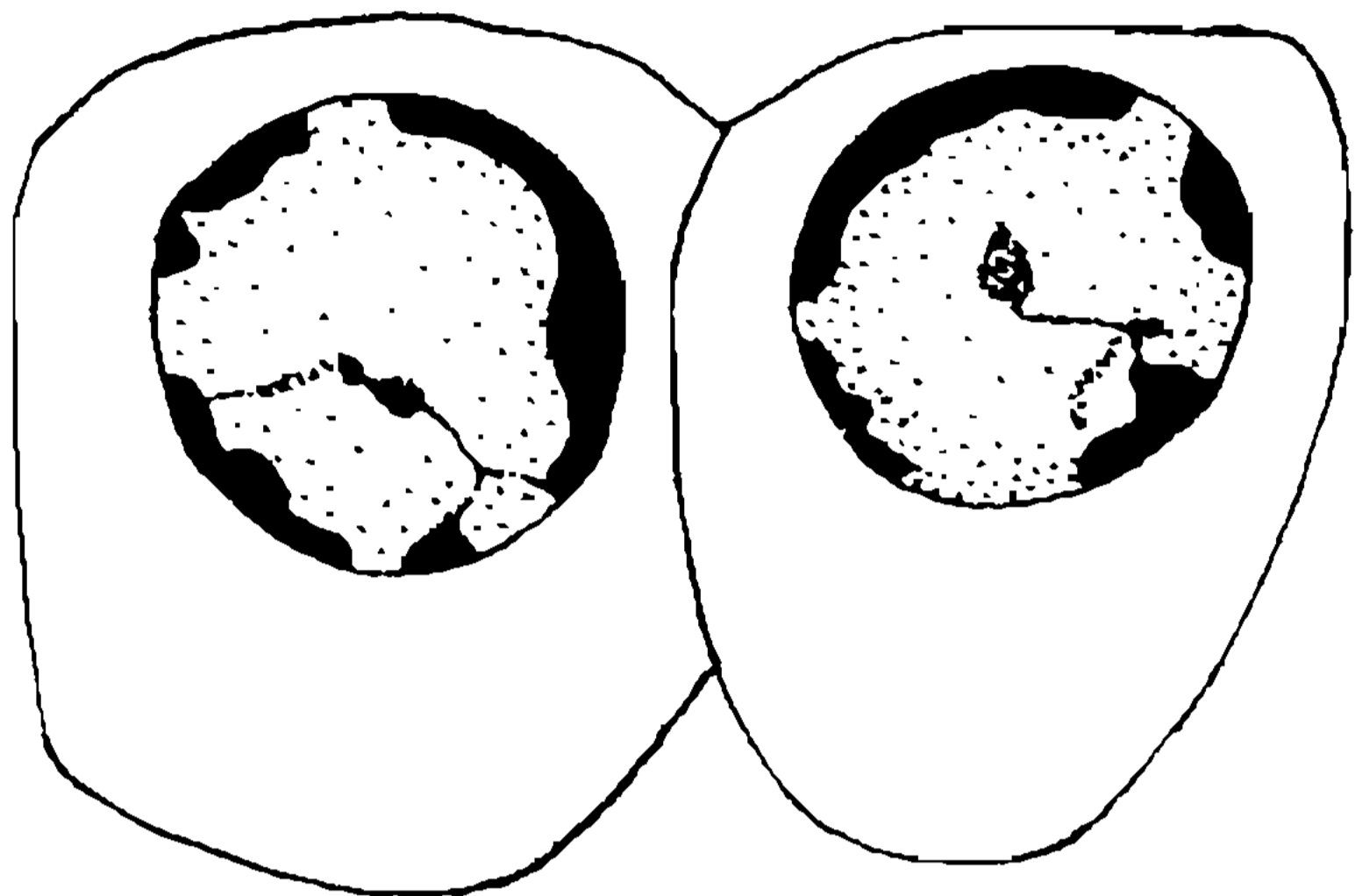


Fig. 18

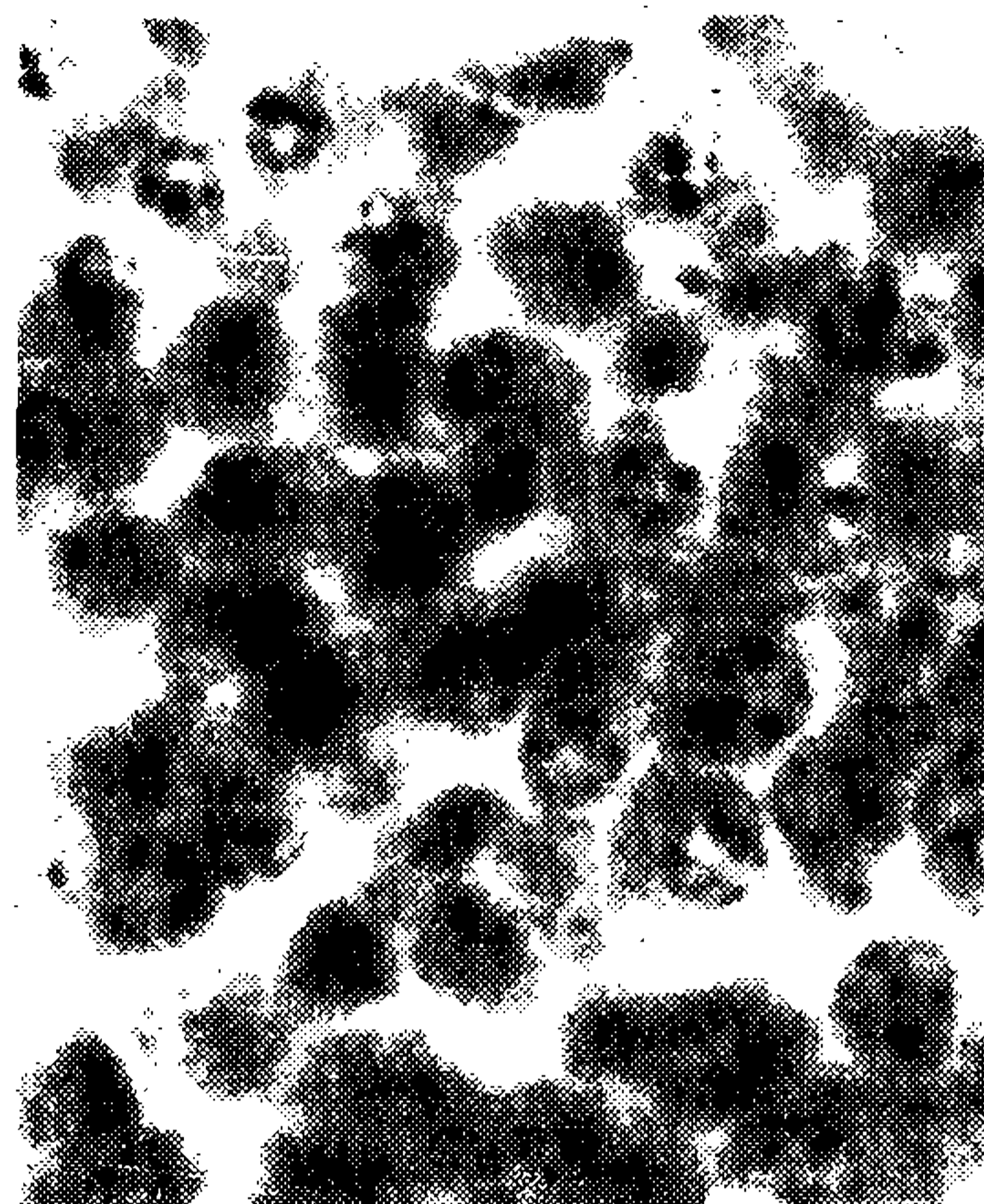


Fig. 19

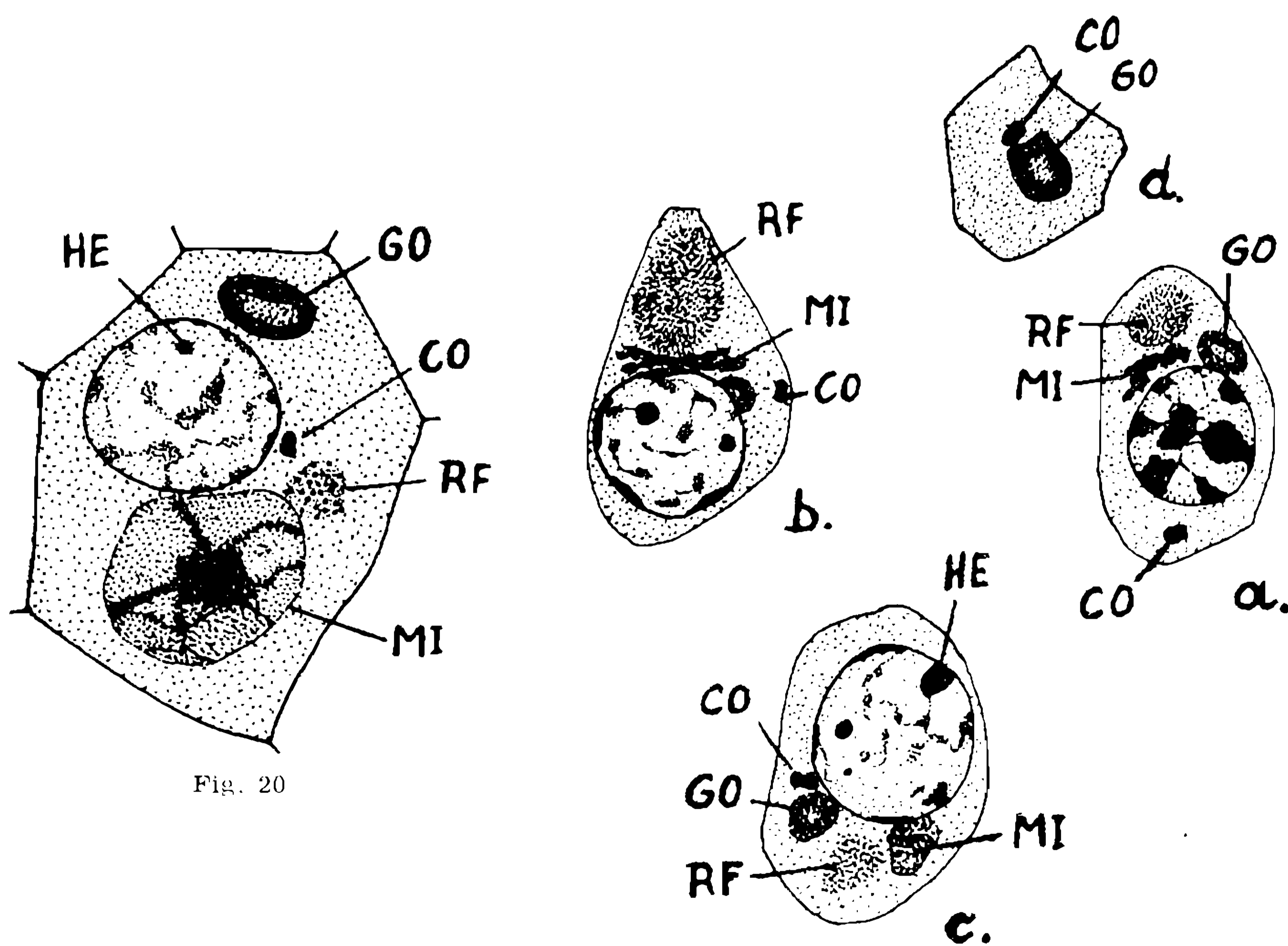


Fig. 20

Fig. 21

## ESTAMPA 6

- Fig. 22: Espermídeos no início da fase de alongamento. Aparelho de Golgi ainda não condensado.
- Fig. 23: Espermídeo no início da fase de alongamento com os vestígios da massa de fusos (RF').
- Fig. 24: Espermídeo no início da fase de alongamento.
- Fig. 25: Espermídeo no início da fase de alongamento.
- Fig. 26: Corte transversal do espermídeo do estadio da figura 25.
- Fig. 27: Espermídeo na fase de alongamento com aparelho de Golgi e mitocôndrios em posição irregular no ápice da célula. À esquerda três diferentes aspectos do corpo mitocondrial em estado de condensação.
- Fig. 28: Espermídeo alongado, e corte transversal na altura dos mitocôndrios.

Fig. 22 — Spermiden im Anfang der Streckungsphase. Golgiapparat noch nicht kondensiert.

Fig. 23 — Spermide im Anfang der Streckungsphase mit Resten der Spindelfasern.

Fig. 24 — Spermide im Anfang der Streckungsphase.

Fig. 25 — Spermide im Anfang der Streckungsphase.

Fig. 26 — Querschnitt durch eine Spermide im Stadium der Figur 25.

Fig. 27 — Spermide in der Streckungsphase; Golgiapparat und Mitochondrien in unregelmässiger Stellung am oberen Zellpol. Links drei verschiedene Stadien des mitochondrialen Koerpers im Stadium der Kondensation.

Fig. 28 — Gestreckte Spermide und ihr Querschnitt in der Hoehe der Mitochondrienmasse.

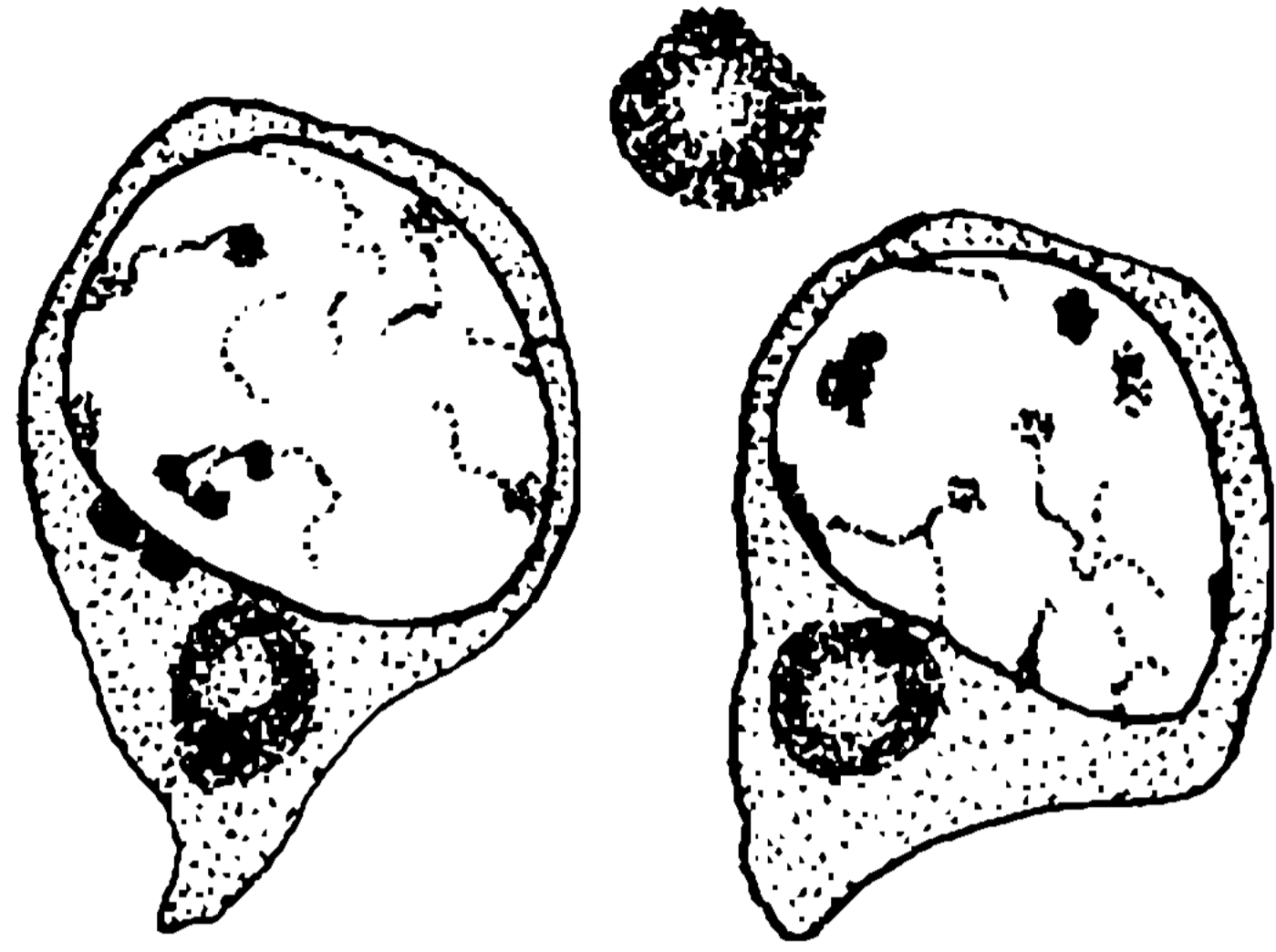


Fig. 22

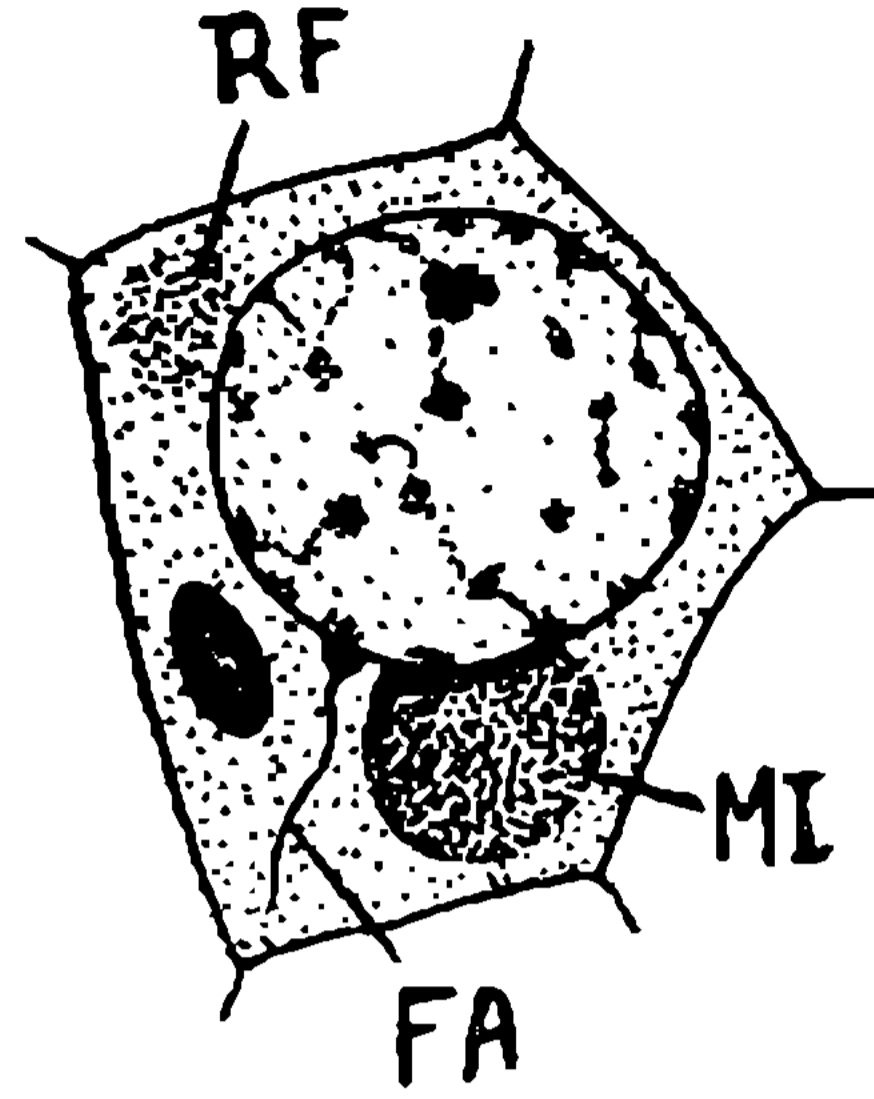


Fig. 23

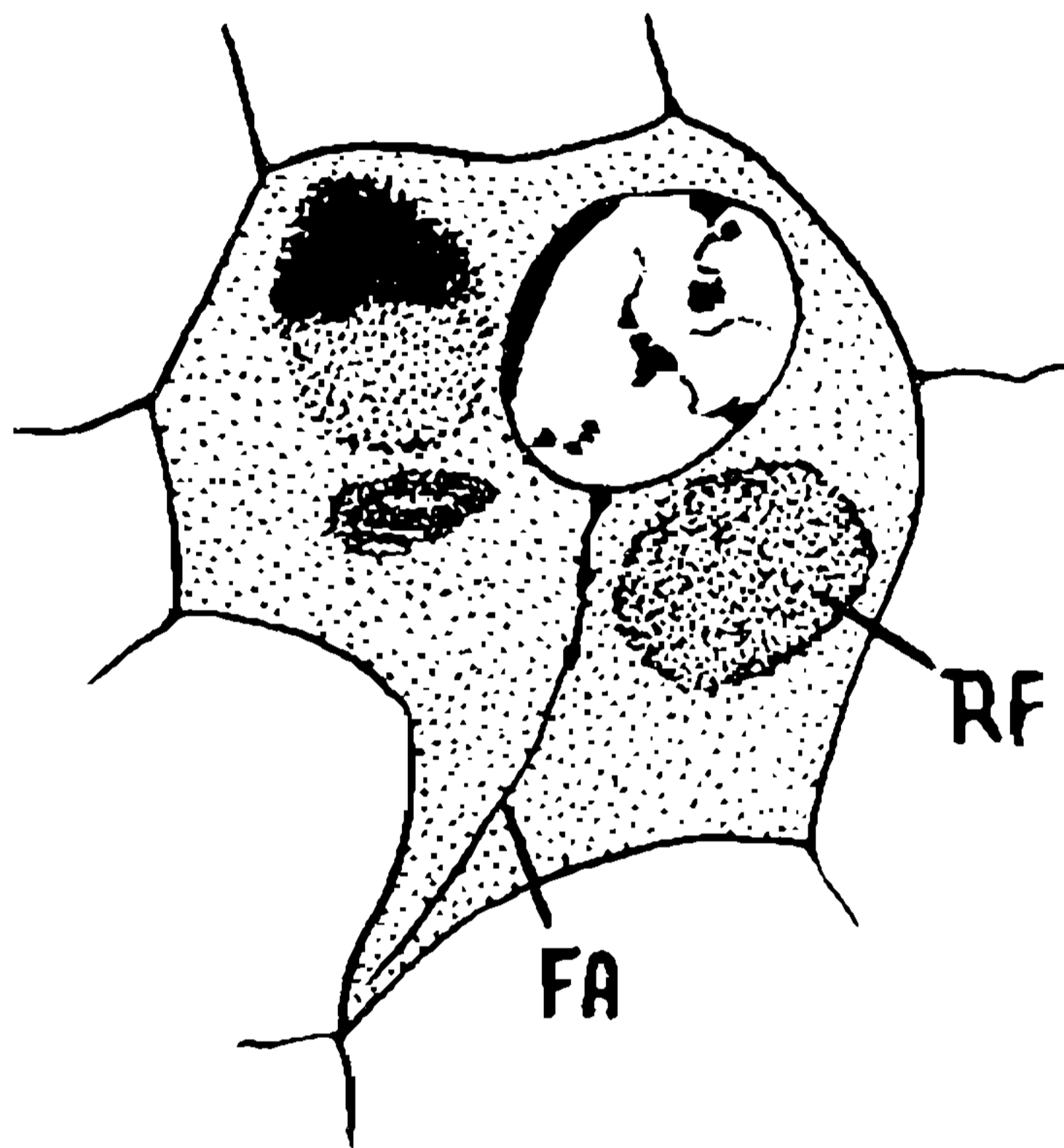


Fig. 24

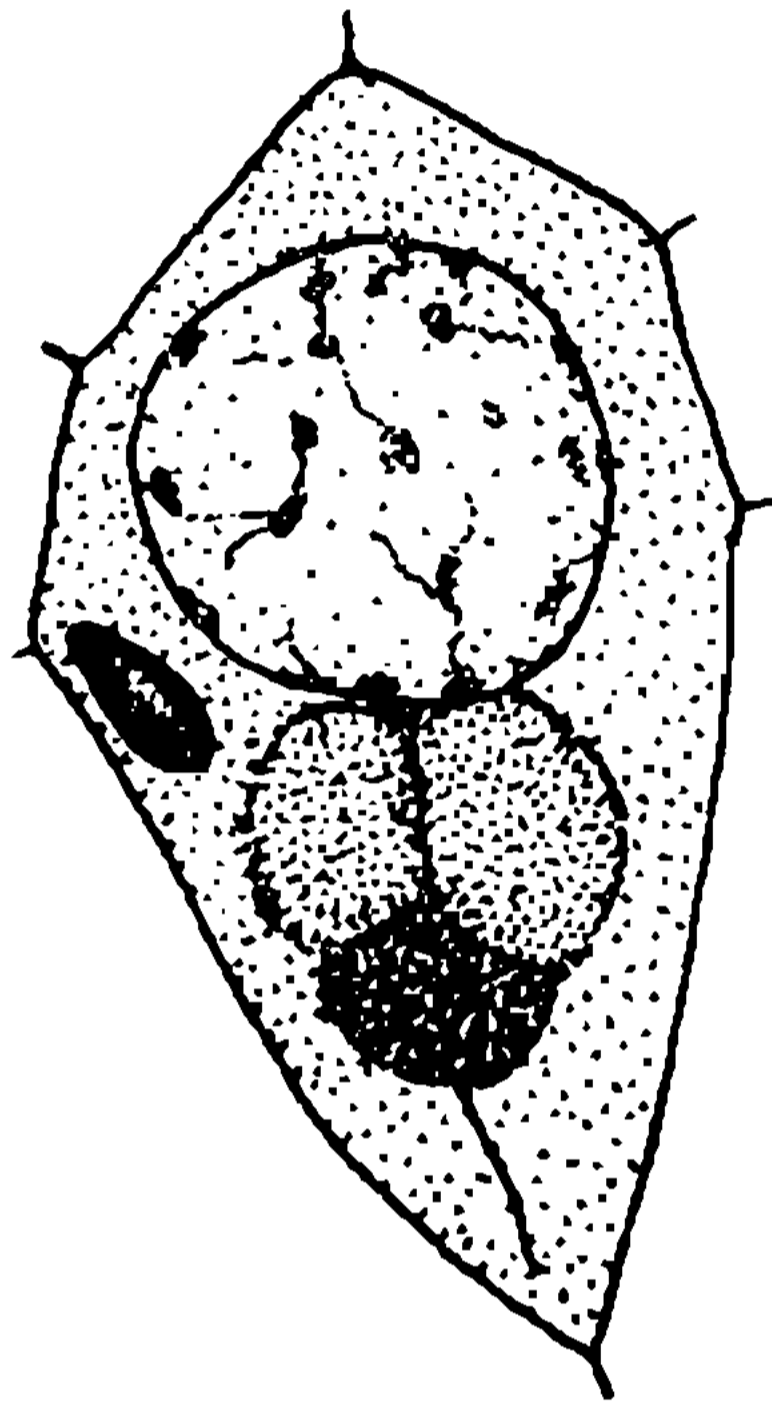


Fig. 25

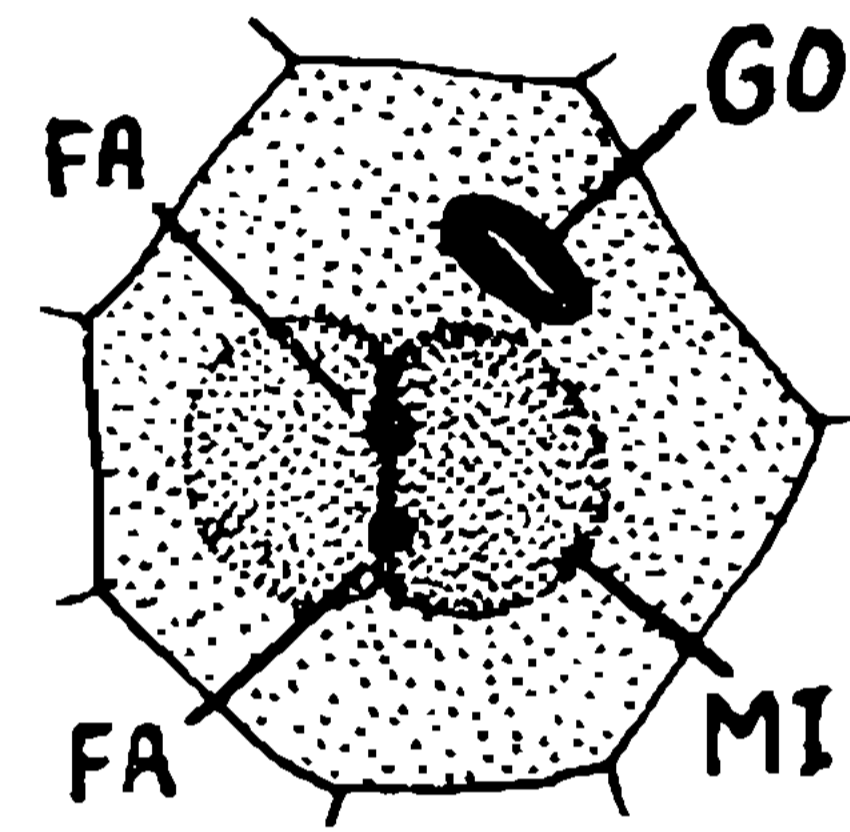


Fig. 26

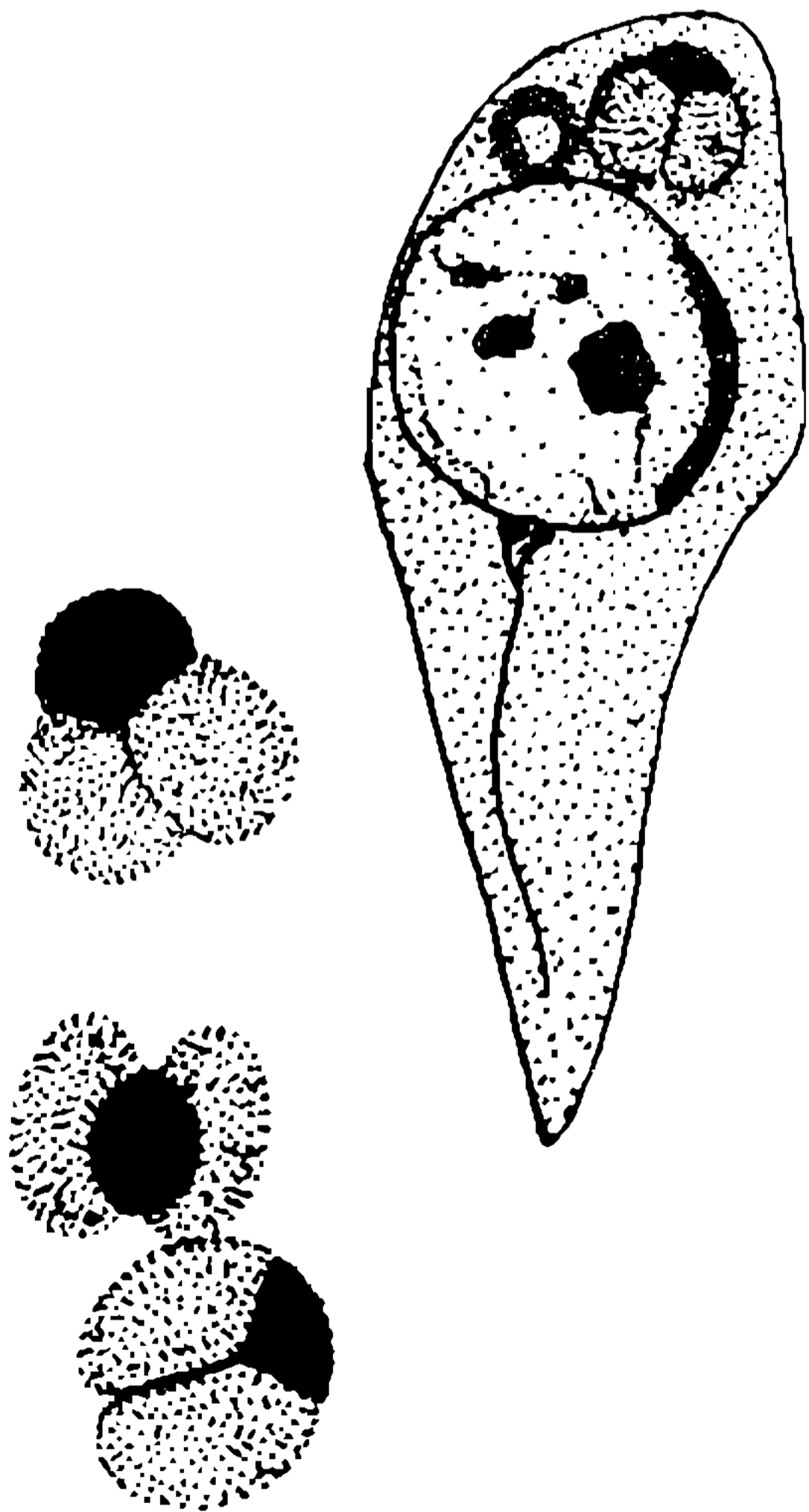


Fig. 27

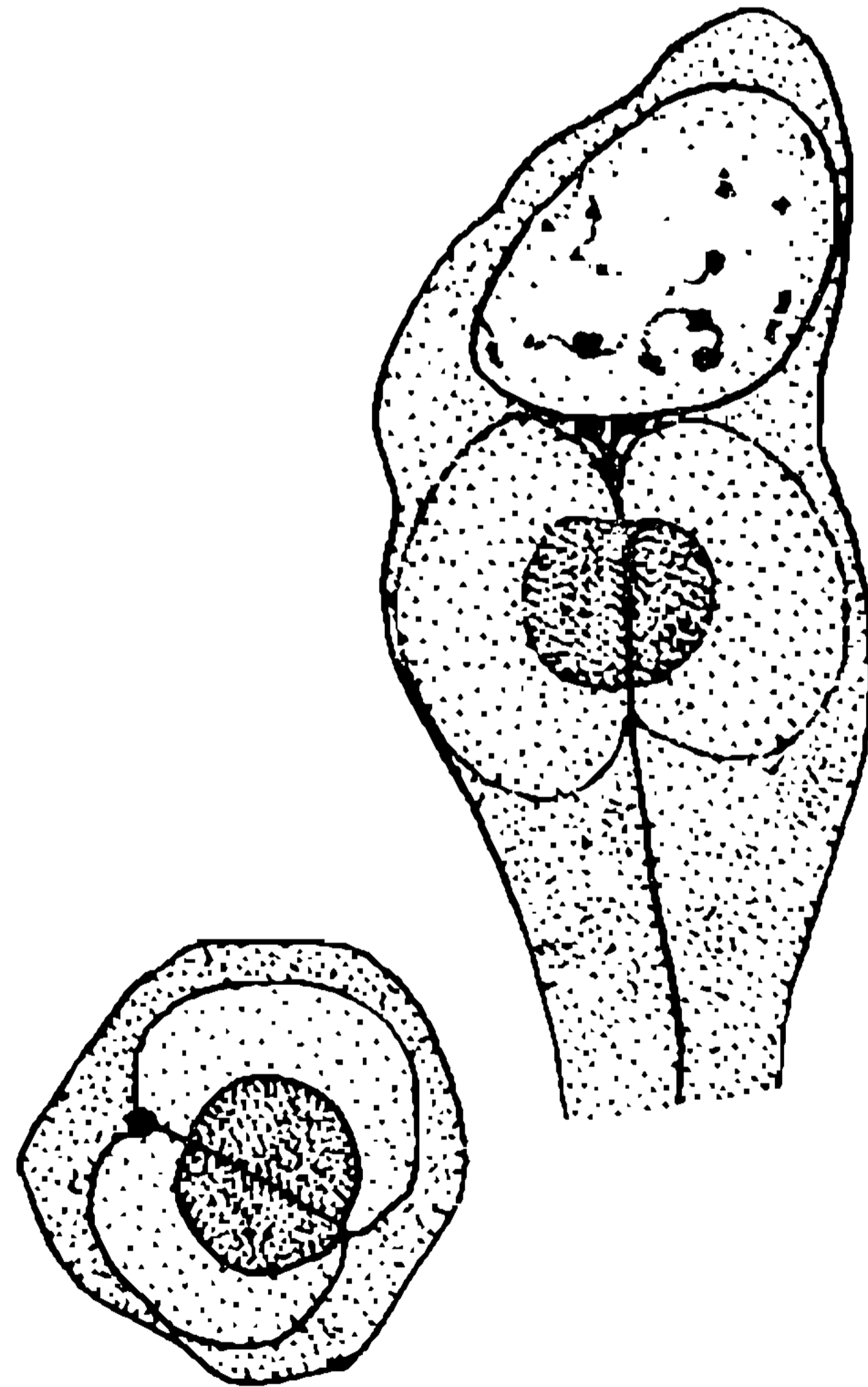


Fig. 28

## ESTAMPA 7

- Fig. 29: Esquema da localização dos espermídeos no cisto durante o estado com massa mitocondrial ainda em forma esférica.
- Fig. 30: Microfotografia de cistos com os espermídeos em posição paralela. Aumento 450 vezes.
- Fig. 31: a) Espermídeo do início da fase de alongamento da massa mitocondrial. b) Aparelho de Golgi. c) e d) Cortes transversais da parte apical da massa mitocondrial com os dois componentes do fio axial ainda separados.
- Fig. 32: Corte transversal das massas mitocondriais durante a fase de seu alongamento. a) Perto da base do núcleo. b) Na região central. c) Na região posterior.
- Fig. 33: Parte apical de um espermídeo com a substância mitocondrial na fase de alongamento.

Fig. 29 — Schema der Lage der Spermiden in der Zyste waehrend des Stadiums der noch nicht kugelfoermigen Mitochondrienmasse.

Fig. 30 — Microfotografie von Zysten mit Spermiden in paralleler Lage. Ver-groesserung 450 fach.

Fig. 31 — Spermide im Anfang der Streckungsphase des Mitochondrienkoer-pers. b) Golgiapparat. c) und. d) Querschnitte durch den apikalen Teil des Mitochondrienkoerpers mit den beiden noch getrennten Komponenten des Axialfadens.

Fig. 32 — Querschnitte durch den Mitochondrienkoerper waehrend seiner Streckungsphase. a) Nahe der Base des Kerns. b) in seiner Mitte. c) im unteren Teil.

Fig. 33 — Apikalteil einer Spermide mit der mitochondrialen Substanz waehrend der Streckungsphase.

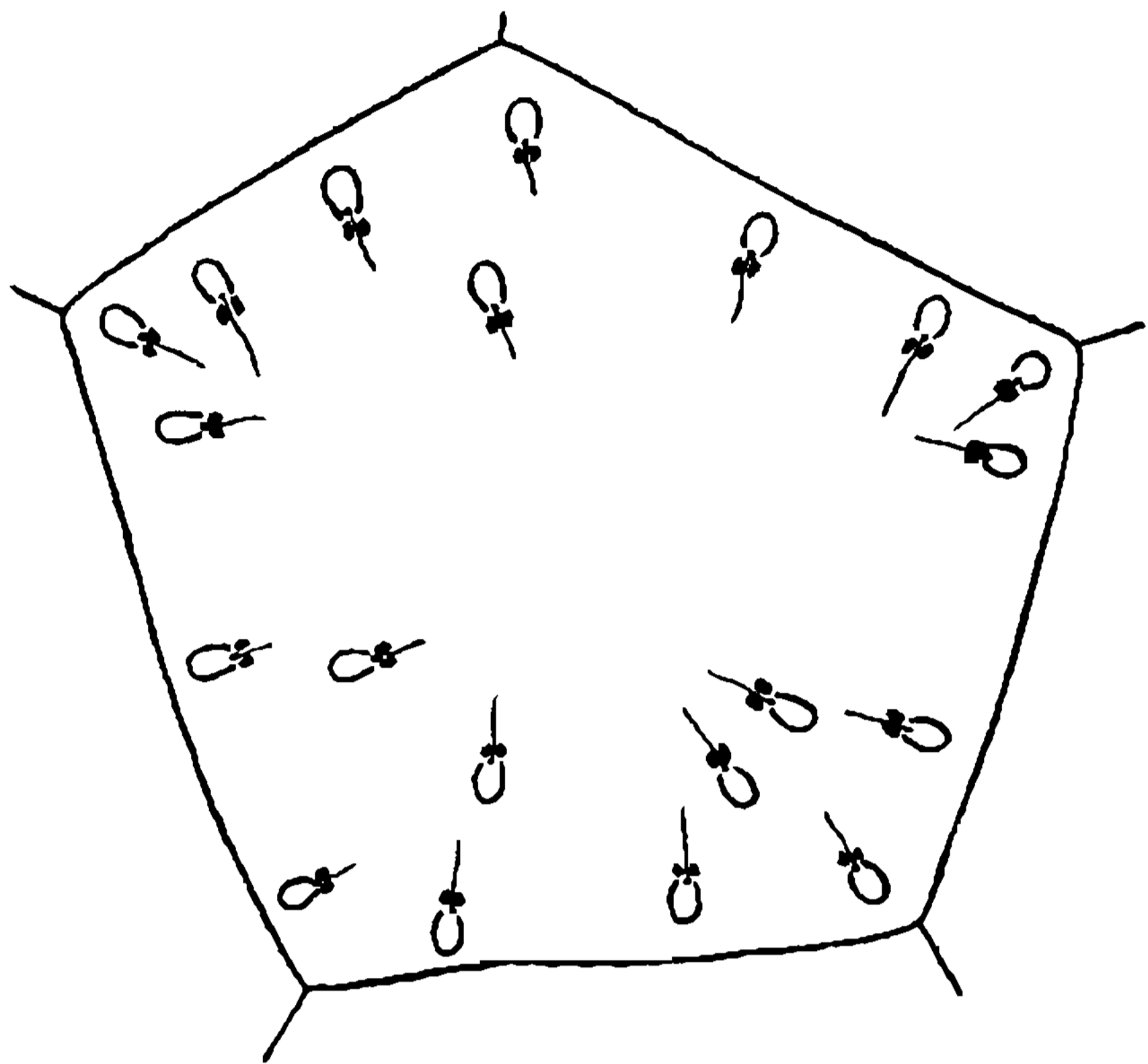


Fig. 29



Fig. 30

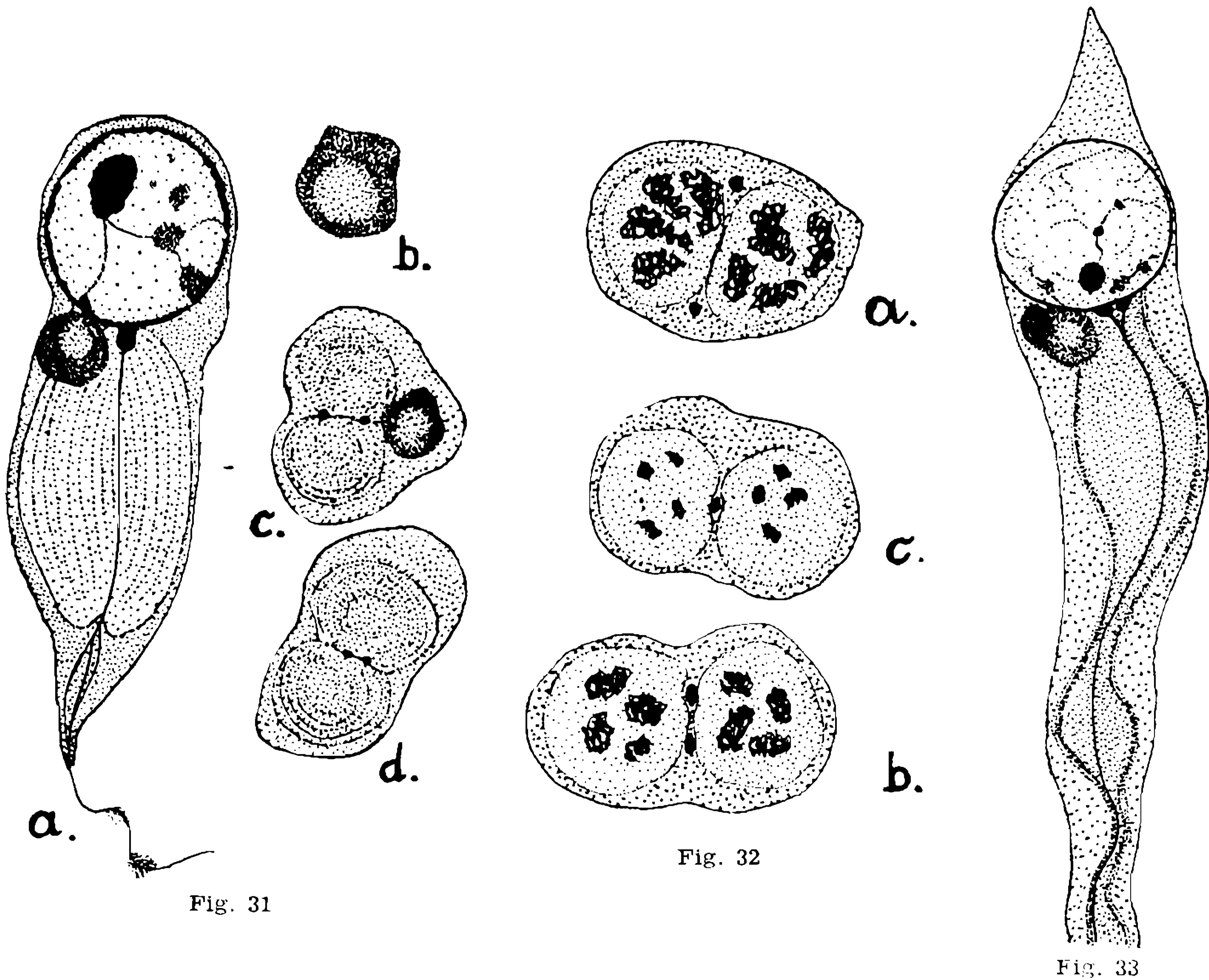


Fig. 31

Fig. 32

Fig. 33

## ESTAMPA 8

- Fig. 34: Parte da cauda no estágio de alongamento. Cortes transversais em várias alturas. Em N, uma das dilatações vista de cima.
- Fig. 35: Partes da cauda no fim da fase de alongamento. Cortes transversais em várias alturas.
- Fig. 36: Dois núcleos de espermídeos durante a fase de alongamento dos mitocôndrios com a concentração da cromatina no pólo apical.
- Fig. 37: Espermídeo no momento da saída do acrosoma do aparelho de Golgi (desenhado sem a massa mitocondrial).
- Fig. 38: Cabeças de espermídeos com o acrosoma isolado.
- Fig. 39: Cabeças de espermídeos com o acrosoma isolado.
- Fig. 40: Cabeças de espermídeos com o acrosoma isolado.

Fig. 34 — Teil des Schwanzes im Streckungsstadium. Querschnitte in verschiedenen Hoehen. In N eine der Auftreibungen von oben gesehen.

Fig. 35 — Teile des Schwanzes am Ende der Streckungsphase. Querschnitte in verschiedenen Hoehen.

Fig. 36 — Zwei Spermidenkerne waehrend der Streckungsphase der Mitochondrien mit der Ansammlung des Chromatins am apikalen Pol.

Fig. 37 — Spermide im Augenblick der Ausstossung des Acrosoms aus dem Golgiapparat (ohne die Mitochondrienmasse gezeichnet).

Fig. 38 — Spermidenkoepfe mit isoliertem Acrosom.

Fig. 39 — Spermidenkoepfe mit isoliertem Acrosom.

Fig. 40 — Spermidenkoepfe mit isoliertem Acrosom.



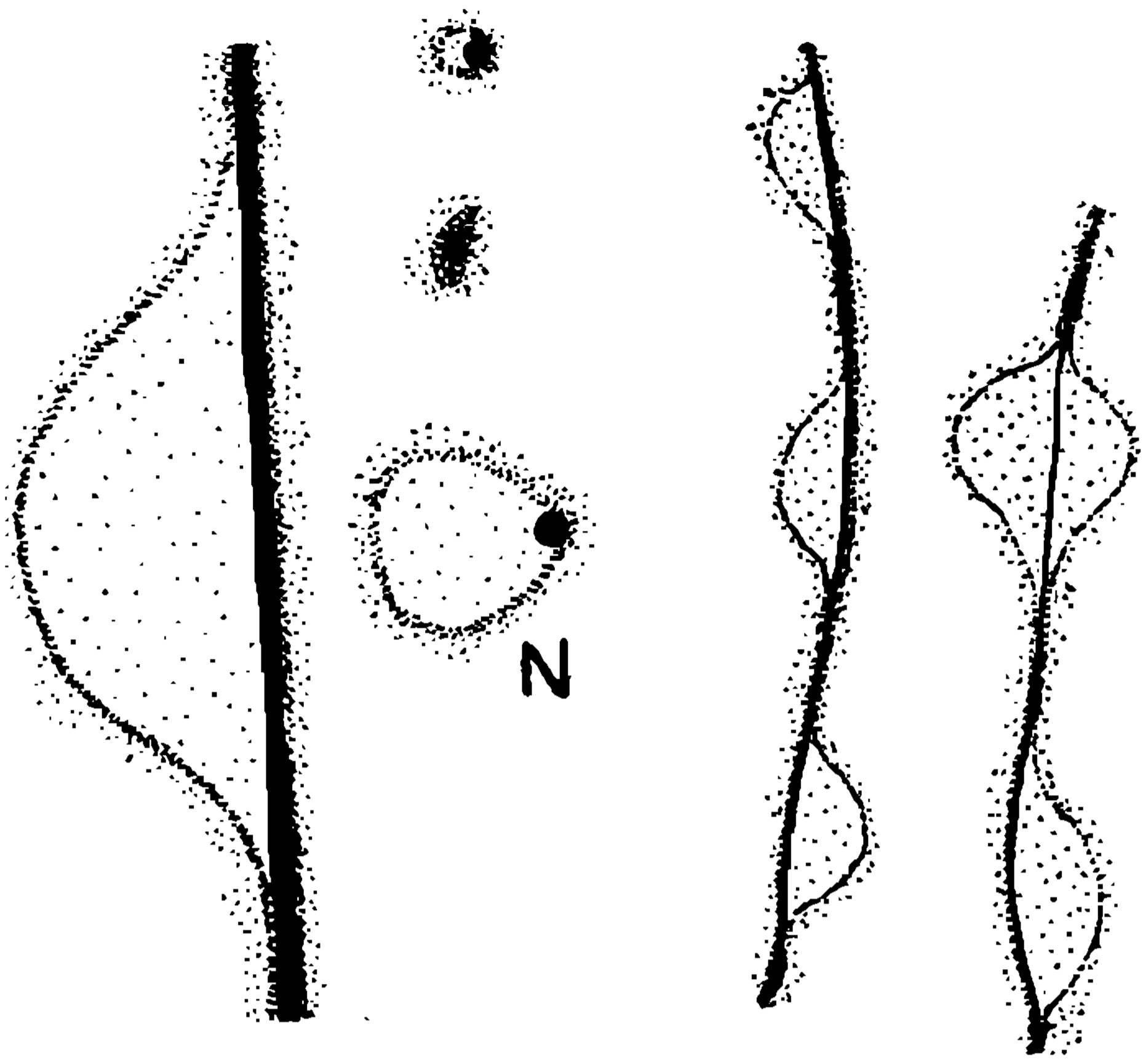


Fig. 34

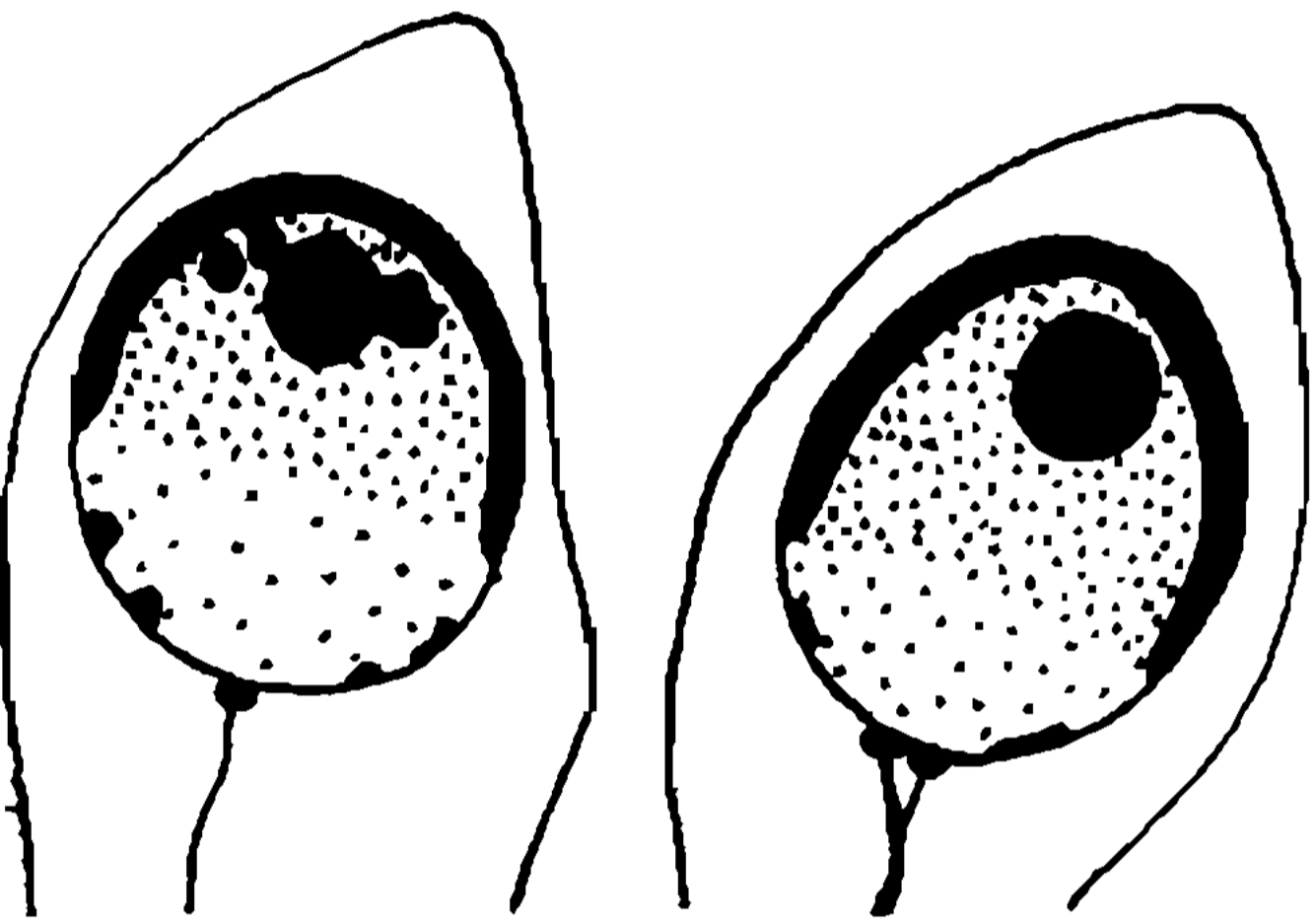


Fig. 36



Fig. 38

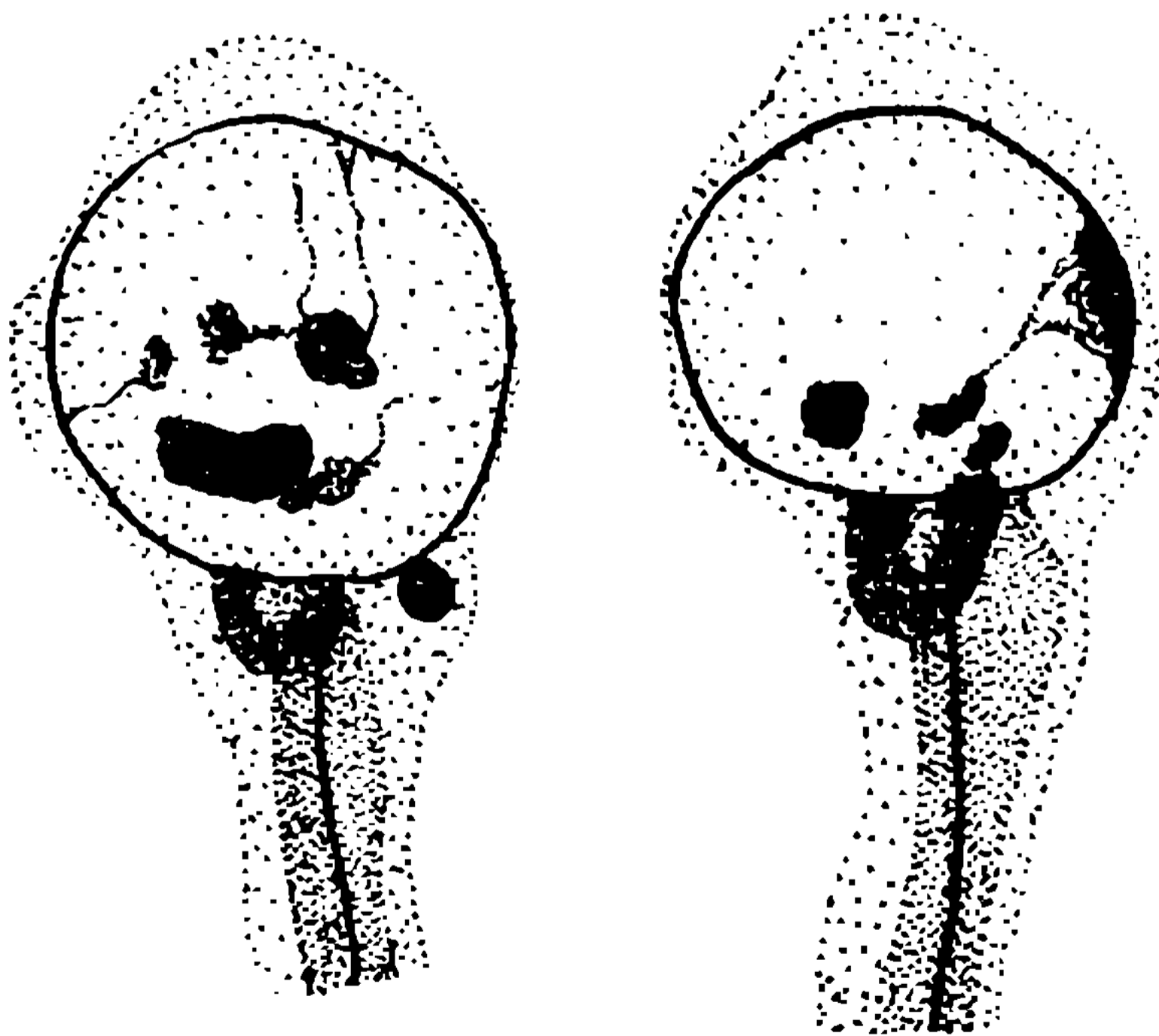


Fig. 40

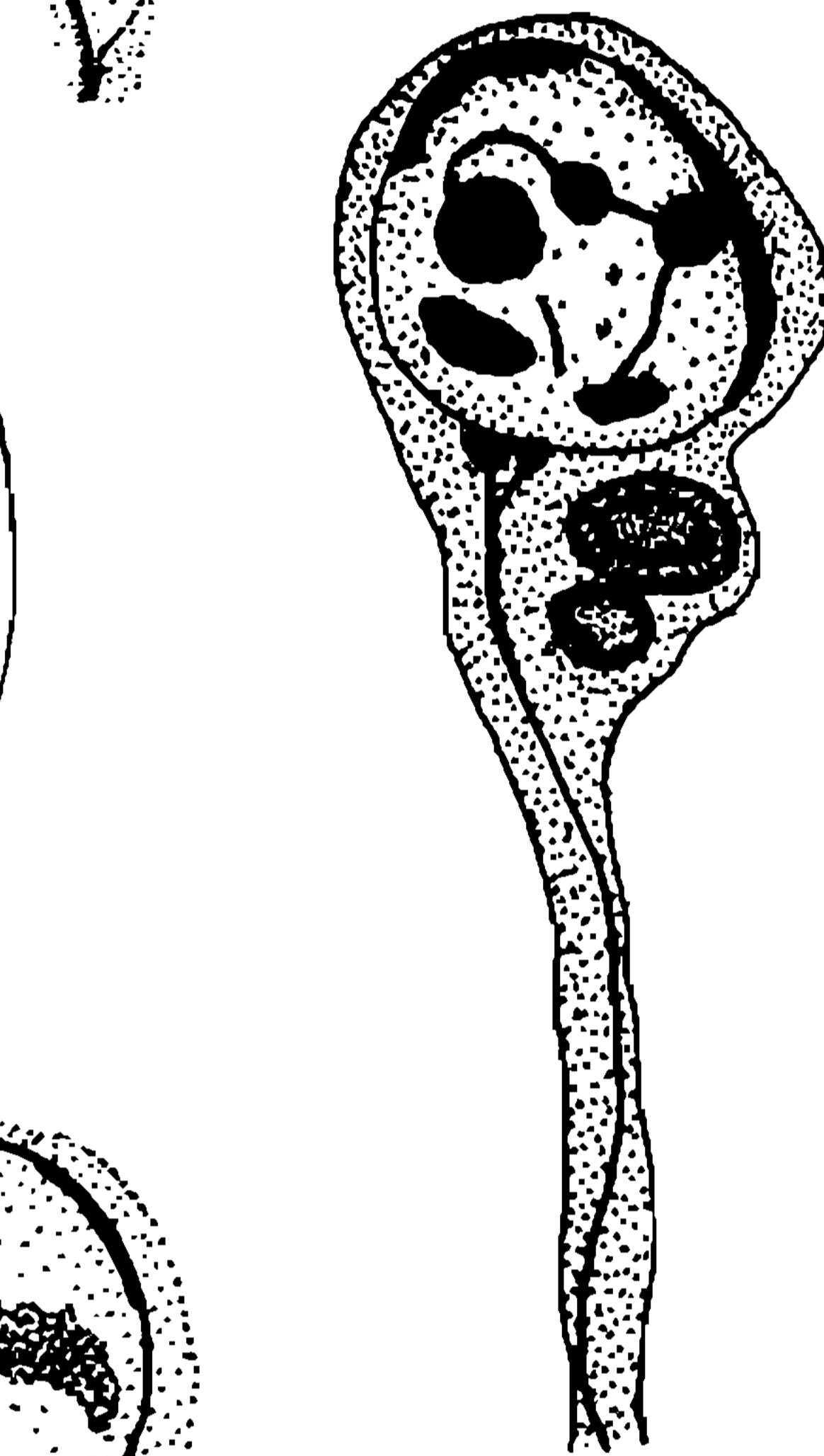


Fig. 37

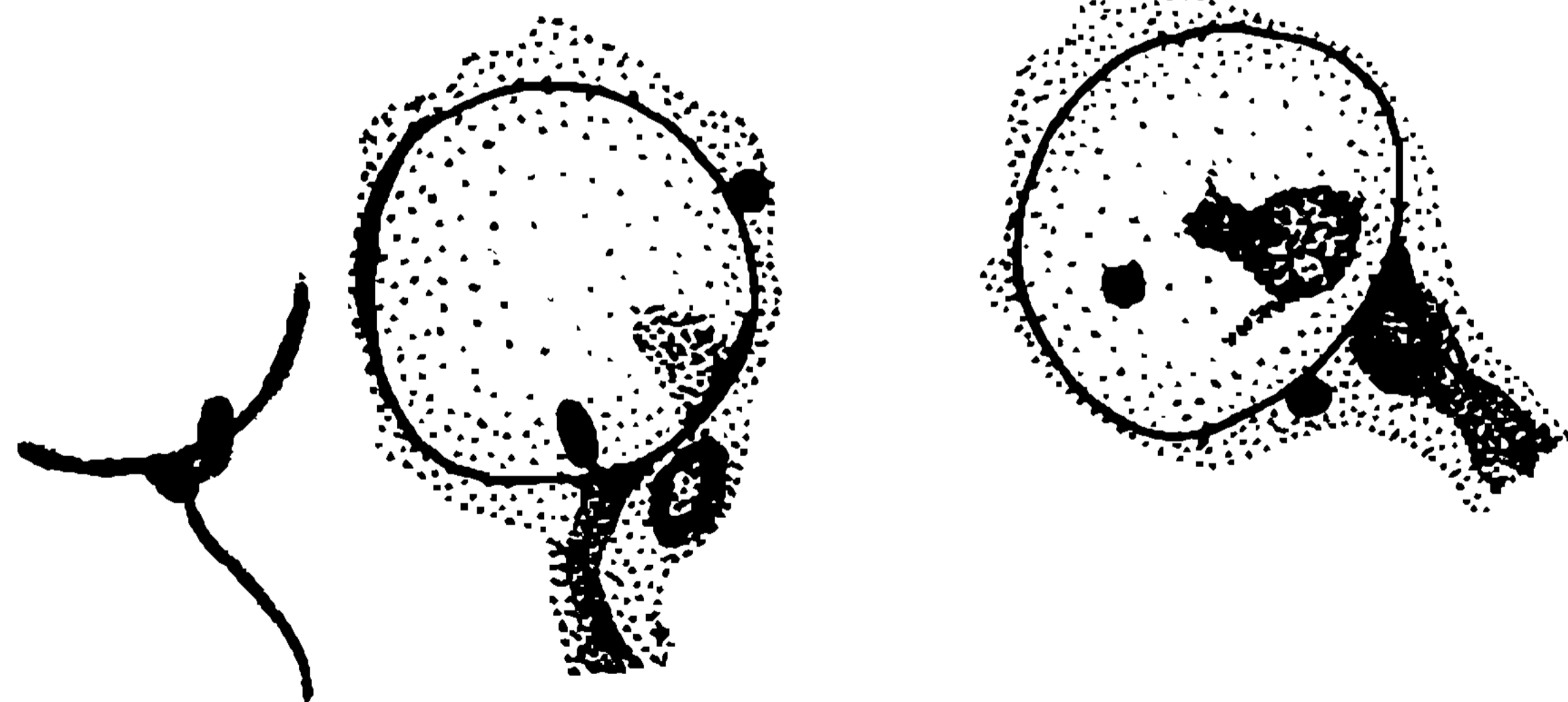


Fig. 39

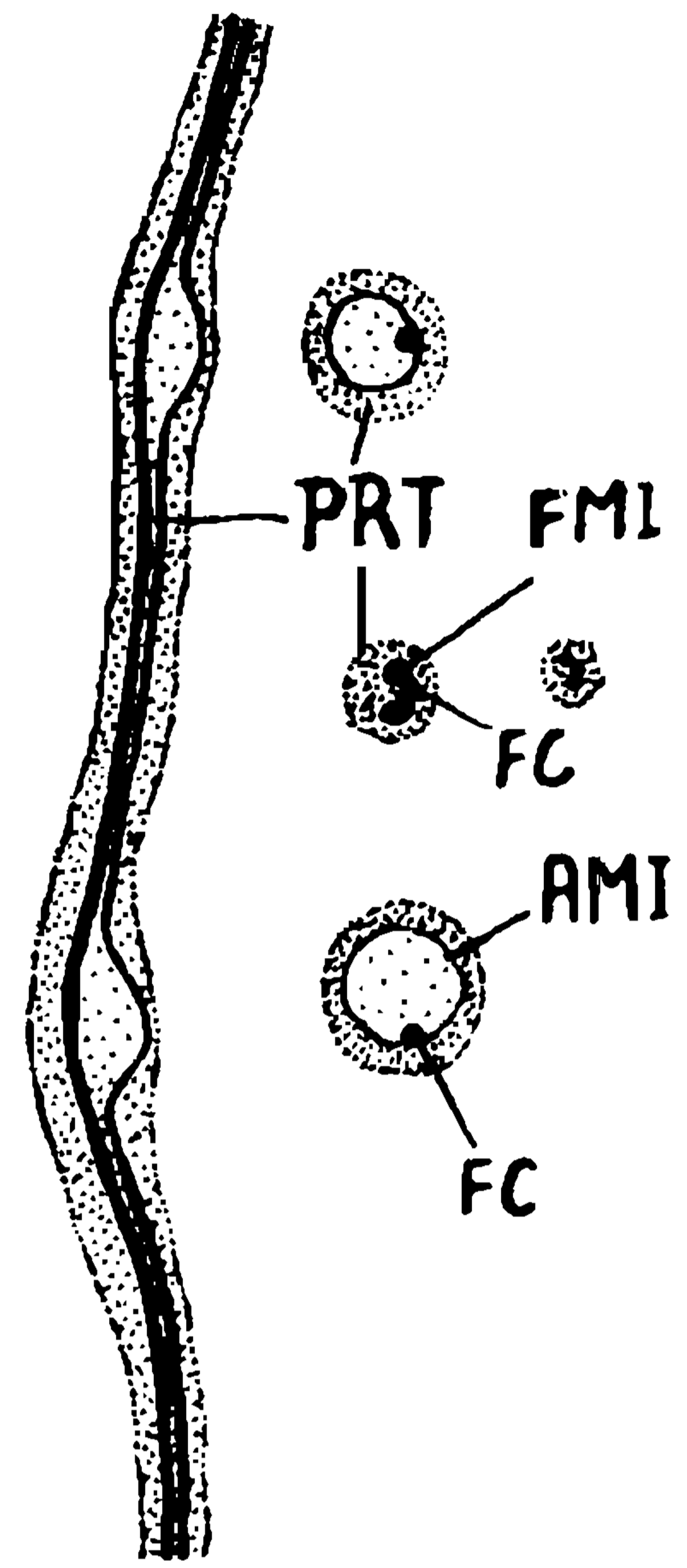


Fig. 35

## ESTAMPA 9

- Fig. 41: Acrosoma em translação ao pólo apical do espermídeo.
- Fig. 42: Acrosoma em translação ao pólo apical do espermídeo. O resto do aparelho de Golgi eliminado.
- Fig. 43: Acrosoma em translação ao pólo apical do espermídeo. O resto do aparelho de Golgi eliminado.
- Fig. 44: Acrosoma implantado no pólo apical do núcleo. O resto do aparelho de Golgi eliminado.
- Fig. 45: Acrosoma implantado no pólo apical do núcleo. A esquerda corte transversal de cinco caudas.
- Fig. 46: Quatro cortes transversais de núcleos durante a formação do revestimento cromático da parede nuclear.
- Fig. 47: Cortes longitudinais dos núcleos, mostrando a implantação dos centríolos.
- Fig. 48: Cortes longitudinais dos núcleos com os centríolos implantados. Fase terminal do revestimento cromático da parede nuclear.

Fig. 41 — Acrosom waehrend der Verlagerung zum Apikalpol der Spermide.

Fig. 42 — Acrosom waehrend der Verlagerung zum Apikalpol der Spermide. Der Rest des Golgiapparates ausgestossen.

Fig. 43 — Acrosom waehrend der Verlagerung zum Apikalpol der Spermide. Der Rest des Golgiapparates ausgestossen.

Fig. 44 — Acrosom am apikalen Pol des Kerns. Der Rest des Golgiapparates ausgestossen.

Fig. 45 — Acrosom am apikalen Pol des Kerns. Links Querschnitte durch 5 Schwaeenze.

Fig. 46 — Vier Querschnitte durch Kerne waehrend der Bildung der Chromatinauskleidung der Kernwand.

Fig. 47 — Laengsschnitte durch Kerne, um die Einbettung der Centriole zu zeigen.

Fig. 48 — Laengsschnitte durch Kerne mit eingebetteten Centriolen. Endphase der Chromatinauskleidung der Kernwand.

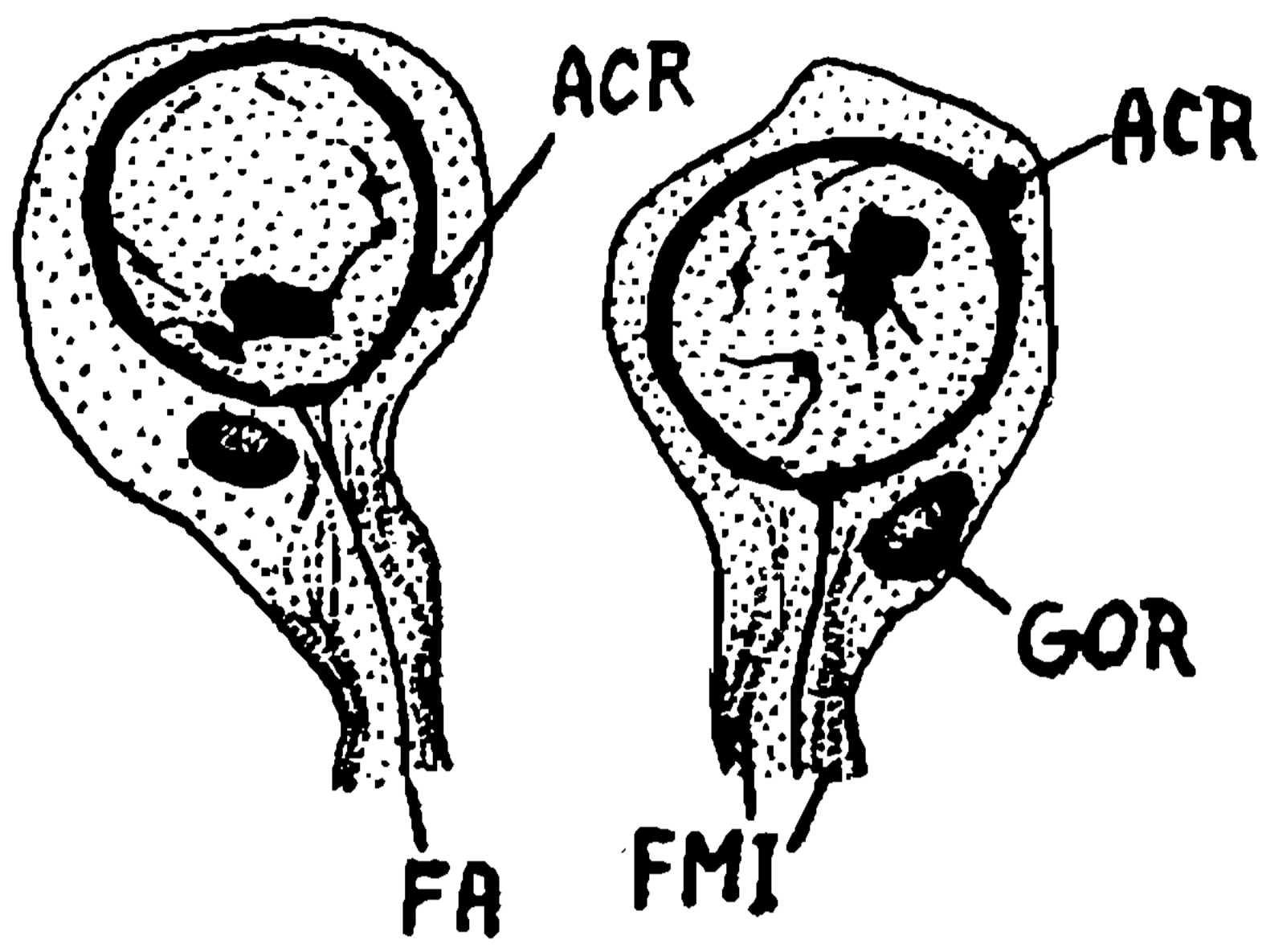


Fig. 41

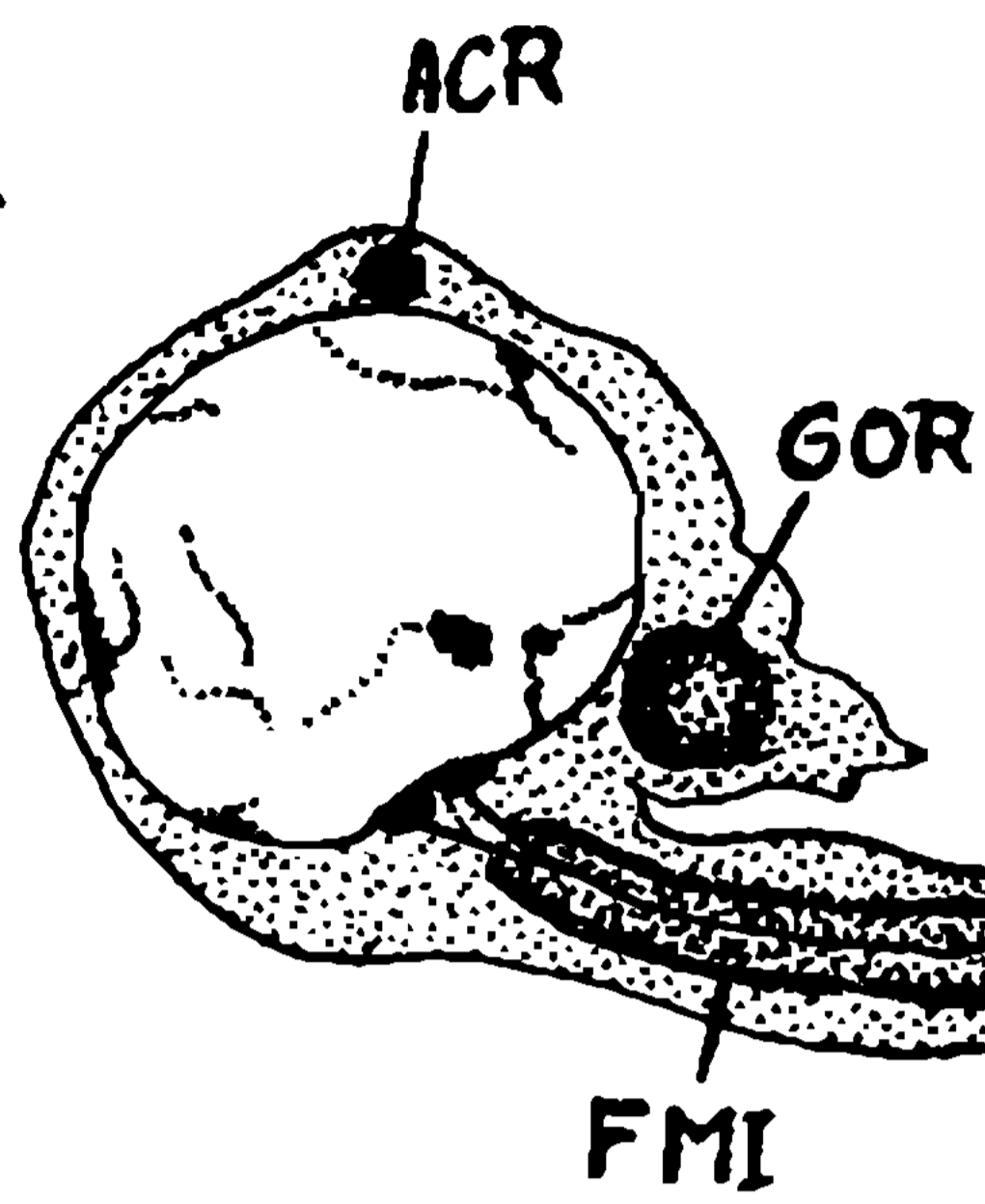


Fig. 42



Fig. 43

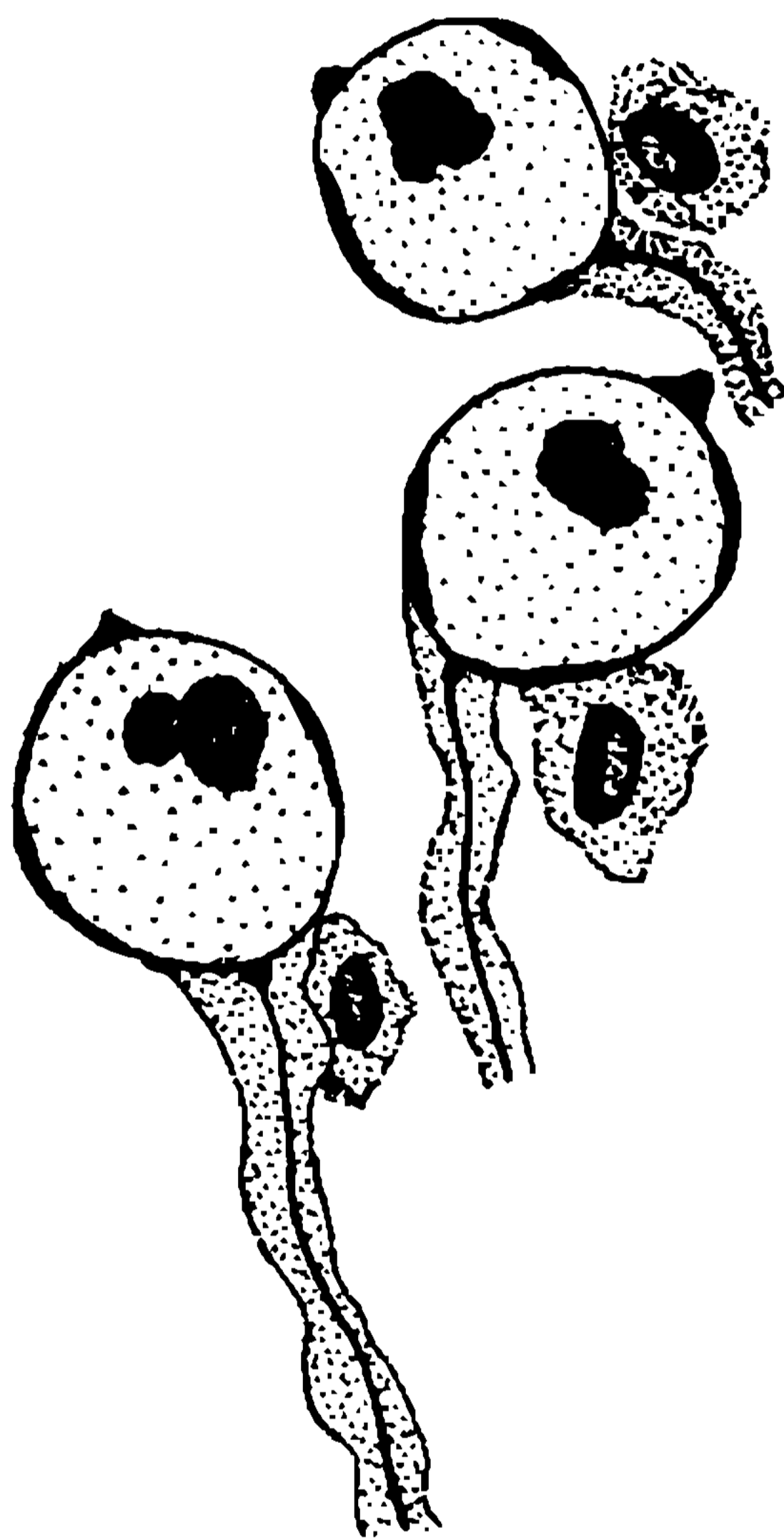


Fig. 44

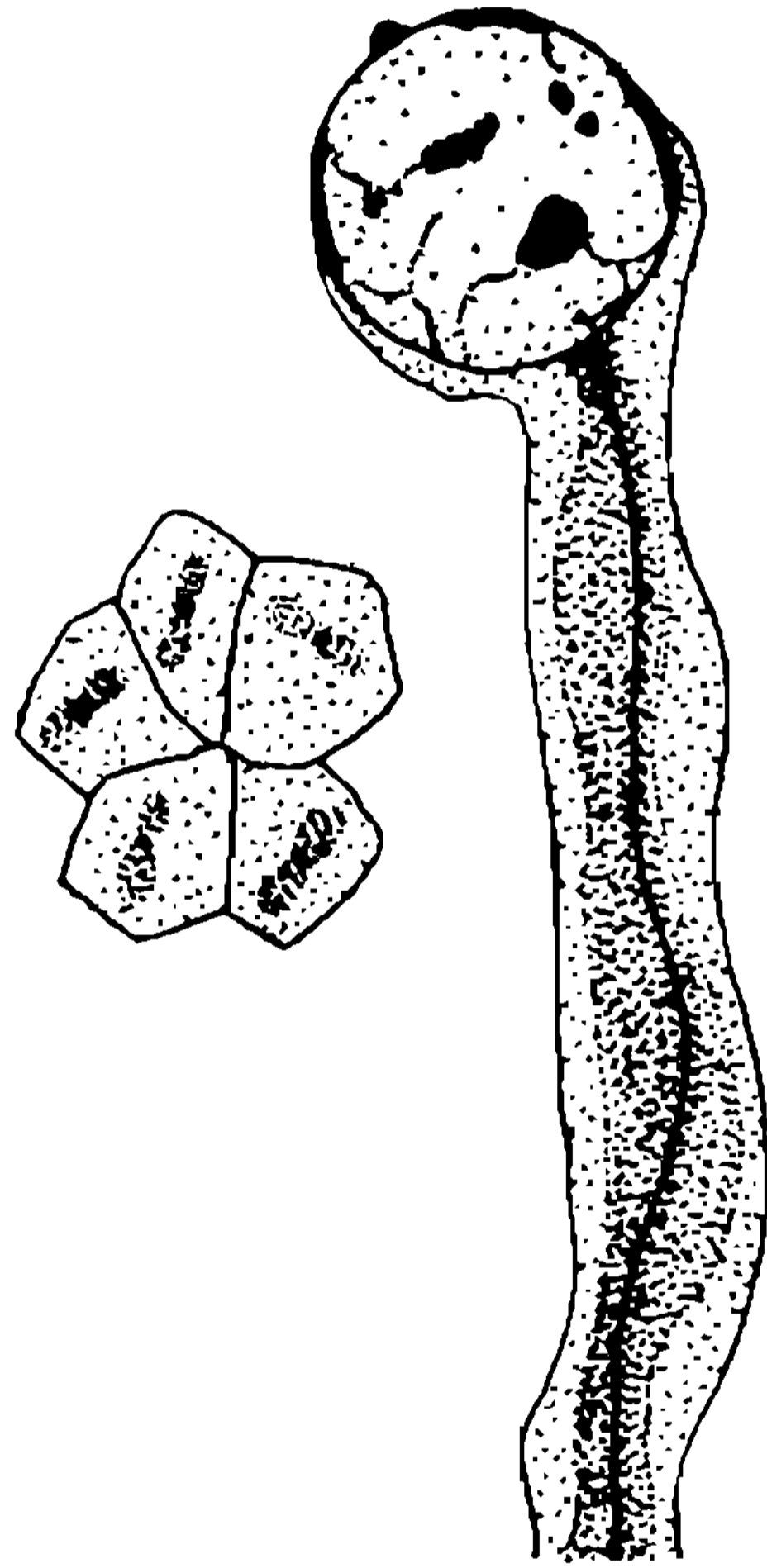


Fig. 45

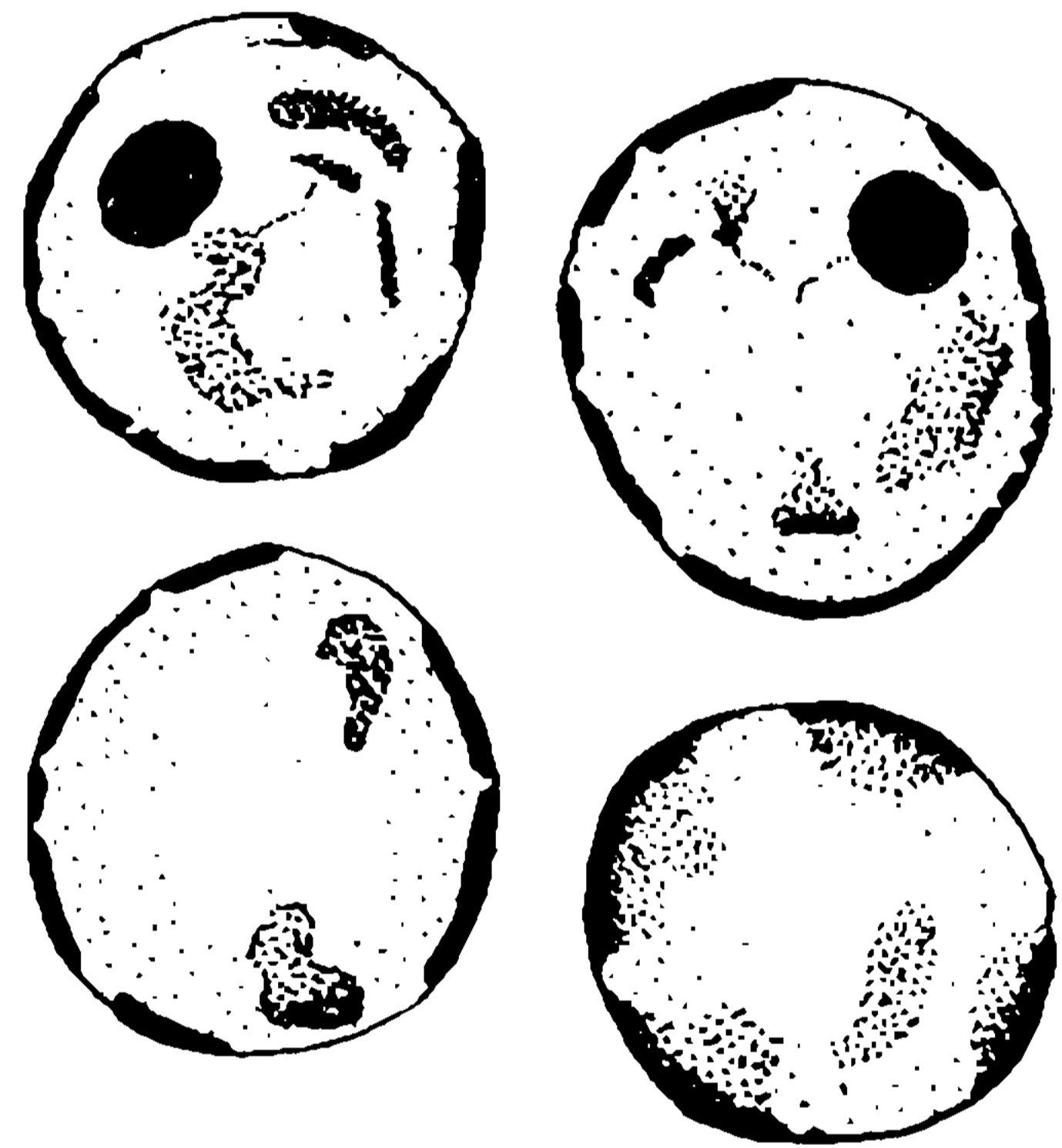


Fig. 46

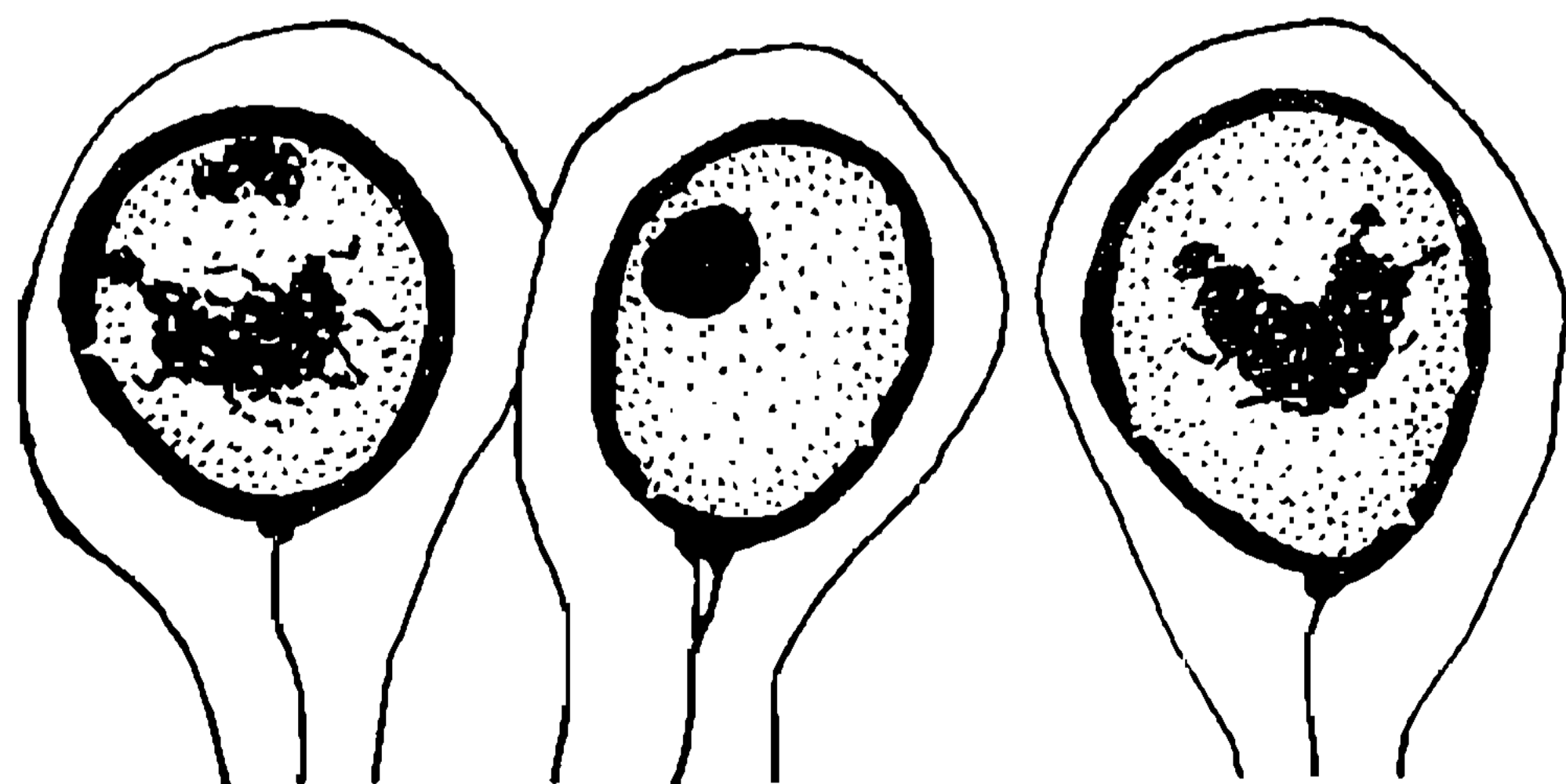


Fig. 48

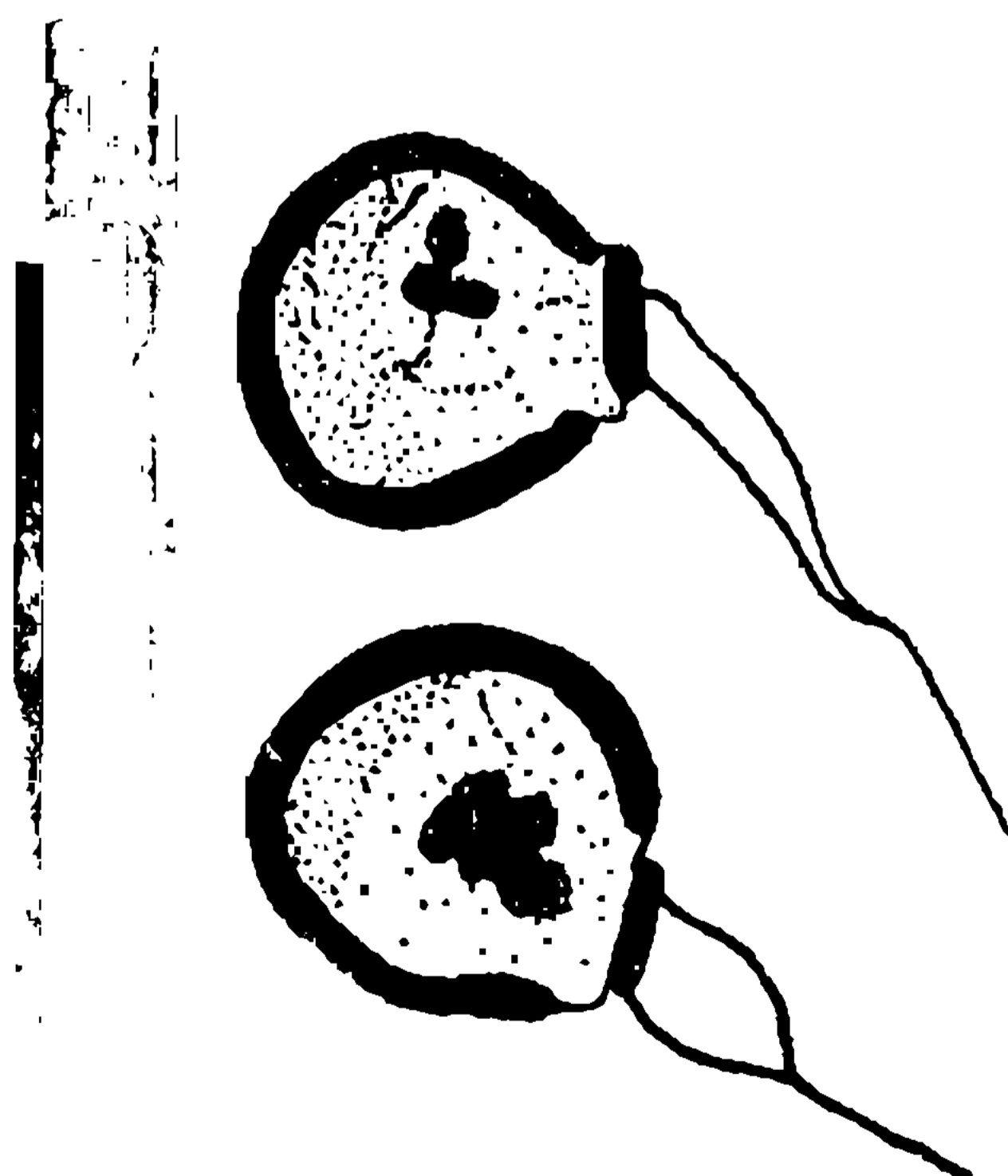


Fig. 47

## ESTAMPA 10

- Fig. 49: a) -c) Cortes sagitais mediais do núcleo no início da primeira fase de seu alongamento. Em d) esquema da implantação do acrosoma e dos centríolos (protoplasma e mitocôndrios não desenhados).
- Fig. 50: Cortes longitudinal (a) e transversal (b) do núcleo no início da primeira fase de seu alongamento.
- Fig. 51: Cortes transversais do núcleo oval durante a primeira fase do seu alongamento.
- Fig. 52: Núcleos durante a primeira fase de alongamento.
- Fig. 53: Núcleos durante a primeira fase de alongamento.
- Fig. 54: Núcleos durante a primeira fase de alongamento. Transformação dos centríolos em cone invertido, incluindo a extremidade basal do núcleo.
- Fig. 55: Núcleos no início da segunda fase de alongamento. Centríolos transformados em cone invertido. Início da formação das arestas cromáticas (AL). À direita reconstrução da base do núcleo. O protoplasma e os mitocôndrios não foram desenhados.

Fig. 49 — a) -c) Mediane Sagitalschnitte des Kerns im Anfang seiner ersten Streckungsphase. In d) Schema der Einbettung des Acrosoms und der Centriolen (Protoplasma und Mitochondrienkoerper nicht gezeichnet).

Fig. 50 — Laengsschnitte (a) und Querschnitte (b) des Kerns im Anfang seiner ersten Stréckungsphase.

Fig. 51 — Querschnitte durch den ovalen Kern waehrend seiner ersten Streckungsphase.

Fig. 52 — Kerne waehrend der ersten Streckungsphase.

Fig. 53 — Kerne waehrend der ersten Streckungsphase.

Fig. 54 — Kerne waehrend der ersten Streckungsphase. Umbildung der Centriole in einen umgekehrten Kegel, das basale Ende des Kerns umschliessend.

Fig. 55 — Kerne im Anfang der zweiten Streckungsphase. Centriole in einen ungekehrten Kegel umgewandelt. Beginn der Bildung der Chromatinleisten (AL). Rechts Rekonstruktion der Basis des Kerns. Protoplasma und Mitochondrien nicht gezeichnet.

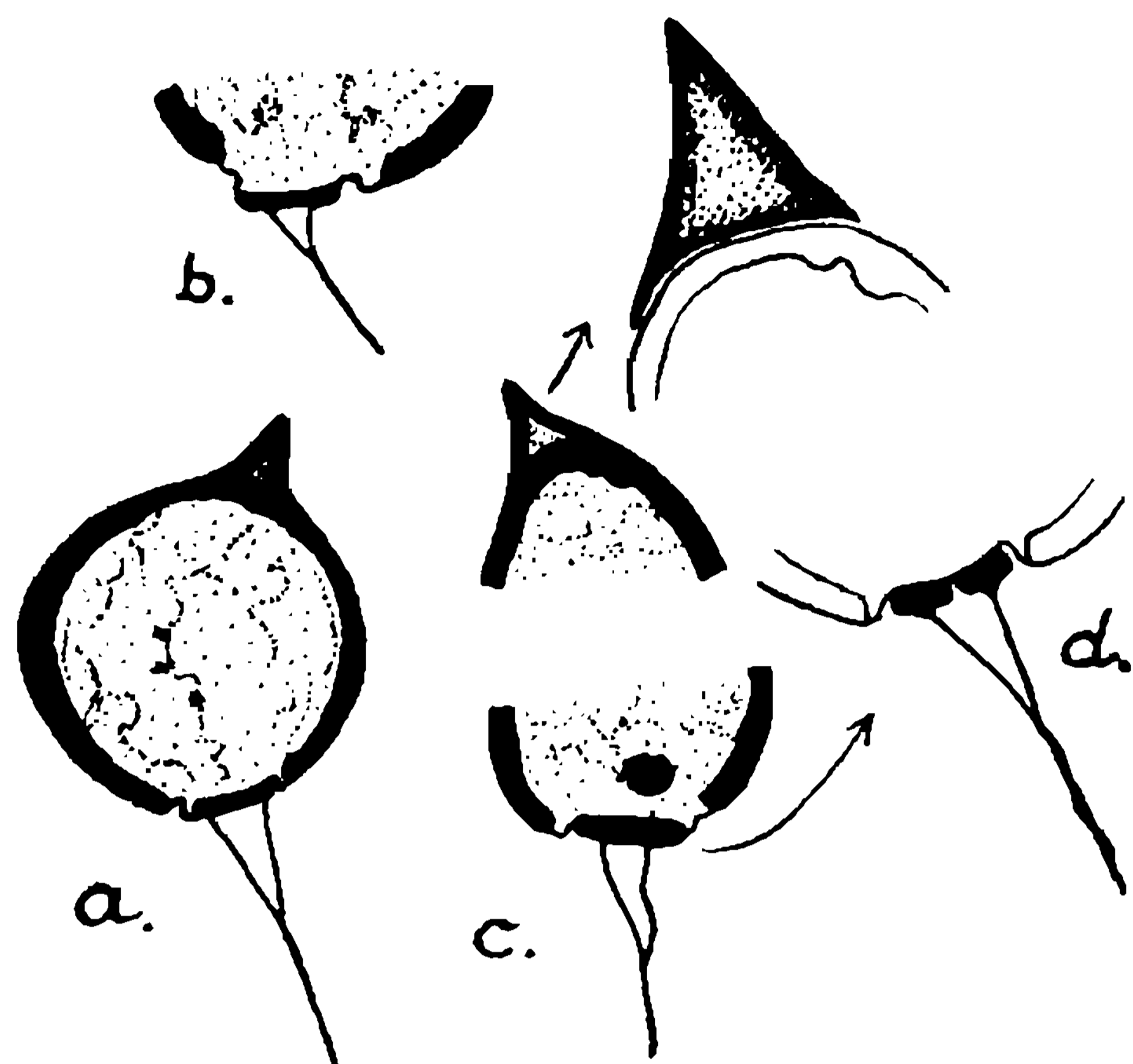


Fig. 49

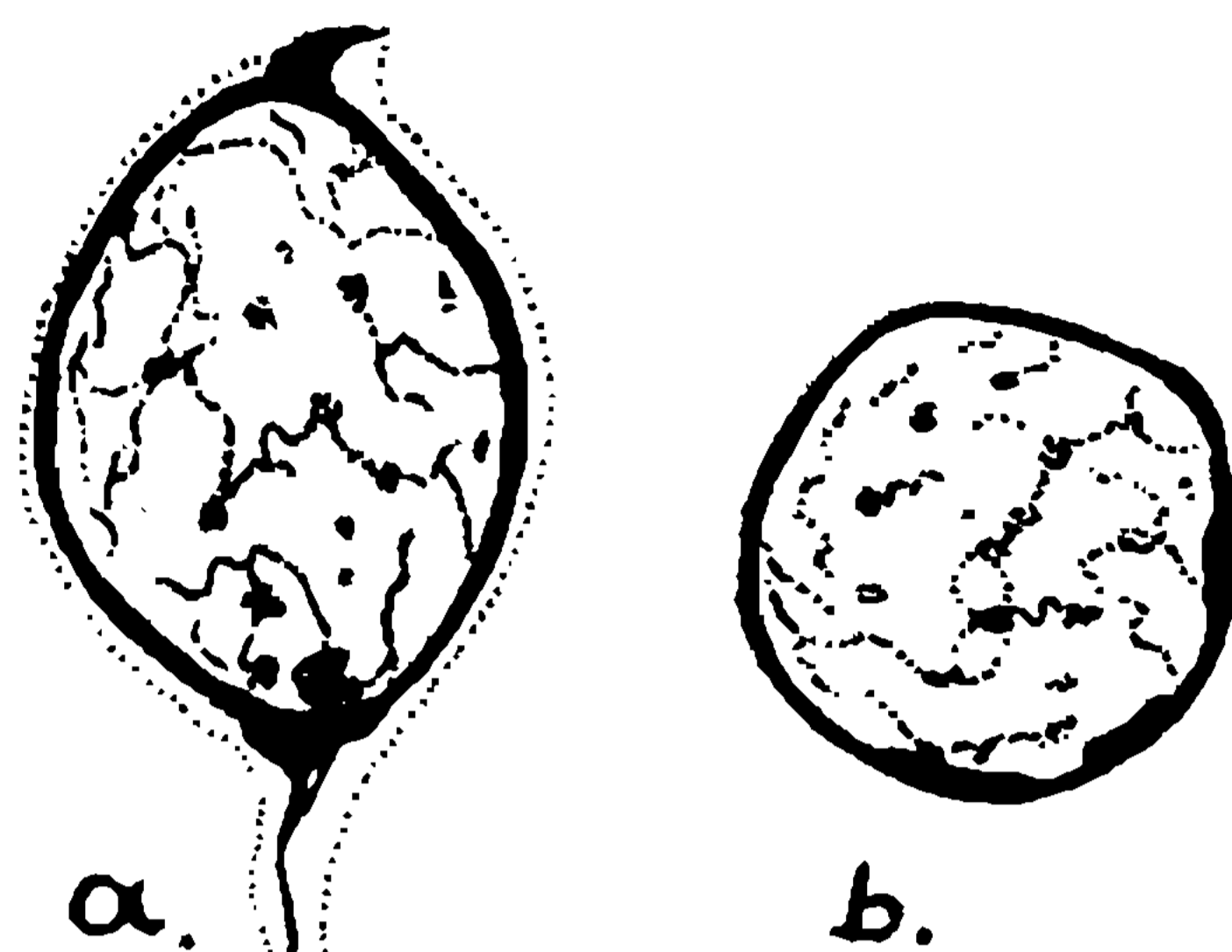


Fig. 50

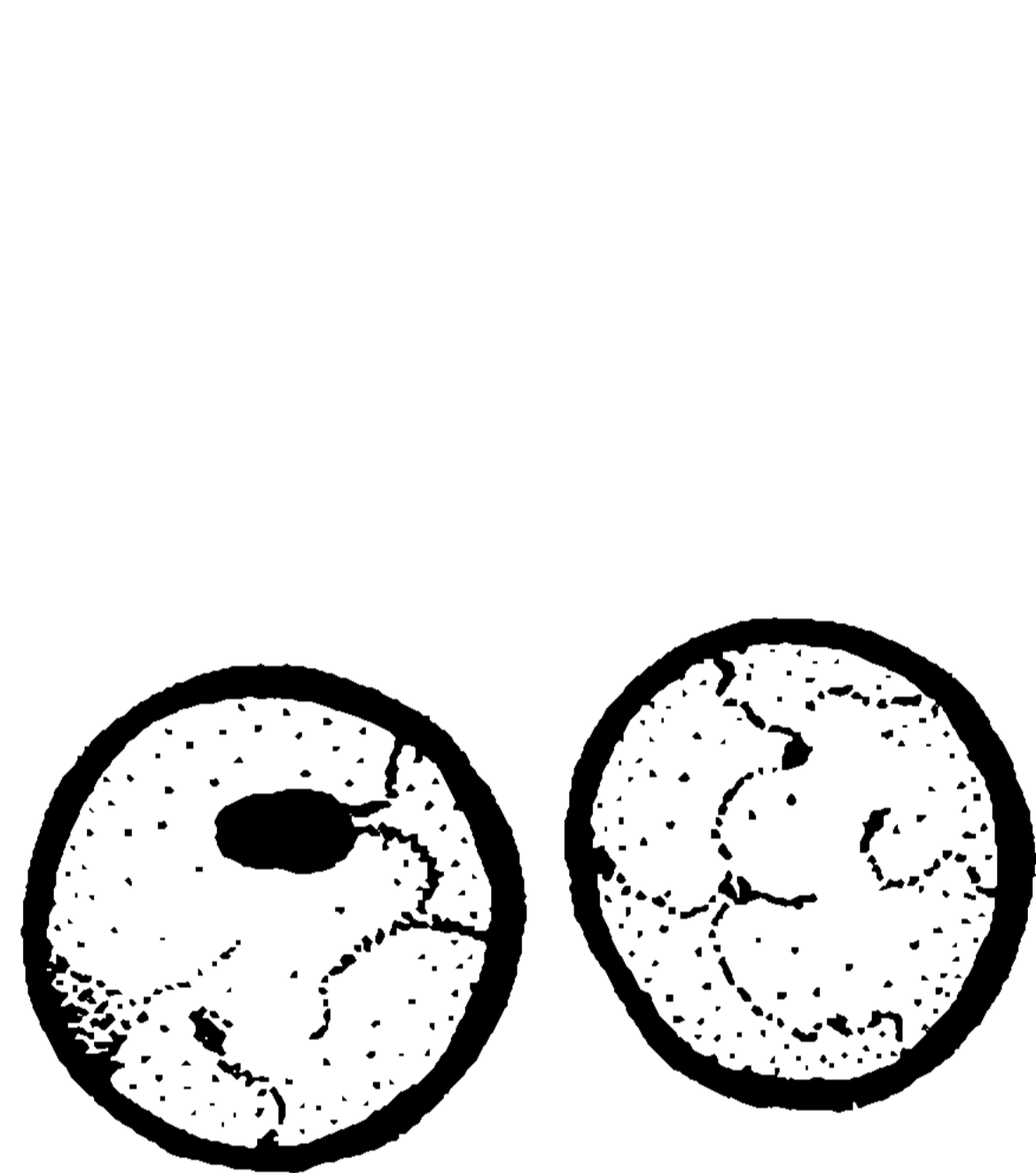


Fig. 51

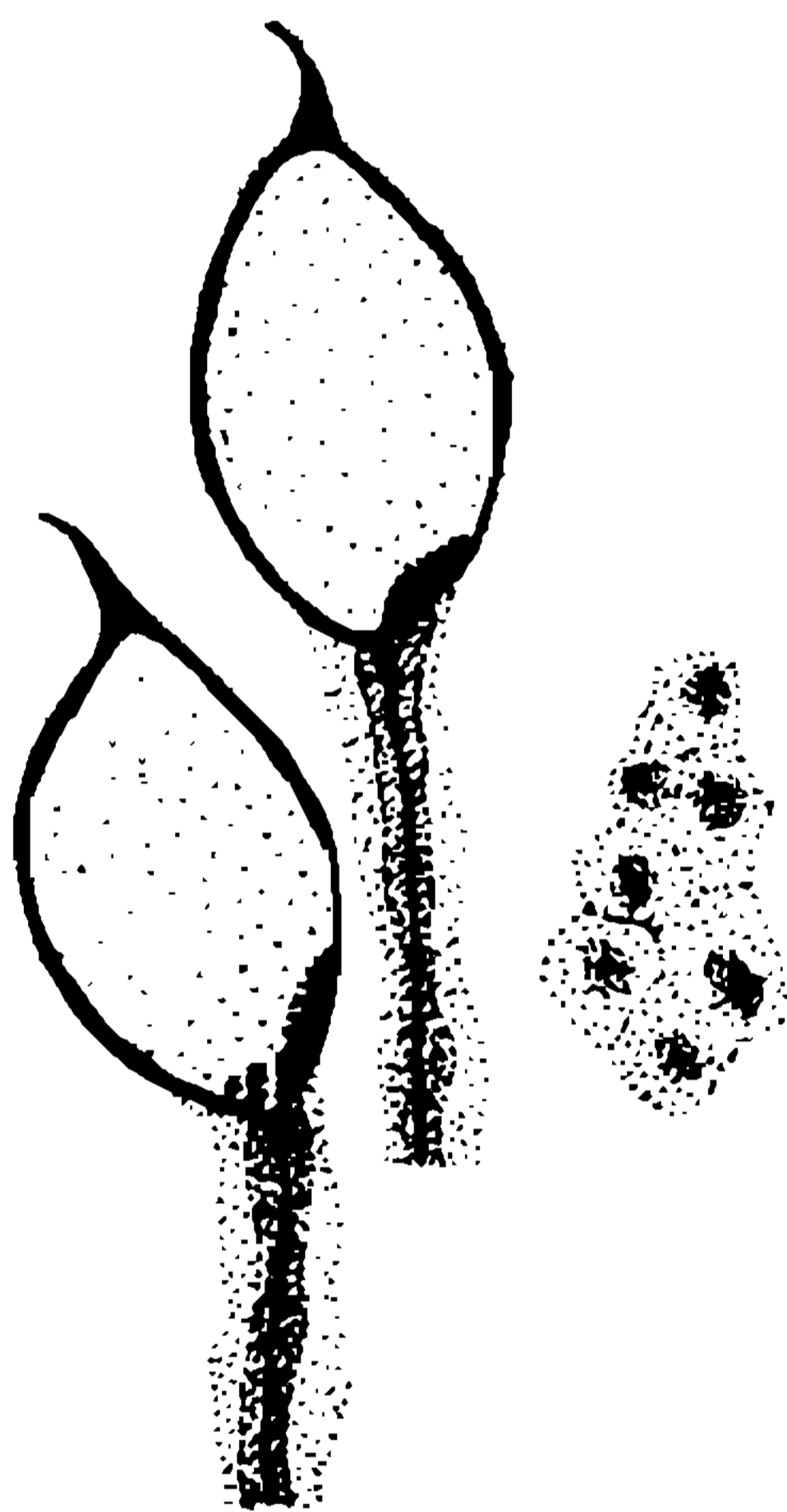


Fig. 52

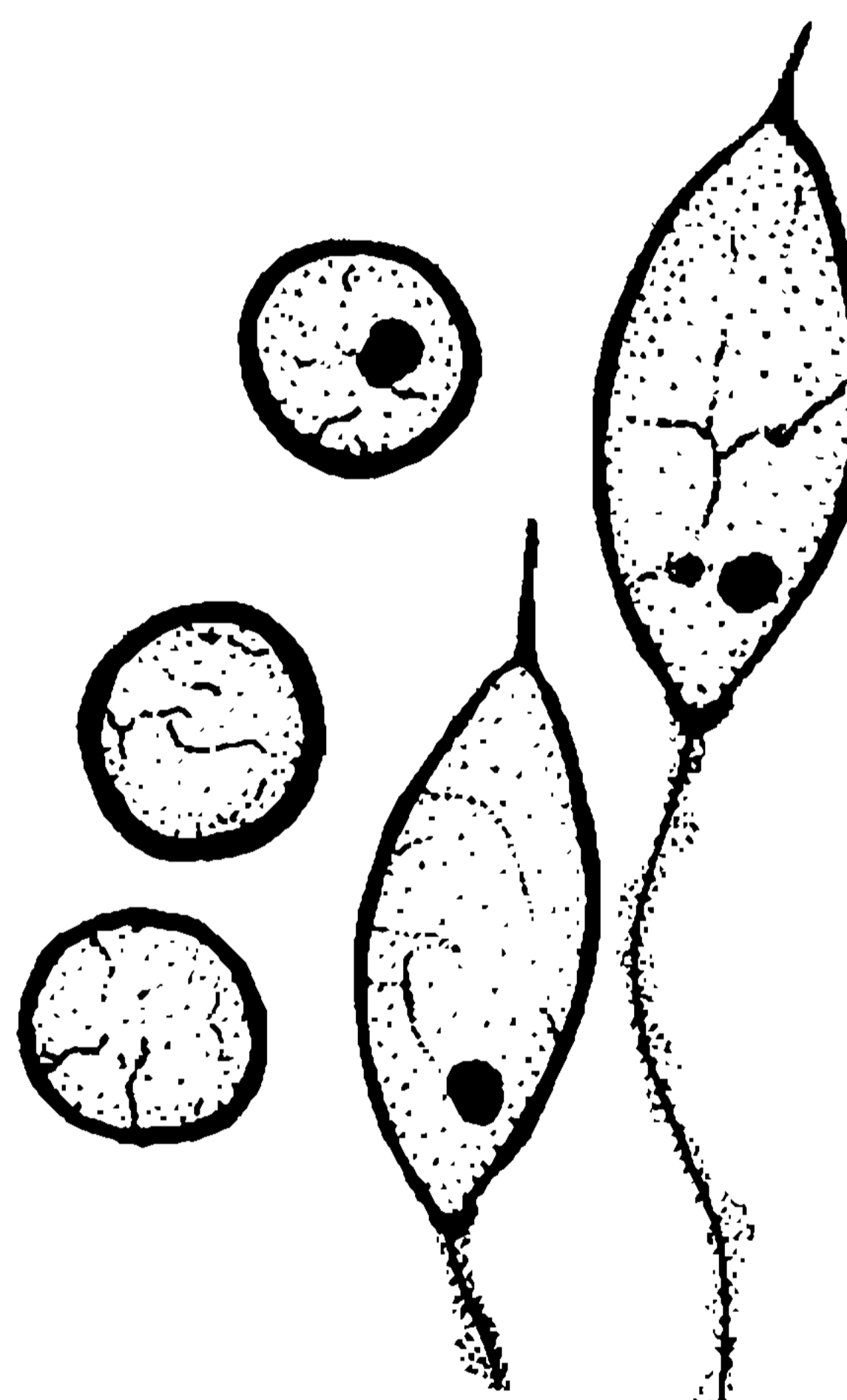


Fig. 53

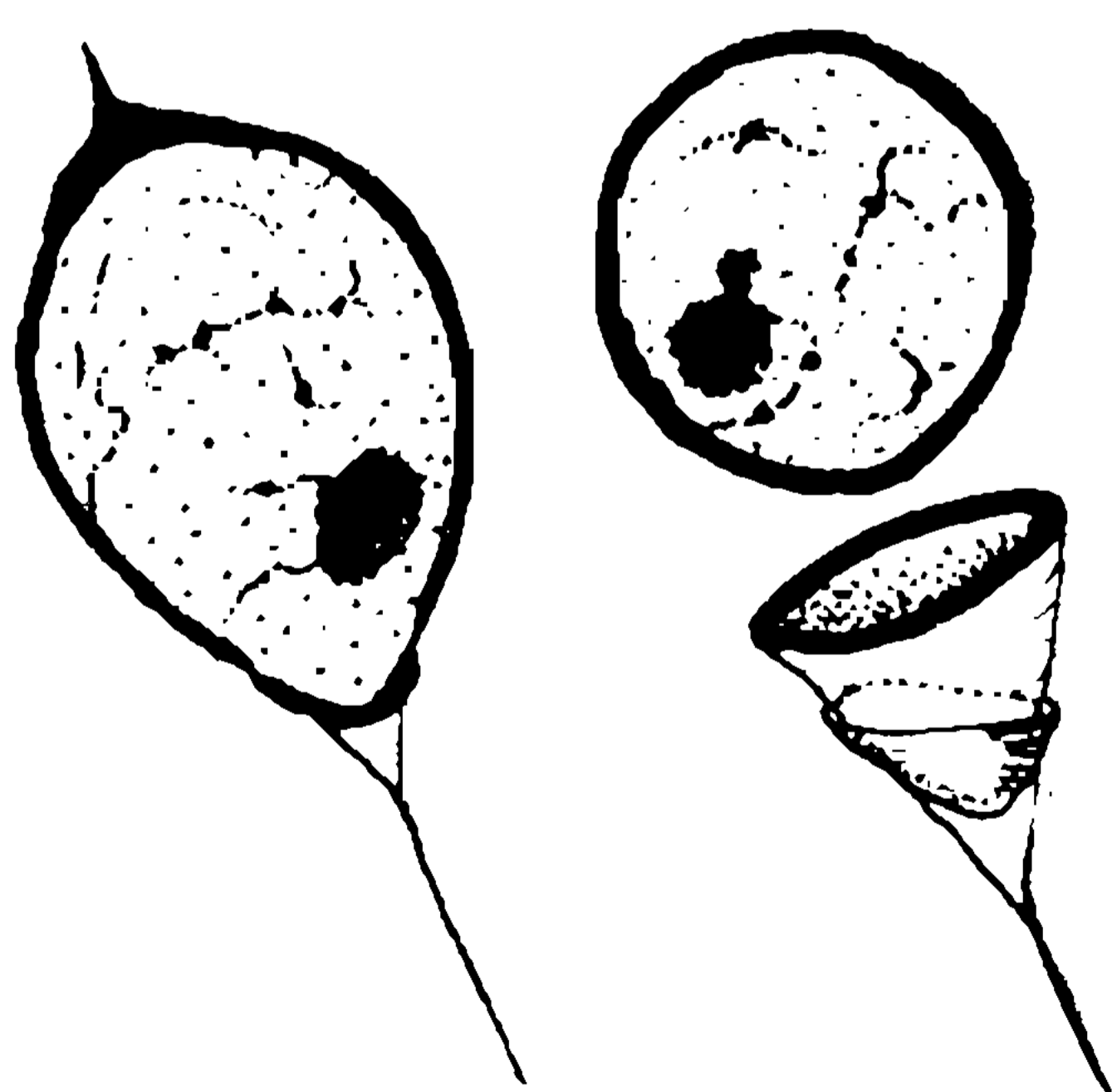


Fig. 54

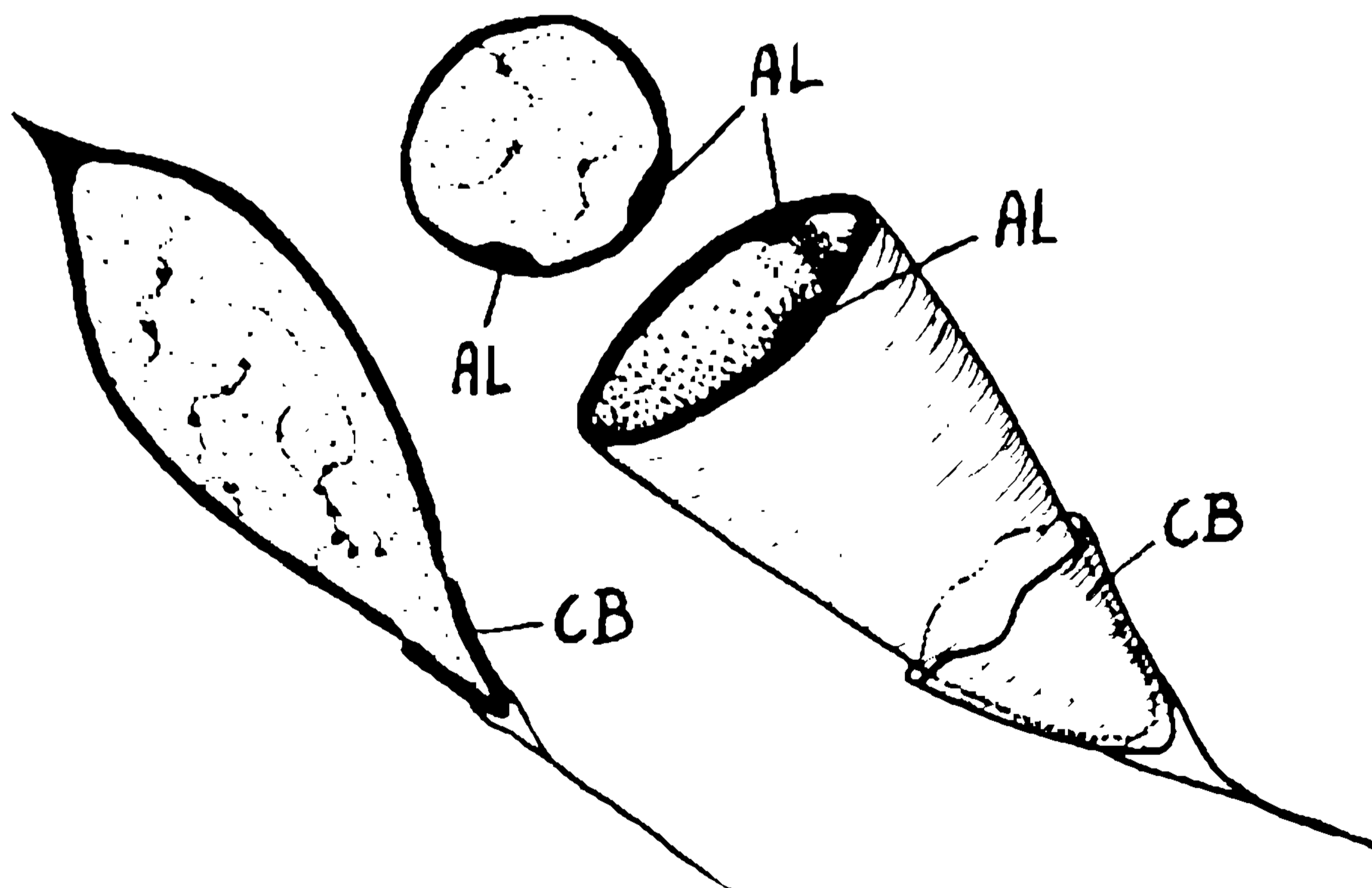


Fig. 55

## ESTAMPA 11

- Fig. 56: Núcleos no início da segunda fase de alongamento.
- Fig. 57: Núcleos na segunda fase de alongamento.
- Fig. 58: Núcleos na segunda fase de alongamento. Em cima três cortes transversais da cauda.
- Fig. 59: Núcleos no início da segunda fase de alongamento (sem protoplasma). As letras a-d referem-se a quatro cortes do mesmo núcleo em diferentes alturas. As translações das arestas cromáticas em cortes subsequentes, no sentido inverso do relógio indicam a posição das mesmas em forma de espiral.
- Fig. 60: Série de cortes subsequentes de um único núcleo da segunda fase de alongamento em diferentes alturas. a) no meio; b) em cima do cone basal dos centríolos; c)-f) na borda superior do cone basal; g) no cone basal; h) na extremidade basal do cone; i) corte da cauda.

Fig. 56 — Kerne im Anfang der zweiten Streckungsphase.

Fig. 57 — Kerne während der zweiten Streckungsphase.

Fig. 58 — Kerne während der zweiten Streckungsphase. Oben drei Querschnitte durch den Schwanz.

Fig. 59 — Kerne im Anfang der zweiten Streckungsphase (ohne Protoplasma). Die Buchstaben a-d beziehen sich auf vier Querschnitte desselben Kerns in verschiedenen Höhen. Die Verlagerung der Chromatinleisten in sich folgenden Schnitten gegen den Uhrzeigersinn deutet auf ihren spiraligen Verlauf hin.

Fig. 60 — Serie von Querschnitten durch einen Kern der zweiten Streckungsphase in verschiedenen Höhen. a) in der Mitte; b) oberhalb des Basalkegels der Centriole; c)-f) am oberen Rand des Basalkegels; g) im Basalkegel; h) an der Spitze des Kegels; i) Schnitt durch den Schwanz.

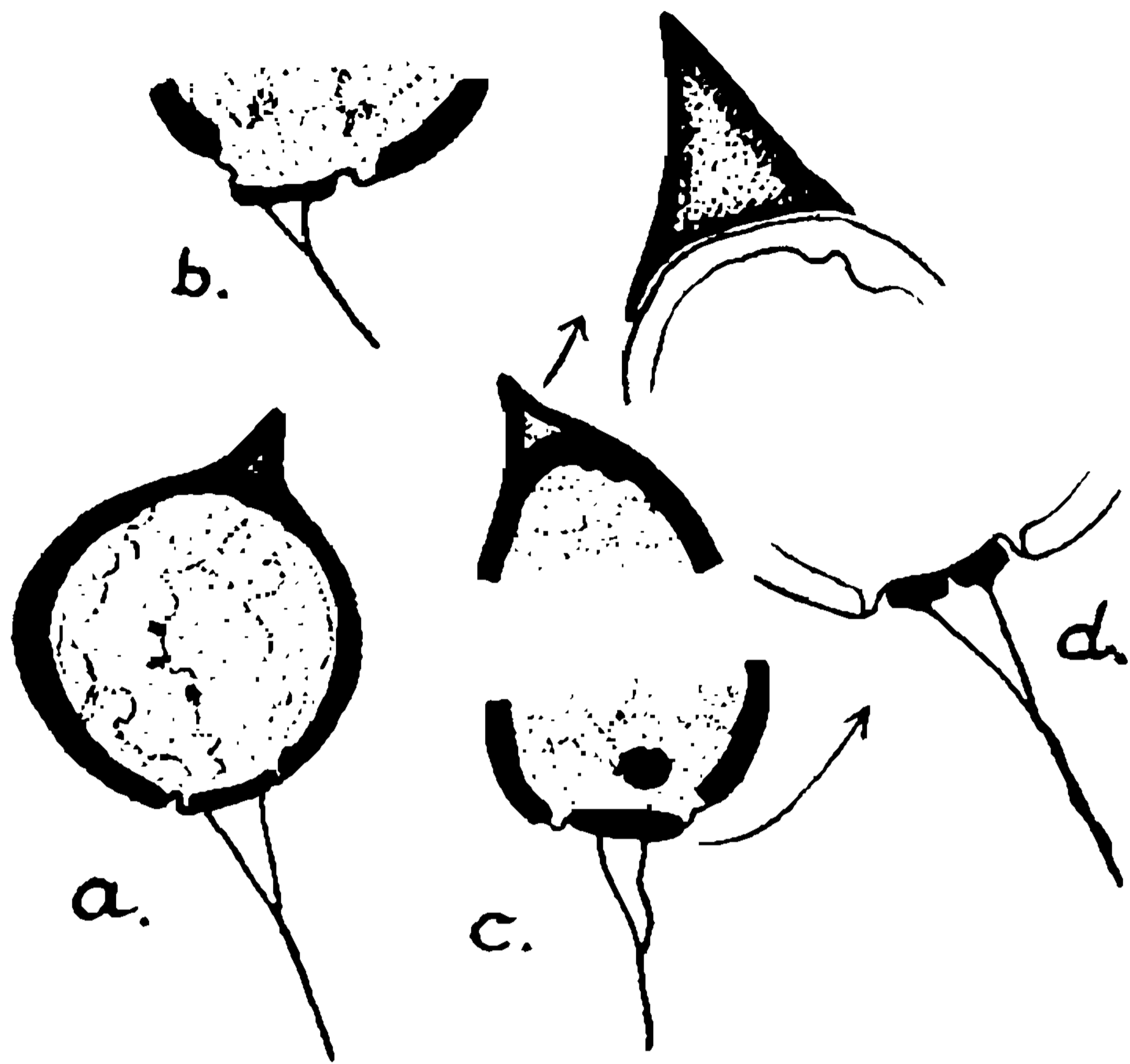


Fig. 49

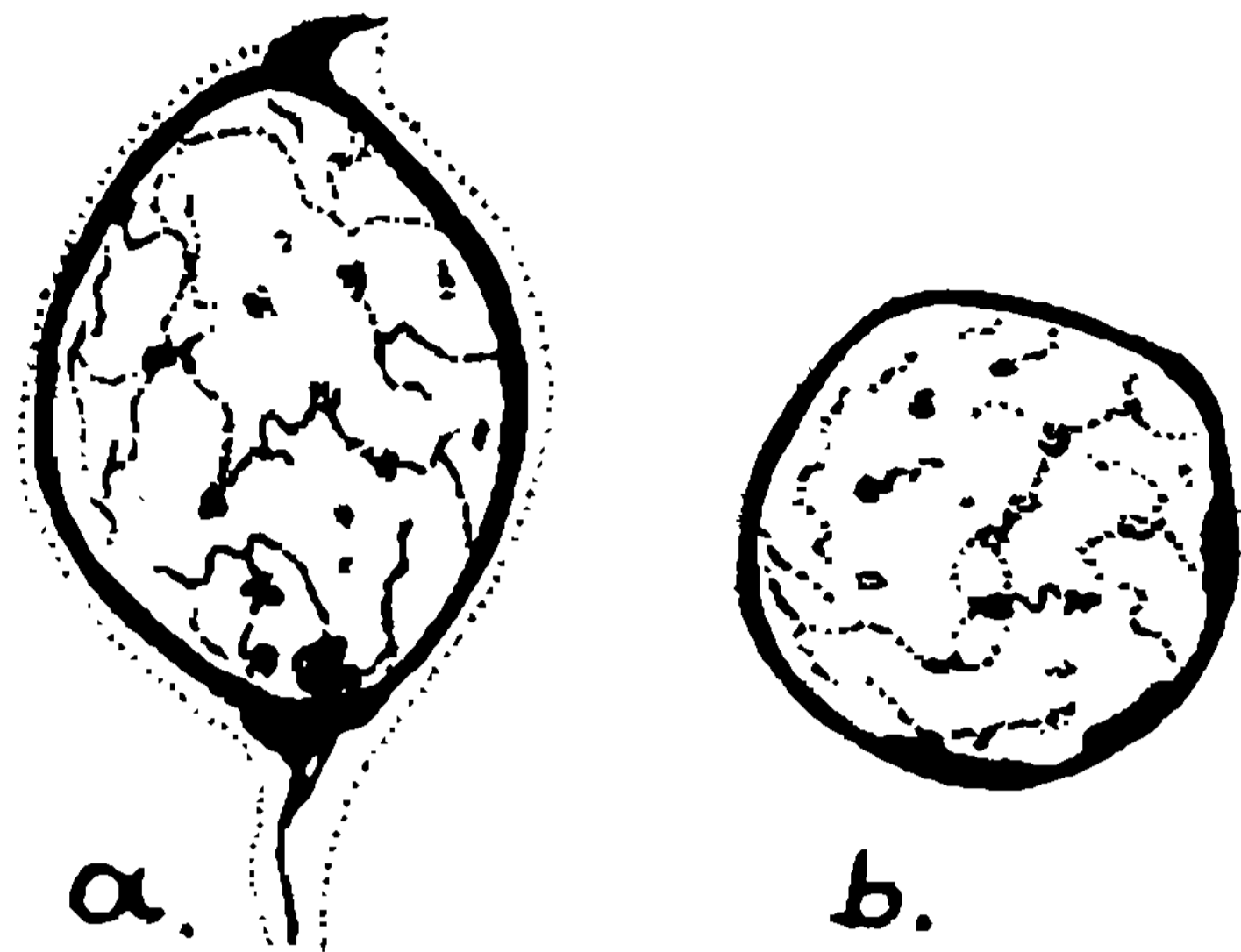


Fig. 50

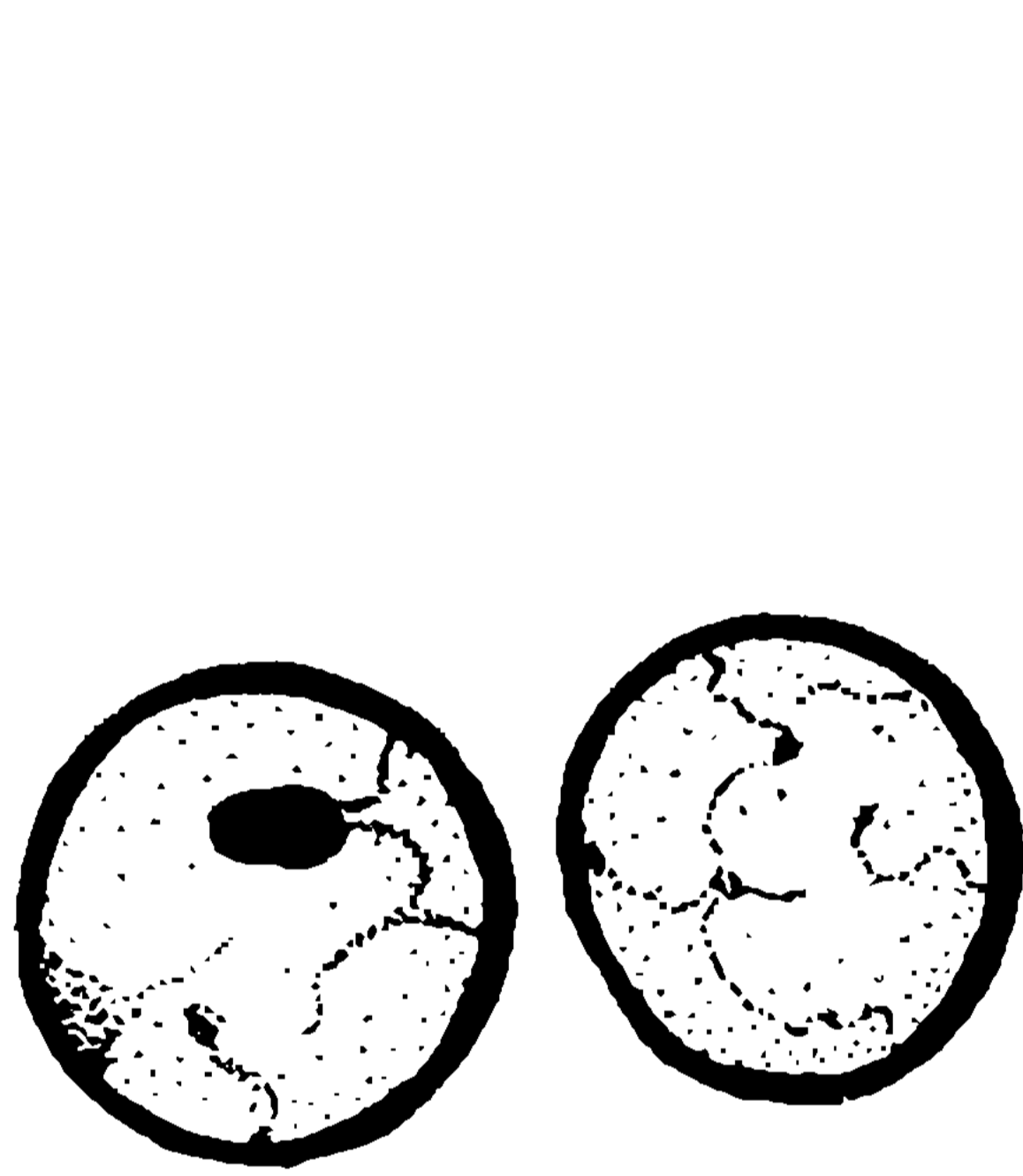


Fig. 51

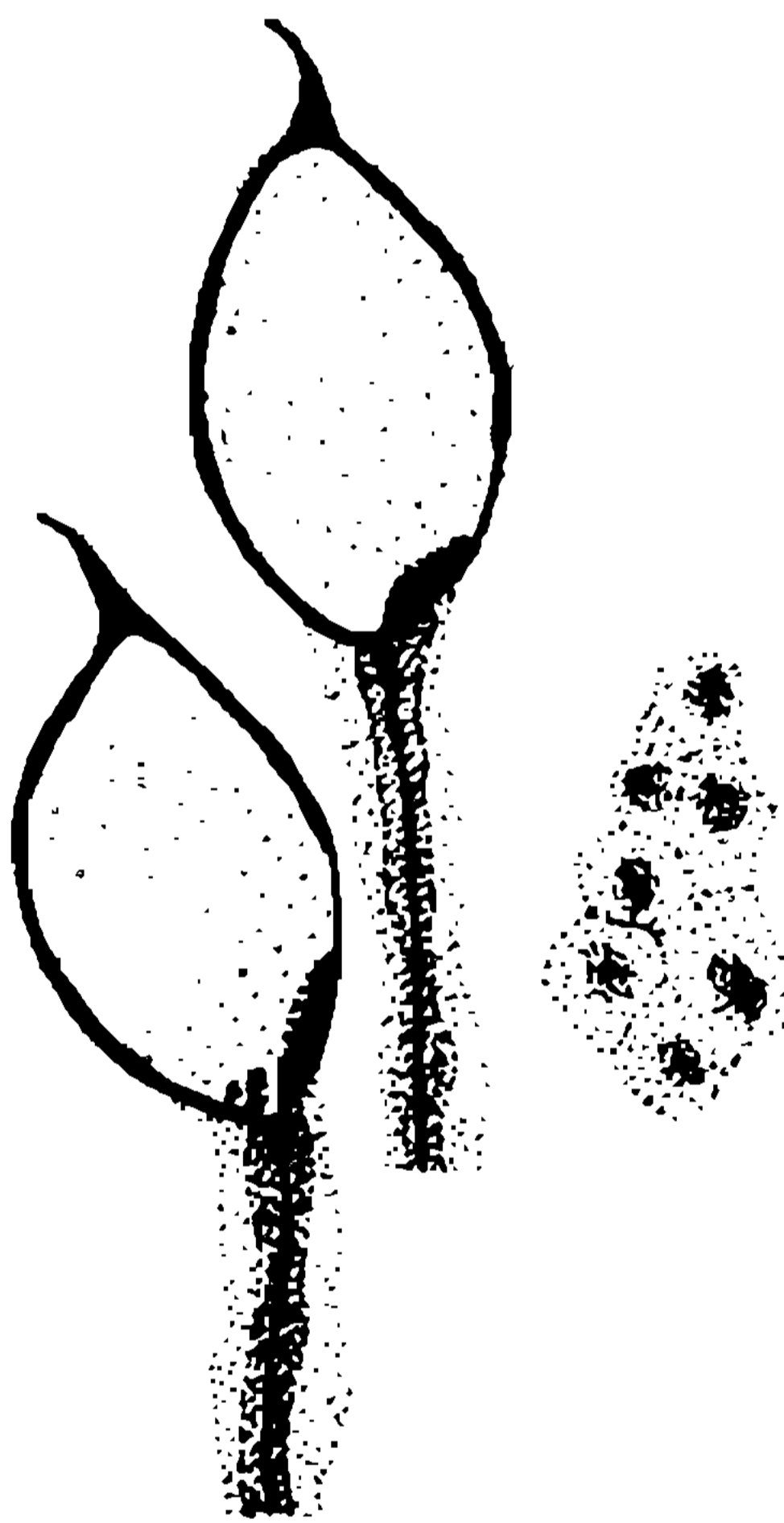


Fig. 52

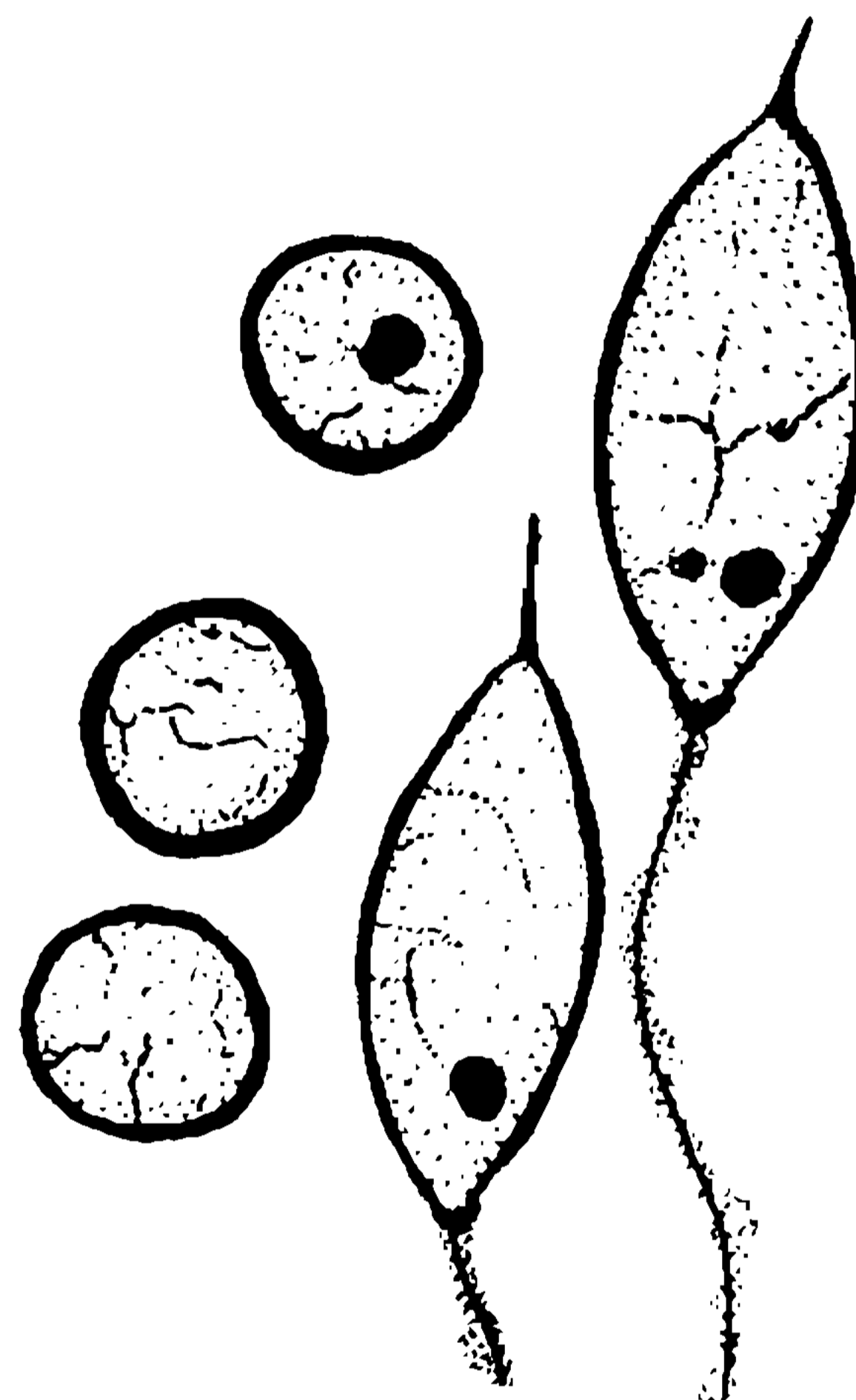


Fig. 53

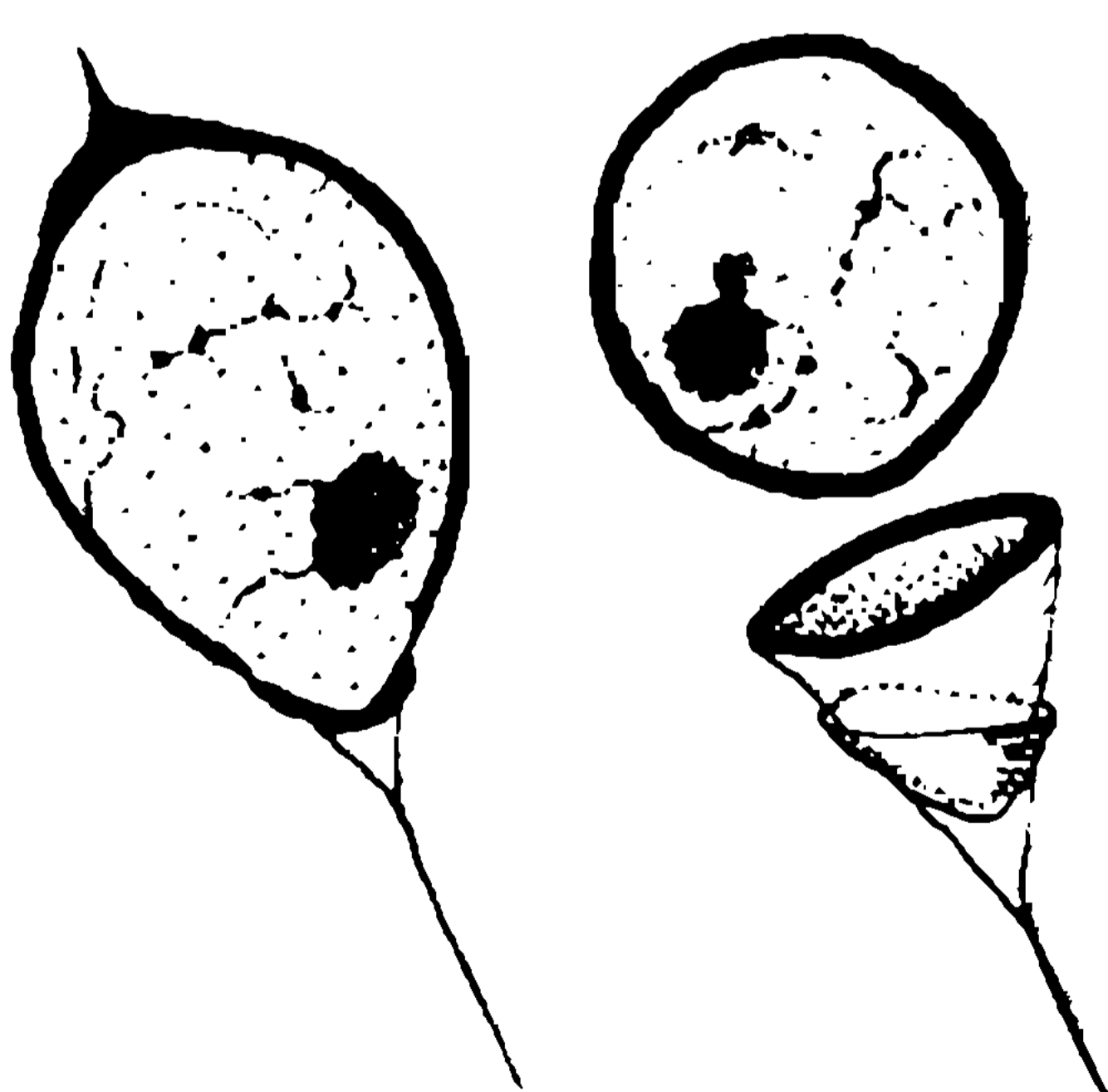


Fig. 54

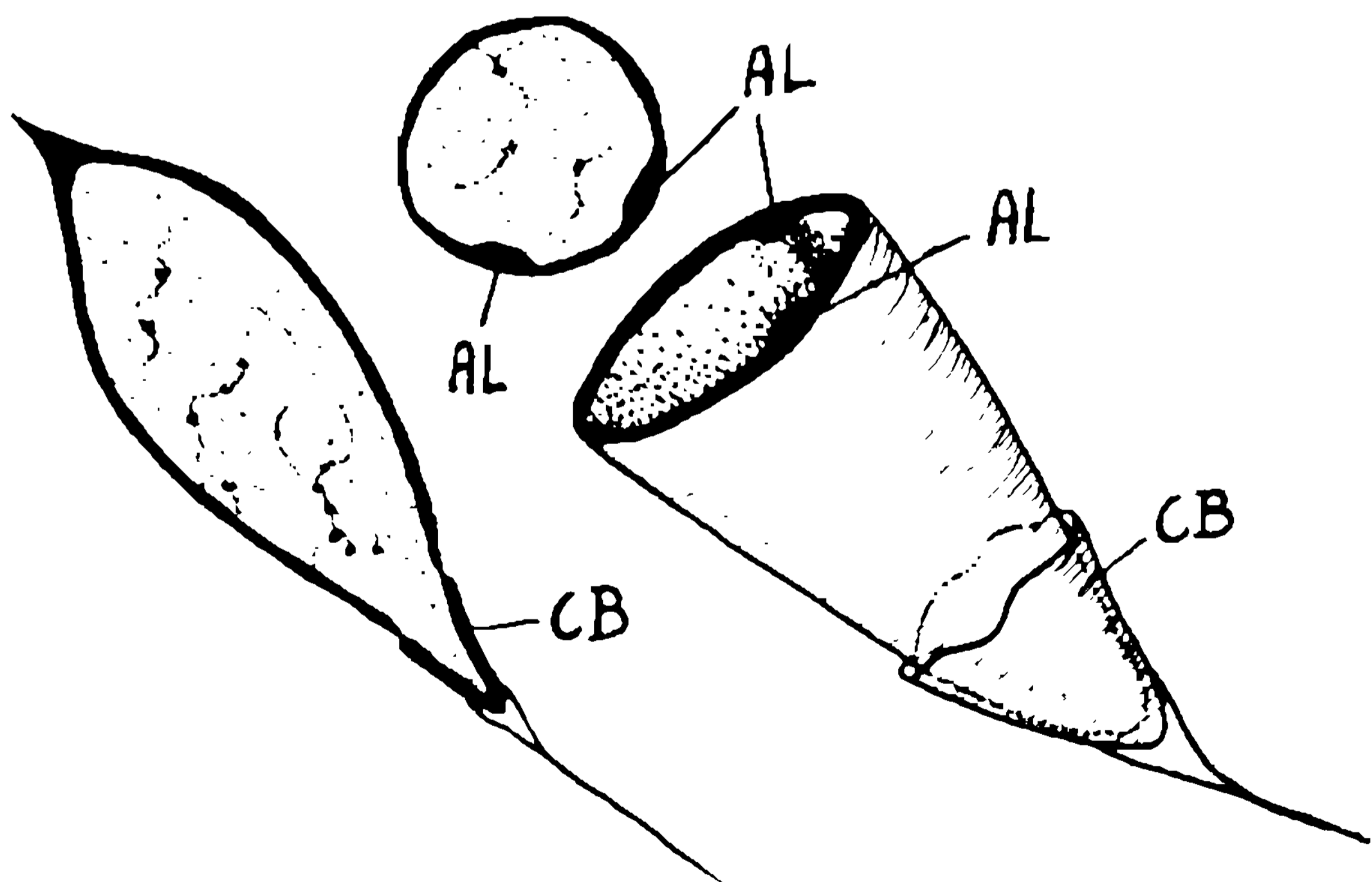


Fig. 55

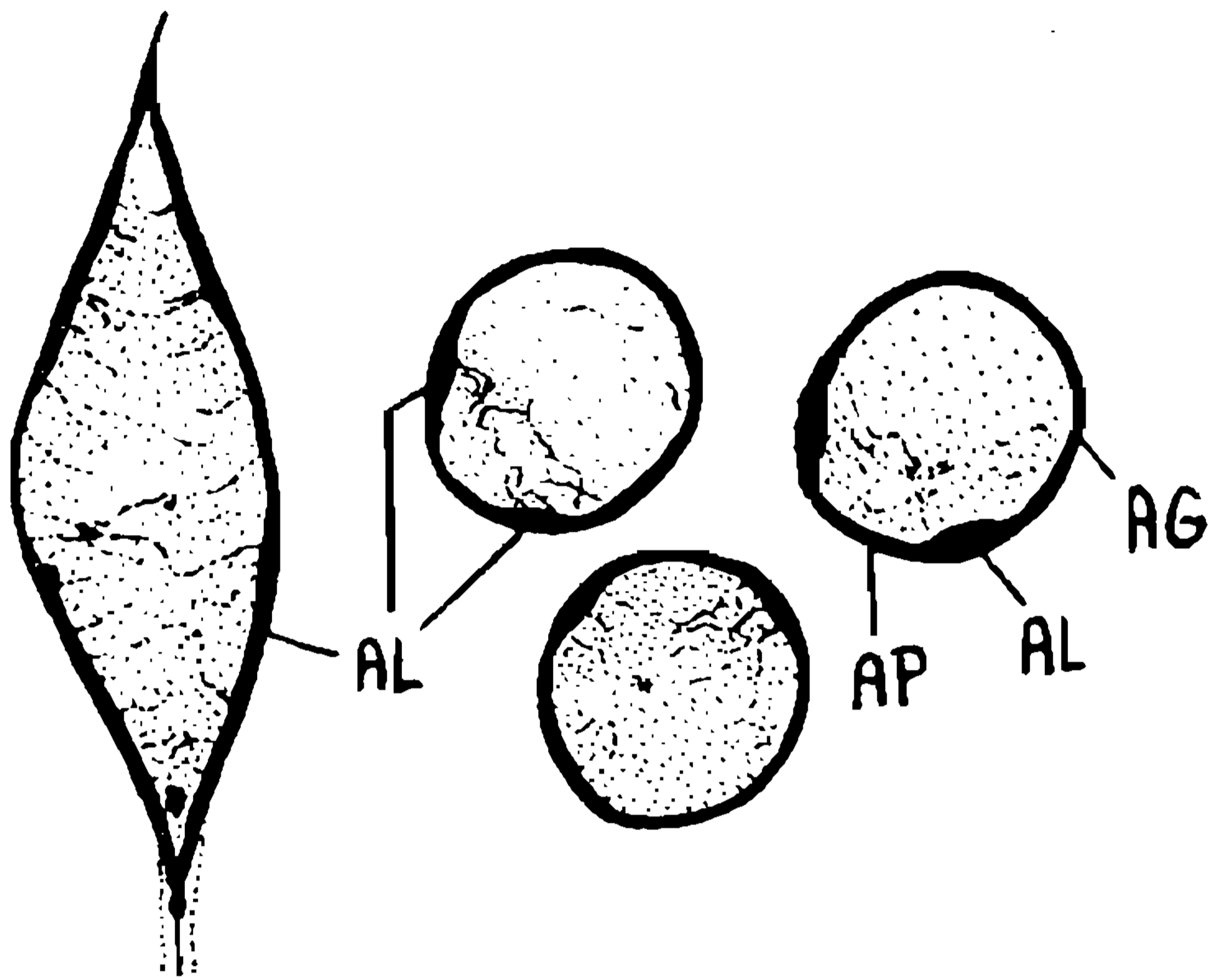


Fig. 56

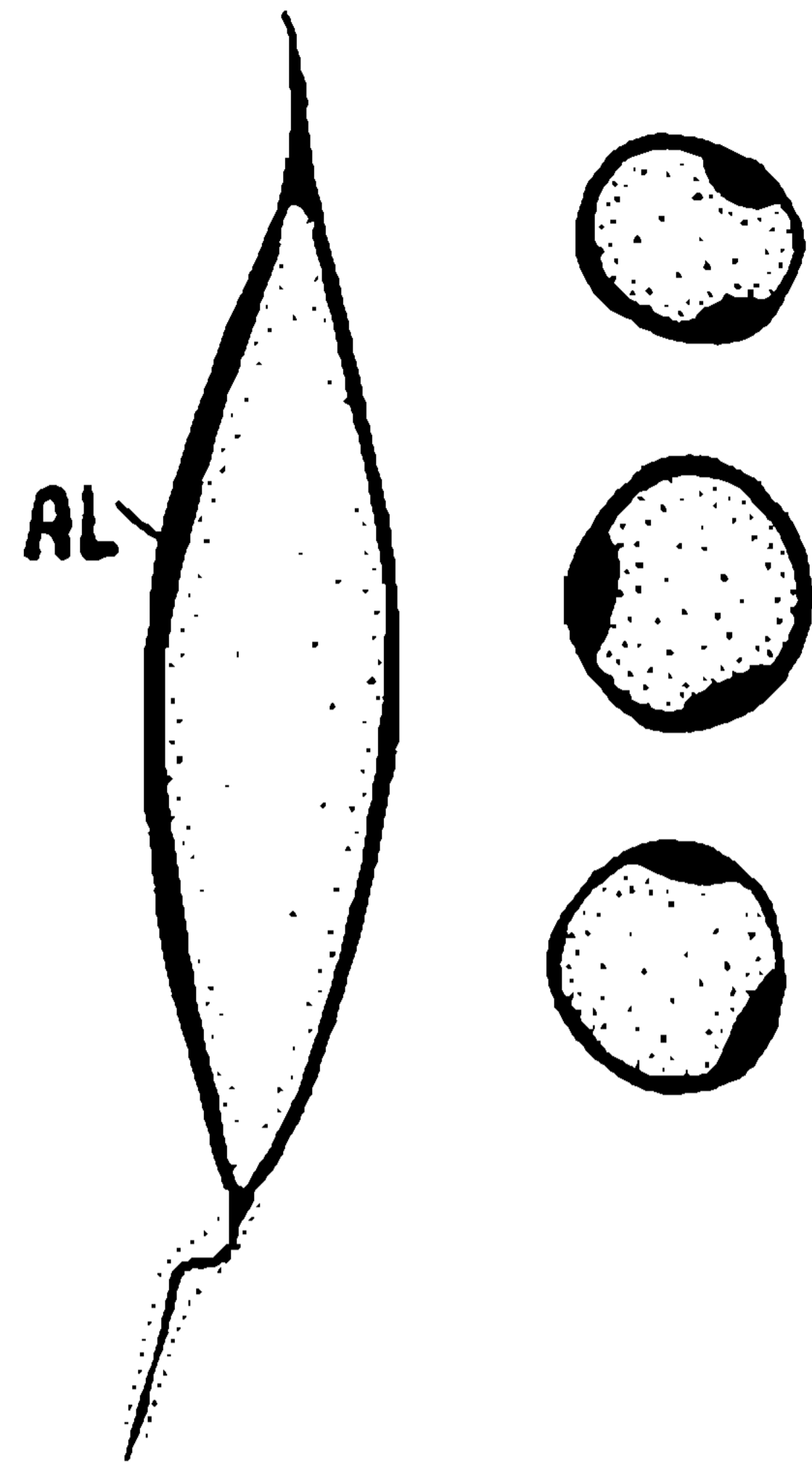


Fig. 57

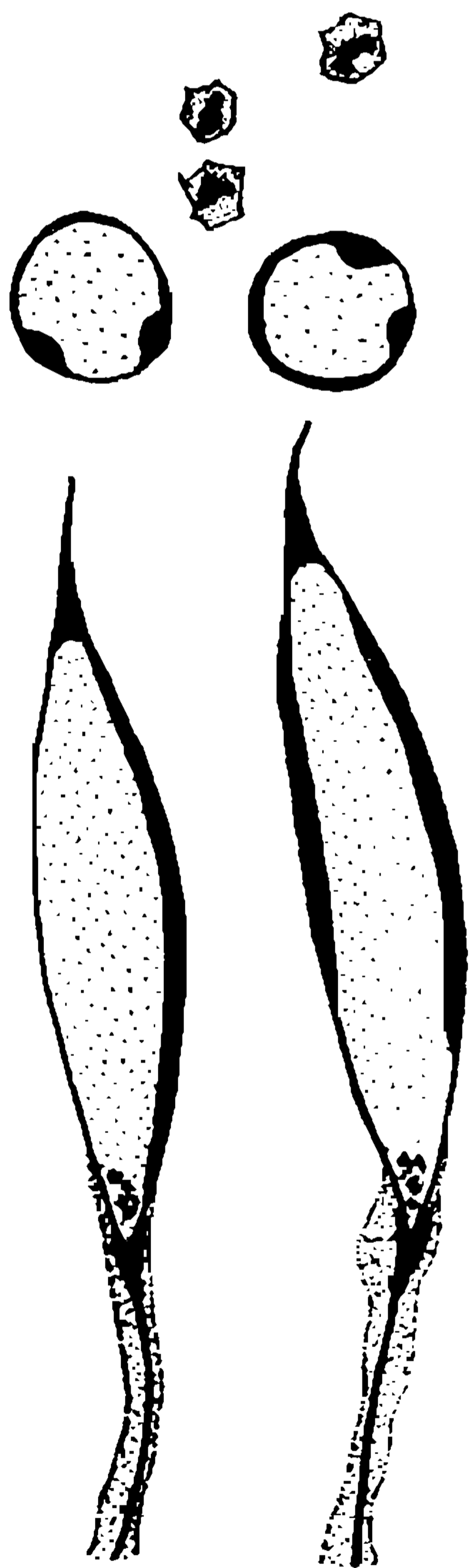


Fig. 58

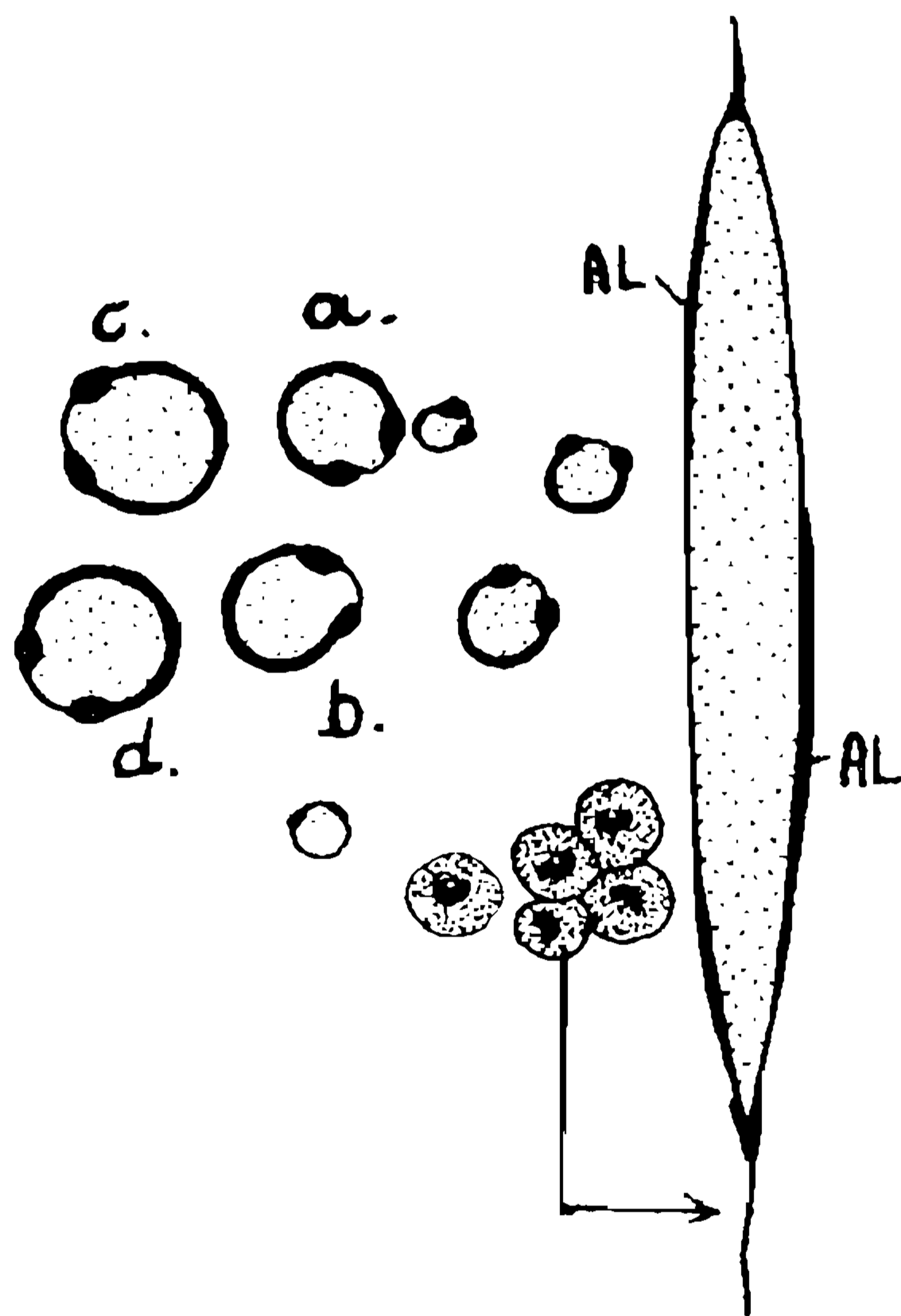


Fig. 59

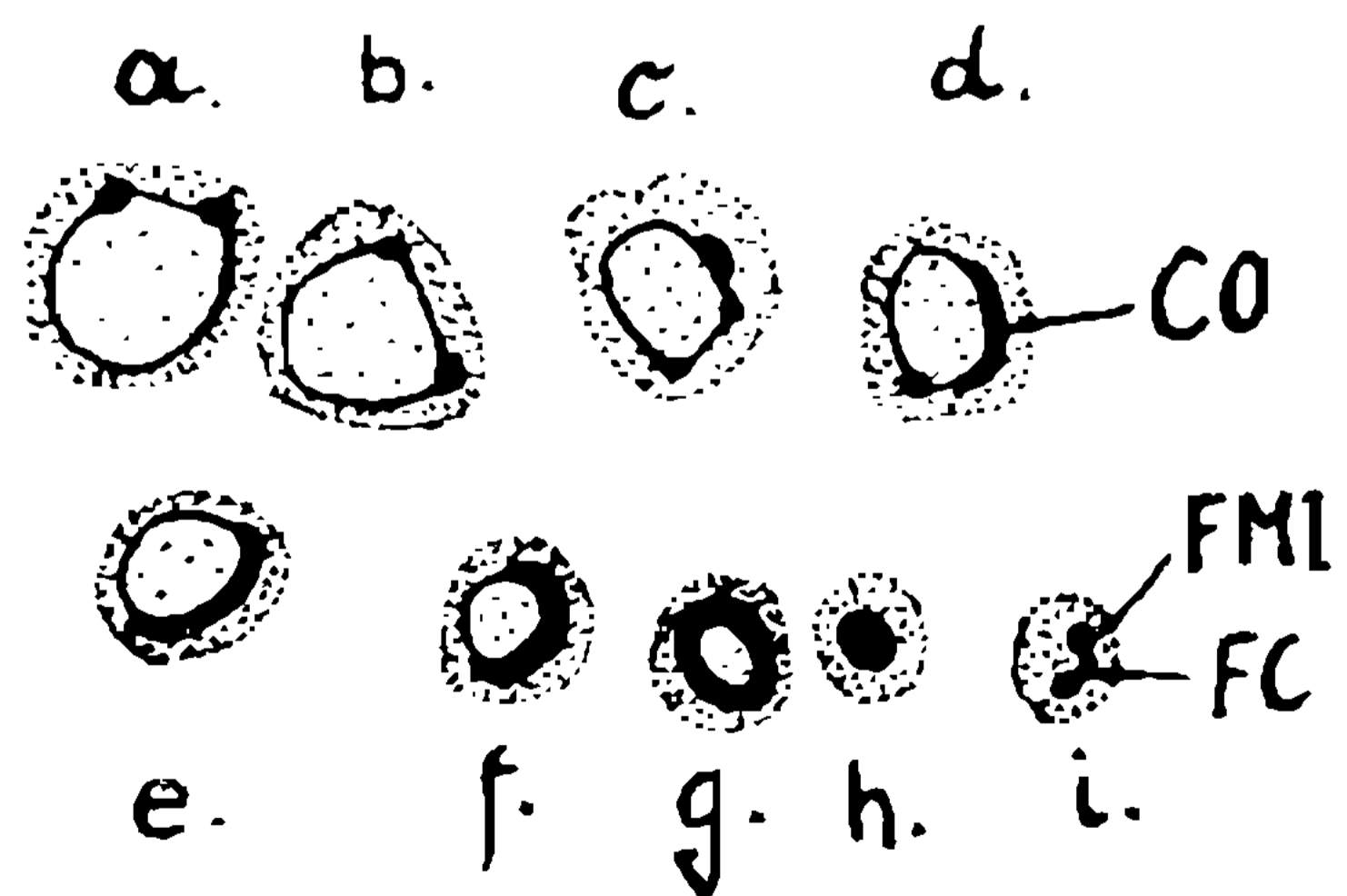


Fig. 60



## ESTAMPA 12

- Fig. 61: Reconstrução do núcleo e cortes transversais no início da fase dos núcleos em forma de ferradura.
- Fig. 62: Cortes transversais dos núcleos em forma de ferradura.
- Fig. 63: Cortes transversais dos núcleos em forma de ferradura, e uma parte do corte longitudinal do núcleo muito alongado.
- Fig. 64: Cortes transversais dos núcleos em forma de ferradura e da cauda com o fio axial e os dois grupos de substância mitocondrial.
- Fig. 65: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura.
- Fig. 66: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura. Alongamento avançado.
- Fig. 67: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura. Alongamento avançado.
- Fig. 68: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura. Alongamento avançado.
- Fig. 69: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura. Núcleos muito alongados. a)-d) diferentes estádios de alongamento.
- Fig. 70: Cortes transversais de núcleos em forma de ferradura. Núcleo quase do comprimento definitivo da cabeça do espermio maduro.

Fig. 61 — Rekonstruktion des Kerns und Querschnitte im Anfang der Phase der hufeisenfoermigen Kerne.

Fig. 62 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform.

Fig. 63 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform und Teil eines Laengsschnittes eines stark gestreckten Kerns.

Fig. 64 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform und durch den Schwanz mit dem Axialfaden und den beiden Gruppen aus mitochondrialer Substanz.

Fig. 65 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform.

Fig. 66 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform, stark gestreckt.

Fig. 67 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform, stark gestreckt.

Fig. 68 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform, stark gestreckt.

Fig. 69 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform. Kerne sehr stark gestreckt a)-d) Verschiedene Stadien der Streckung.

Fig. 70 — Querschnitte durch Kerne in Hufeisenform. Kern fast von der Laenge des Kopfes des reifen Spermiums.

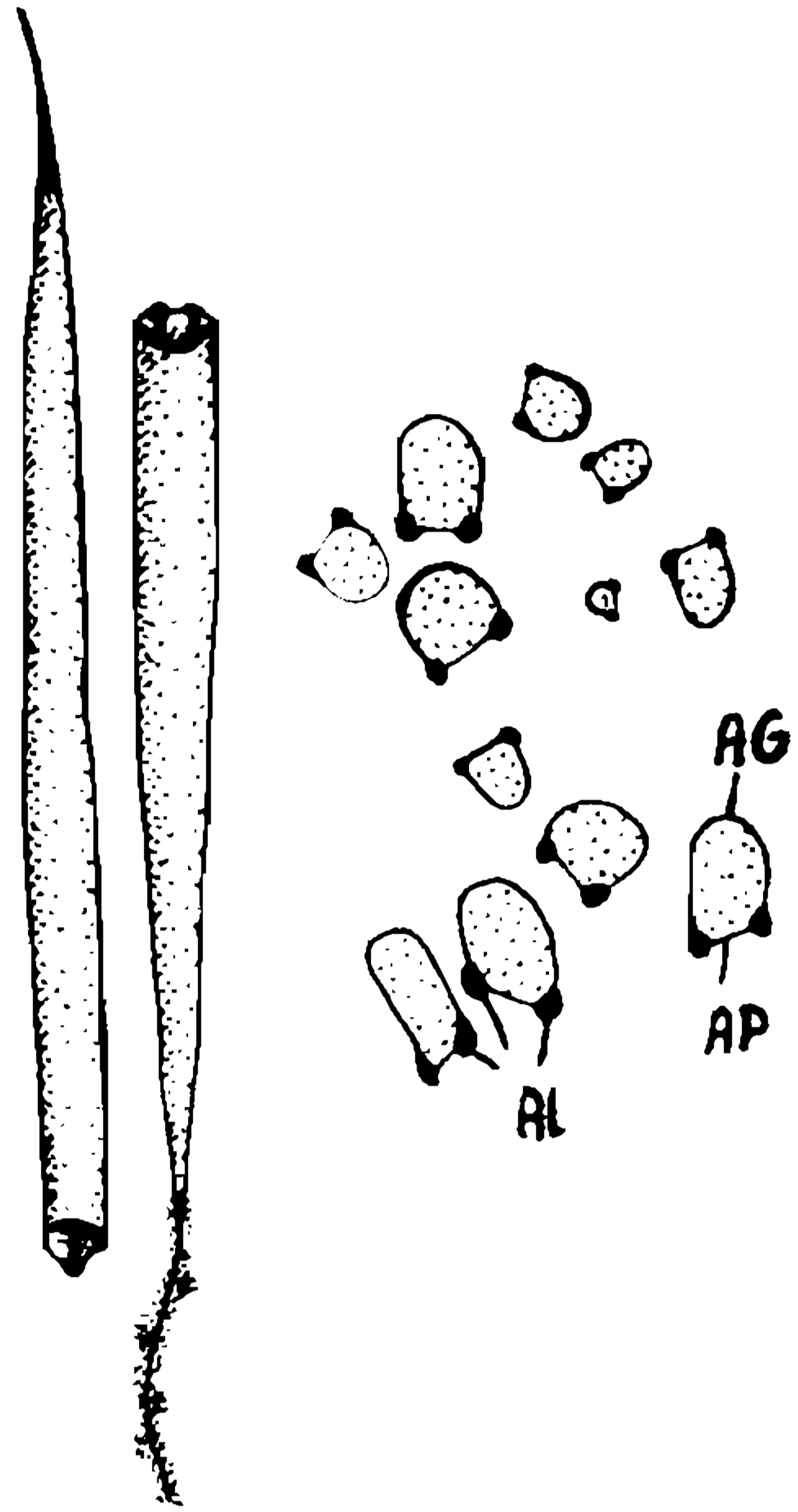


Fig. 61

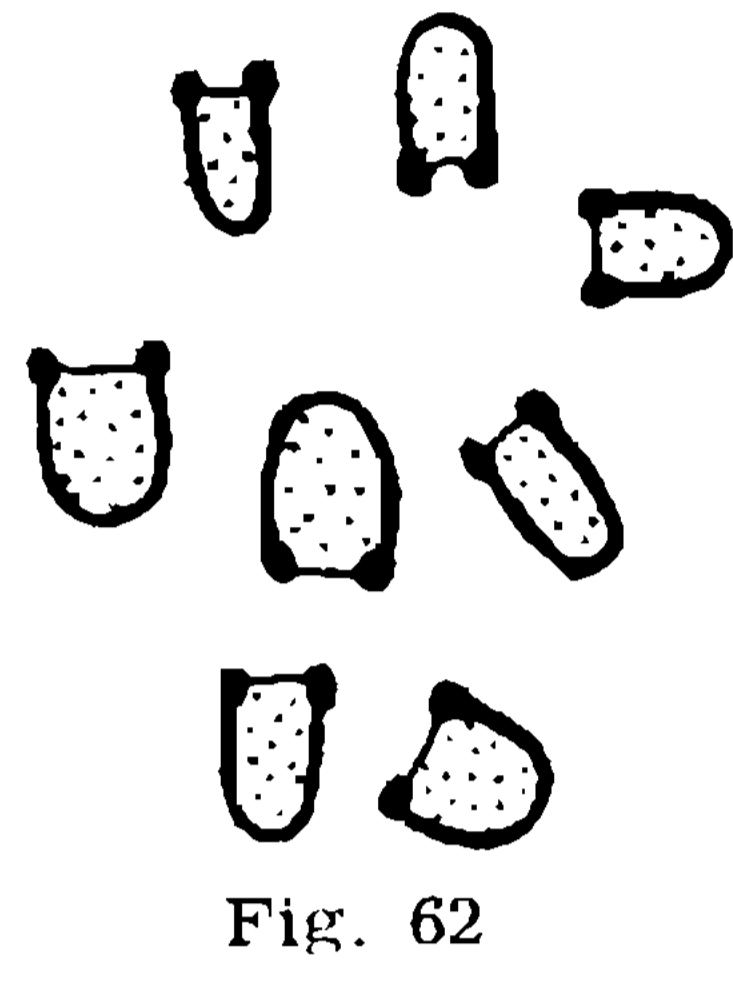


Fig. 62

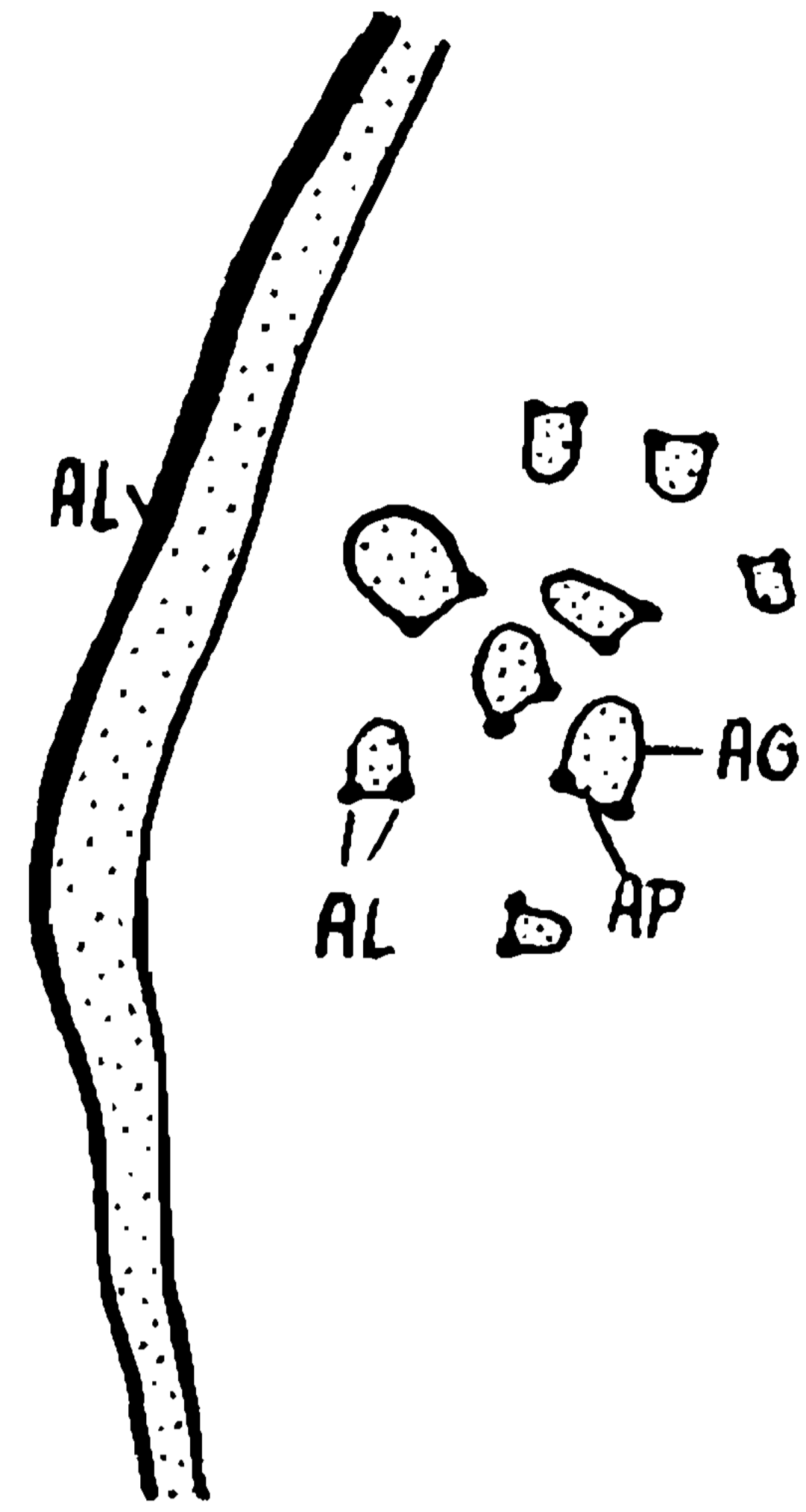


Fig. 63



Fig. 64

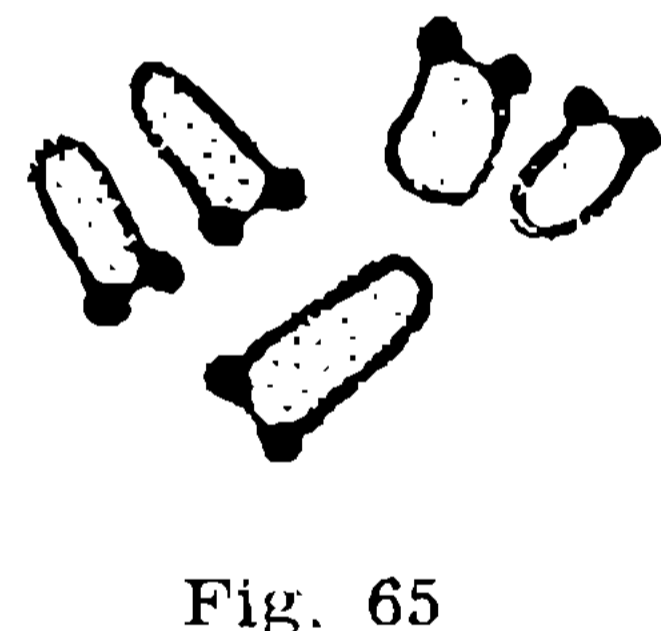


Fig. 65

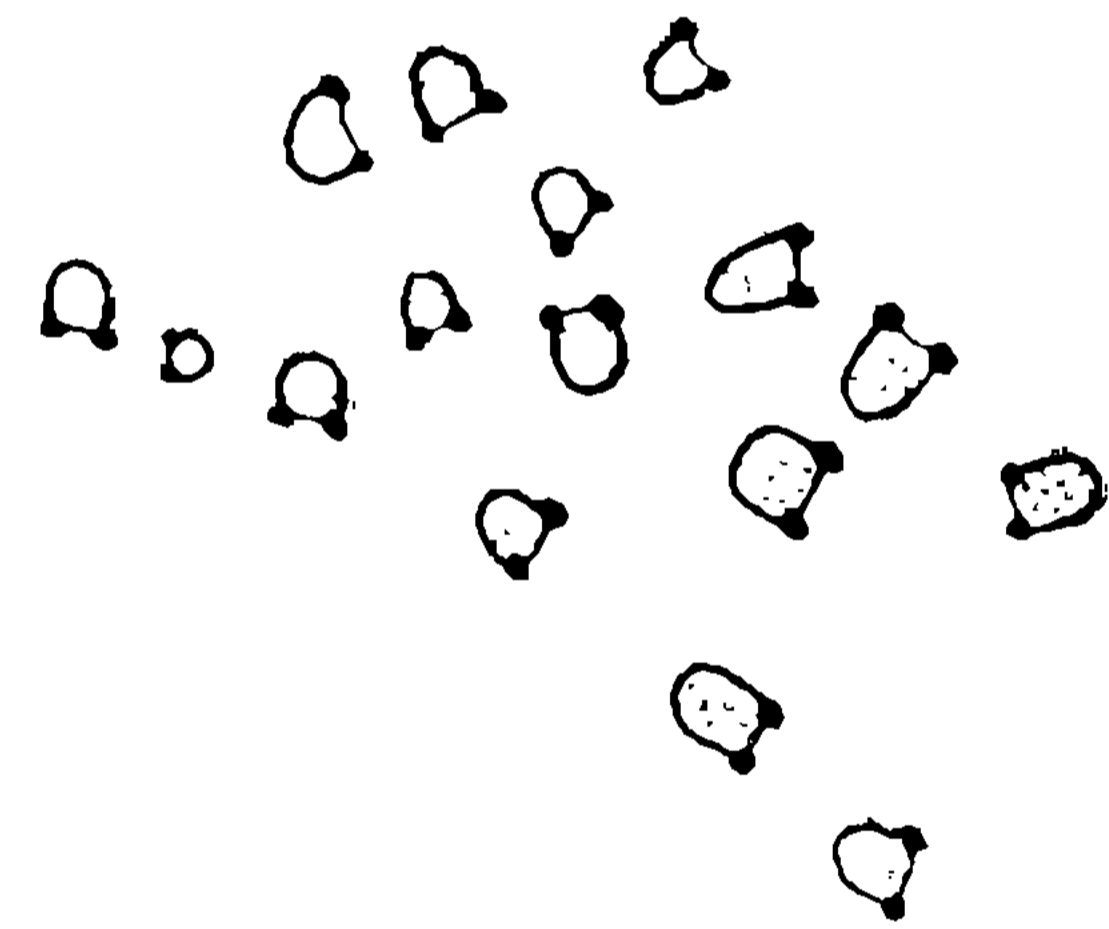


Fig. 66

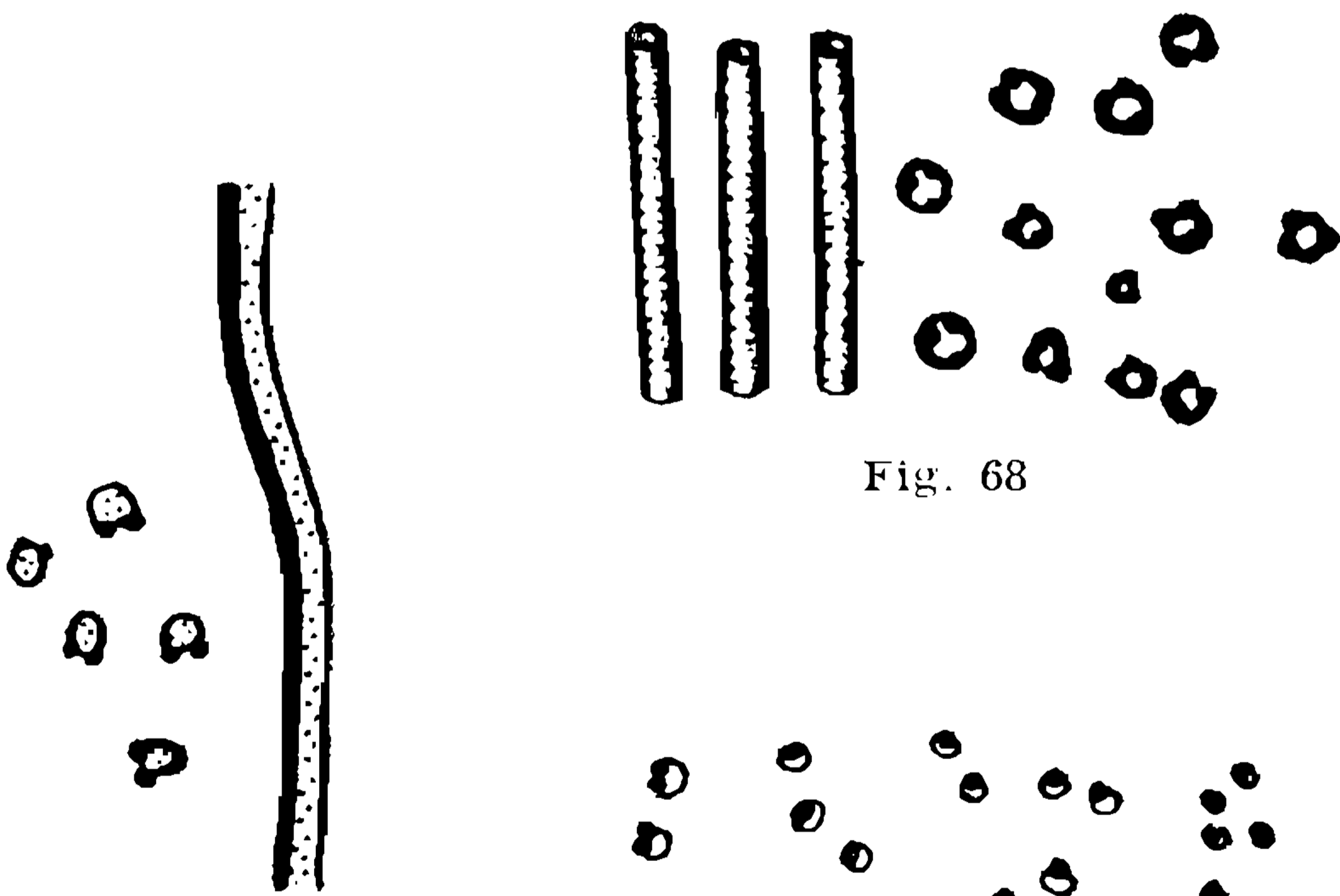


Fig. 68

Fig. 67

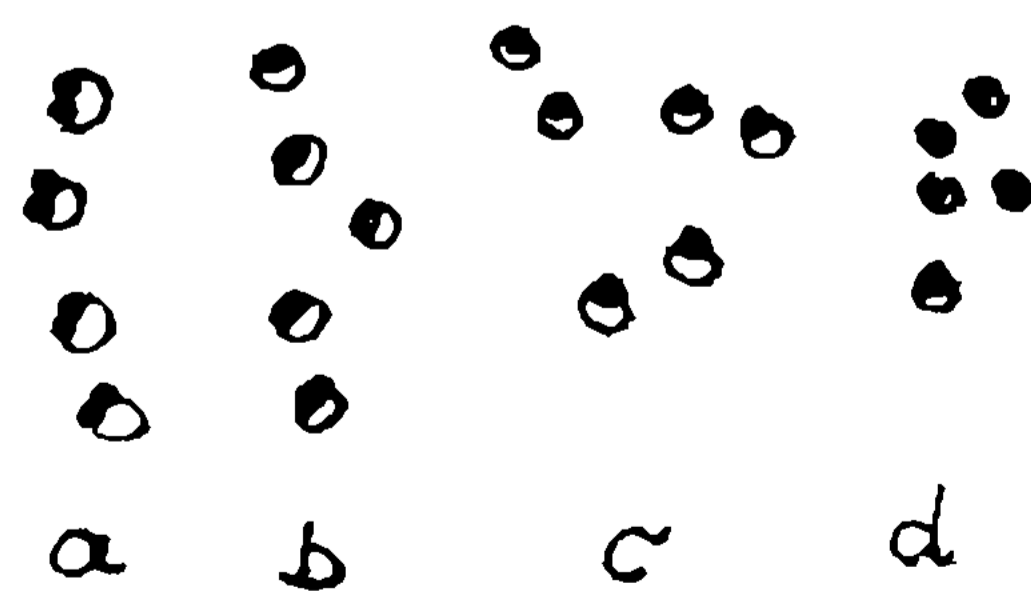


Fig. 69

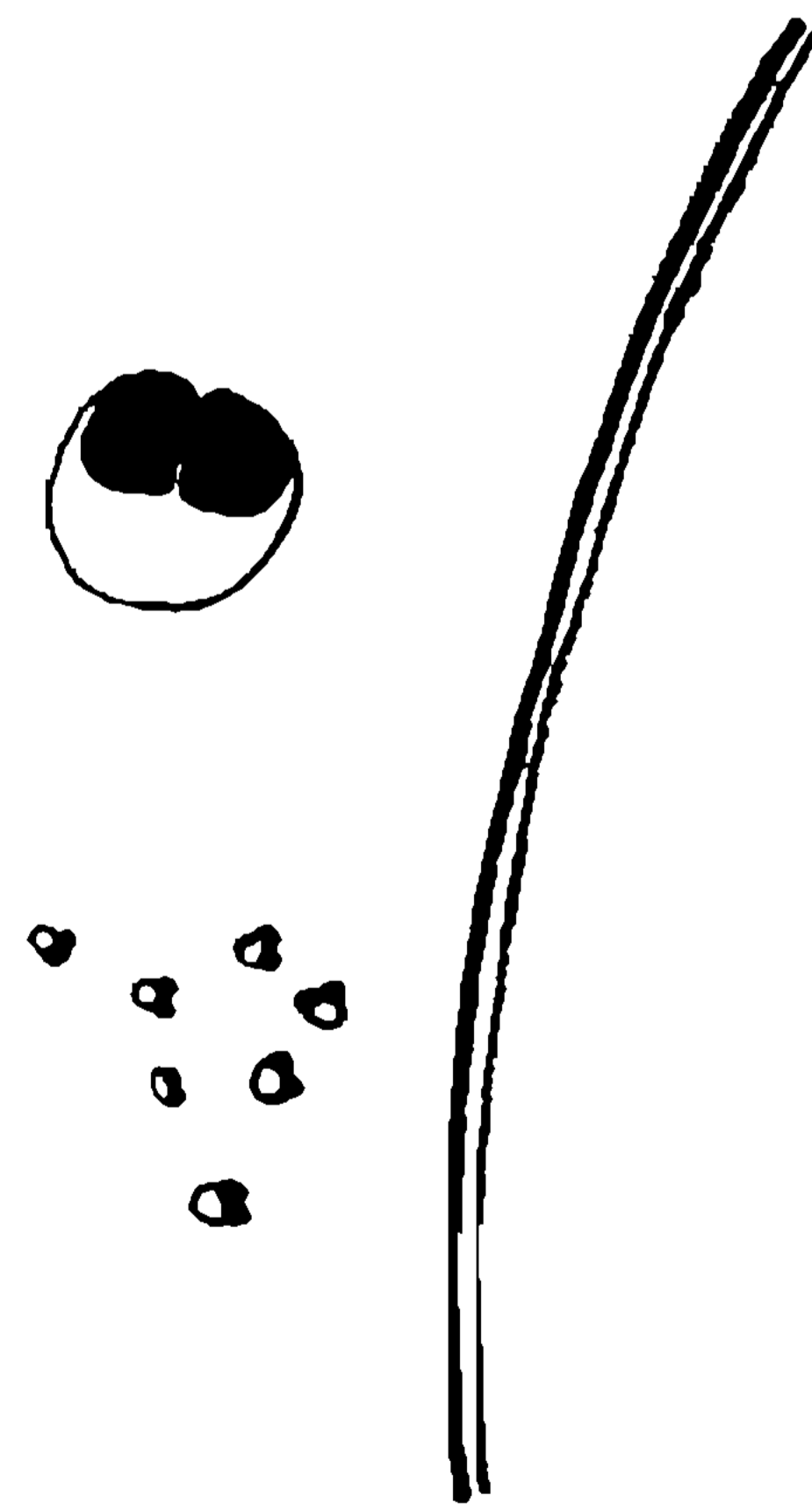


Fig. 70

### ESTAMPA 13

- Fig. 71: Espérmios maduros. As setas indicam a zona entre a cabeça e cauda. Aumento 1 420 vêzes.
- Fig. 72: Espérmio maduro. Extremidade apical da cabeça com acrosoma, e parte do meio da cauda com os elementos fibrilosos (preto) e o manto de protoplasma (transparente). Aumento 7 000 vêzes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 73: Cabeça e parte inicial da cauda de espérmios maduros, tratados em água destilada (50 minutos) e fixadas por gás de ácido ósmico. Coloração com "Kernechtrot". Contraste de fases. ACR acrosoma; CA cabeça; FA fio axial; FMI fios mitocondriais.

Fig. 71: Reife Spermien. Die Pfeile bezeichnen die Zone zwischen Kopf und Schwanz. Vergrößerung 1 420 fach.

Fig. 72 — Reifes Spermium. Spitze des Kopfes mit Acrosom und ein Teil aus der Mitte des Schwanzes mit den fibrillaeren Elementen (schwarz) und dem Protoplasmamantel (transparent). Vergrößerung 7 000 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 73 — Kopf und Anfangsteil des Schwanzes reifer Spermien nach Behandlung mit destilliertem Wasser (50 Minuten) und Fixierung mit Osmiumdampf. Färbung mit Kernechtrot. Phasenkontrast. ACR Acrosom; CA Kopf; FA Axialfaden; FMI Mitochondriale Faeden.

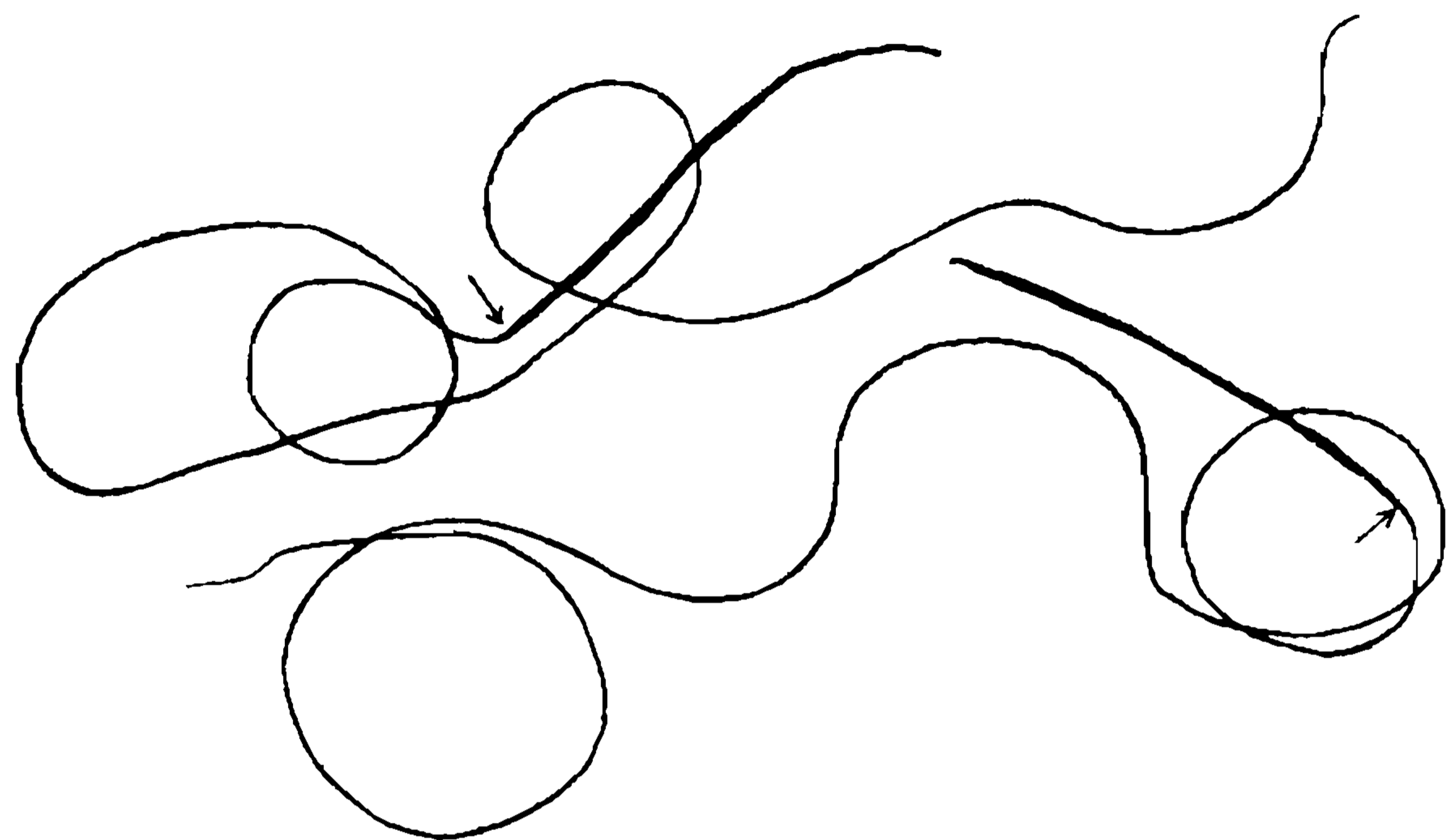


Fig. 71



Fig. 72

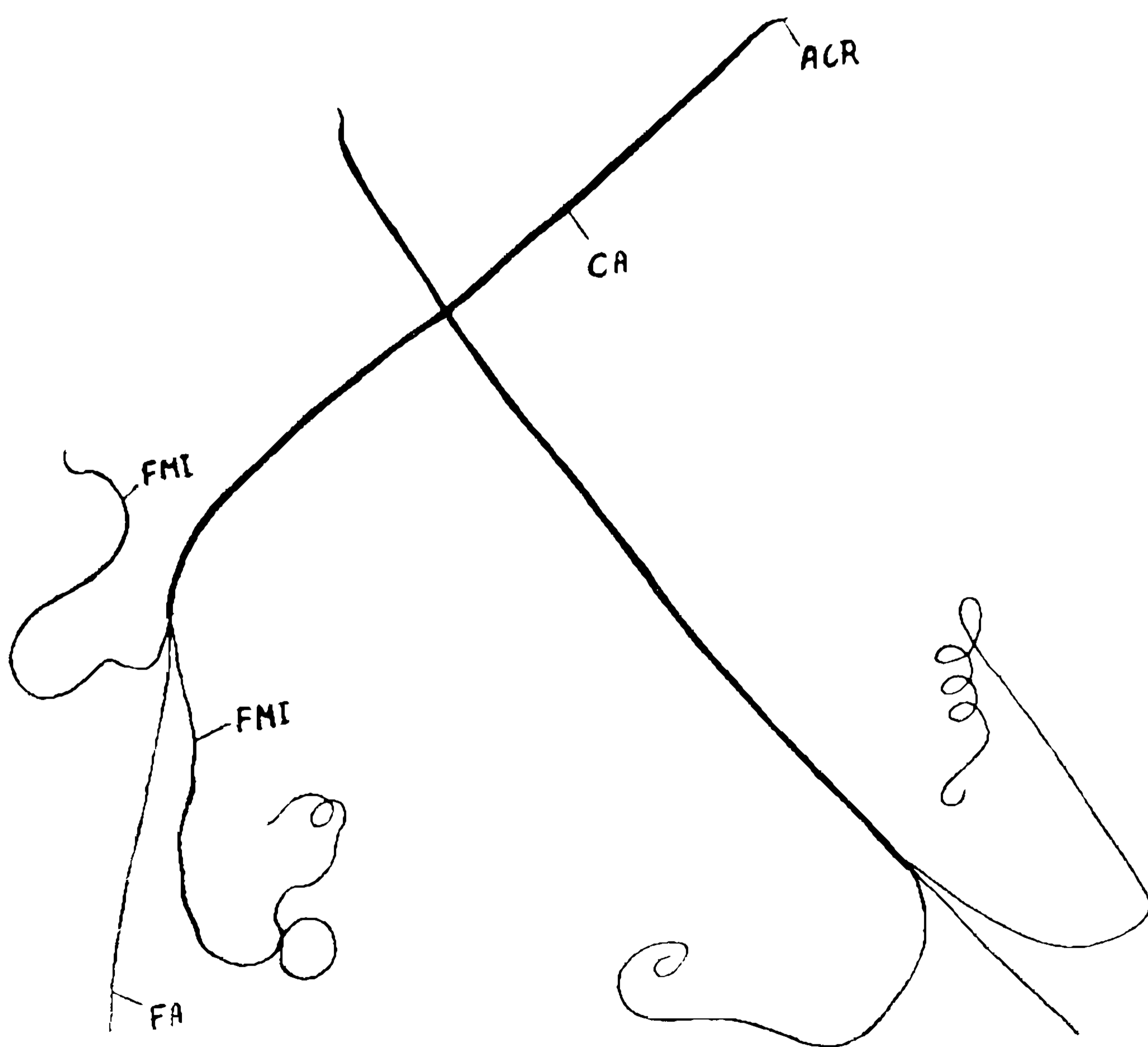


Fig. 73

#### ESTAMPA 14

- Fig. 74:** Parte do flagelo dilacerado com 6 fios mitocondriais e filamentos do manto protoplasmático. Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 75:** Início de dilaceração. Os dois grupos de fios mitocondriais são desintegrados, formando, cada um, dois fios duplos. Aumento 7 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 76:** Parte do flagelo dilacerado. A região compõe-se de dois grupos, contendo cada um quatro fios mitocondriais, e de numerosos fios finos do manto protoplasmático. Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 77:** Parte do flagelo dilacerado. As duas condensações de mitocôndrios da parte integral do flagelo (à esquerda) dão origem a oito fios mitocondriais. Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 78:** Parte do flagelo dilacerado. 1-8: os fios mitocondriais; FA: fio axial, composto de dois elementos. Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 79:** Parte do flagelo dilacerado. 1-8: os fios mitocondriais; FA: fio axial; composta de dois elementos. Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.

Fig. 74 — Teil einer dilazierten Geißel mit 6 mitochondrialen Fibrillen und protoplasmatischen Mikrofibrillen. Vergrößerung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 75 — Beginn der Dilazeration. Die beiden Gruppen mitochondrialer Filamente sind gesprengt und formen je zwei Doppelfäden. Vergrößerung 7 300 fach. Fotografie durch H. Muth im Elektronen-Mikroskop.

Fig. 76 — Teil einer dilazierten Geißel, bestehend aus zwei Gruppen aus je vier mitochondrialen Filamenten und zahlreichen protoplasmatischen Mikrofibrillen. Vergrößerung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 77 — Teil einer dilazierten Geißel. Die beiden Kondensationen von Mitochondrienmaterial des nicht zerlegten Teils der Geißel (links) desintegrieren sich in insgesamt acht Filamente. Vergrößerung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 78 — Teil der dilazierten Geißel. 1-8: mitochondriale Filamente; FA Axialfaden, zusammengesetzt aus zwei Filamenten. Vergrößerung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 79 — Teil der dilazierten Geißel. 1-8: mitochondriale Filamente; FA Axialfaden, aus zwei Filamenten zusammengesetzt. Vergrößerung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.



Fig. 74



Fig. 75

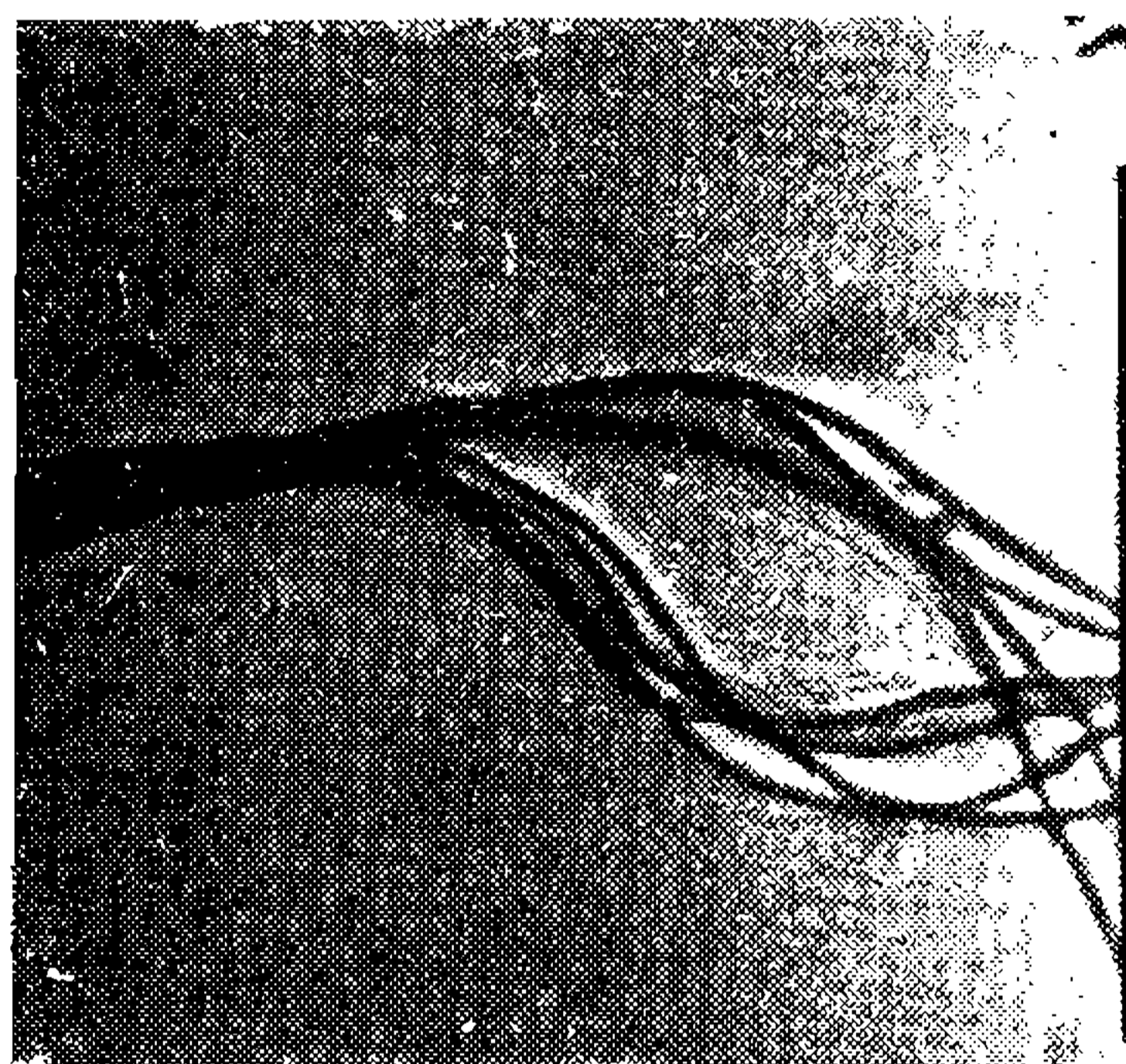


Fig. 76



Fig. 77

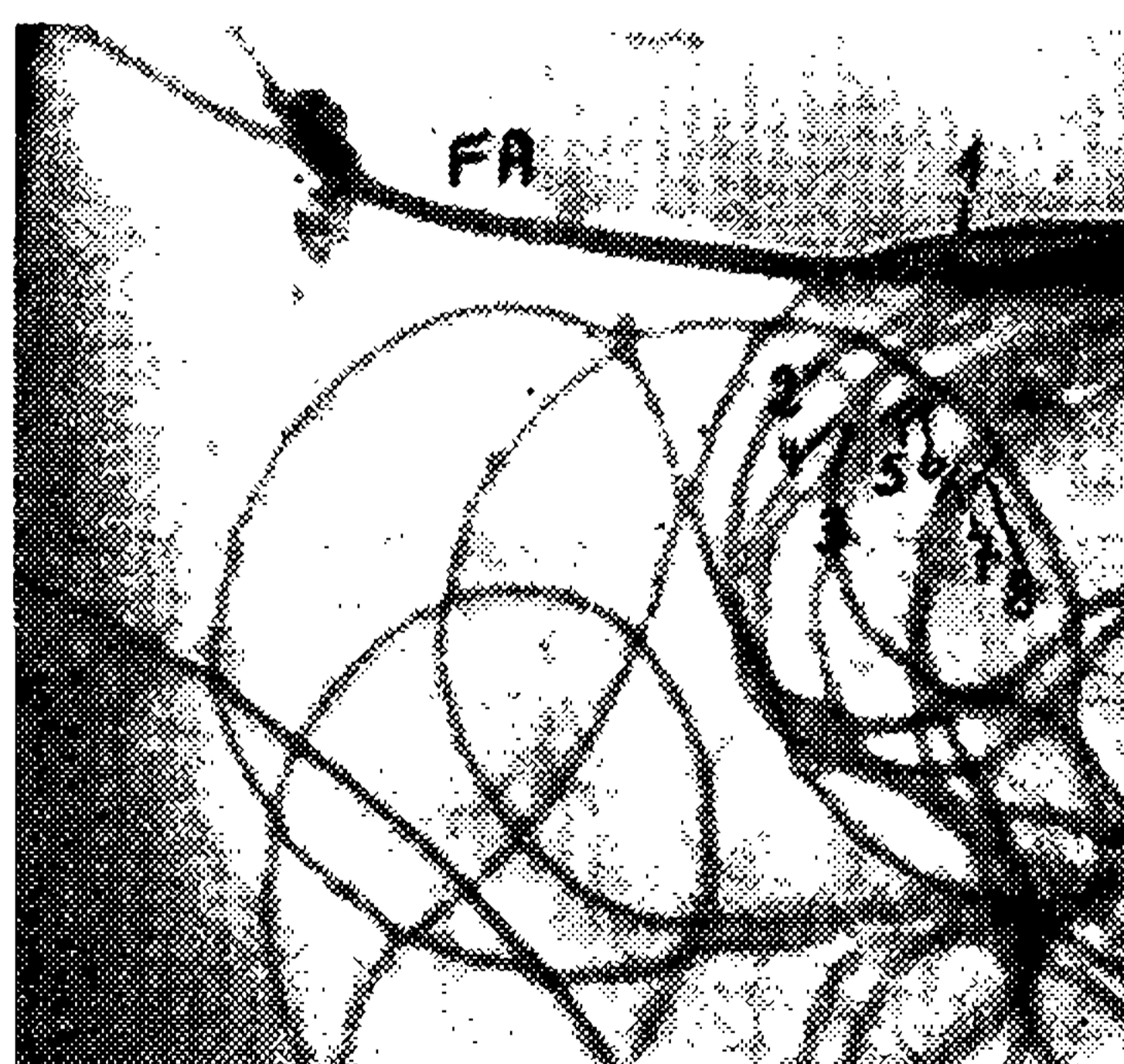


Fig. 78

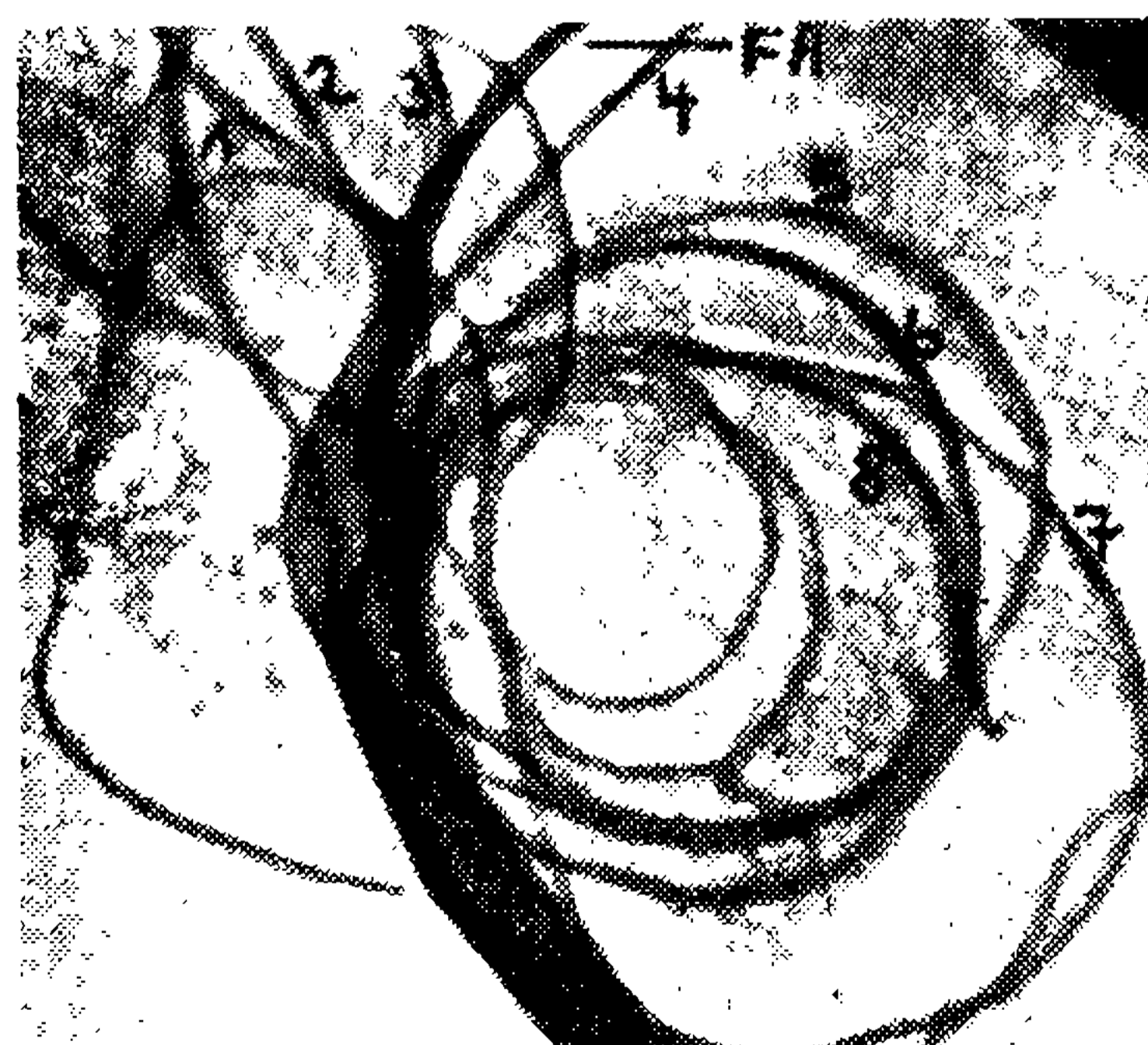


Fig. 79

## ESTAMPA 15

- Fig. 80: Corte transversal de flagelos de espermios maduros, tirados da vesícula seminalis. Aumento 15 000 vêzes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 81: Corte transversal de flagelos de espermios maduros, tirados da vesícula seminalis. Aumento 15 000 vêzes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.
- Fig. 82: Corte transversal de flagelos de espermios maduros, tirados da vesícula seminalis. Aumento 30 000 vêzes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.

Fig. 80 — Querschnitt durch die Geißel reifer Spermien, der Samenblase entnommen. Vergrößerung 15 000 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 81 — Querschnitt durch die Geißel reifer Spermien, der Samenblase entnommen. Vergrößerung 15 000 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

Fig. 82 — Querschnitt durch die Geißel reifer Spermien, der Samenblase entnommen. Vergrößerung 30 000 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

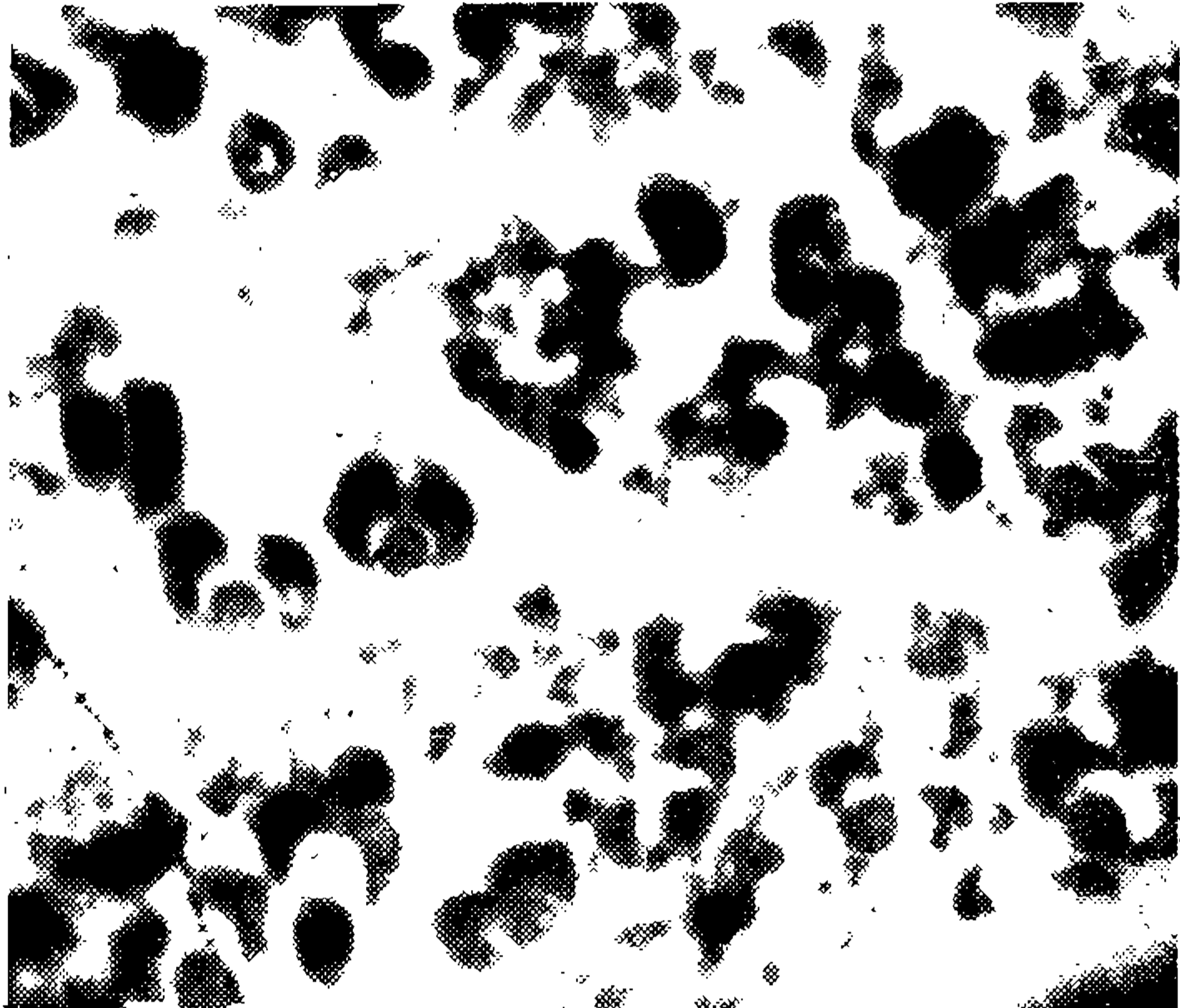


Fig. 80



Fig. 81

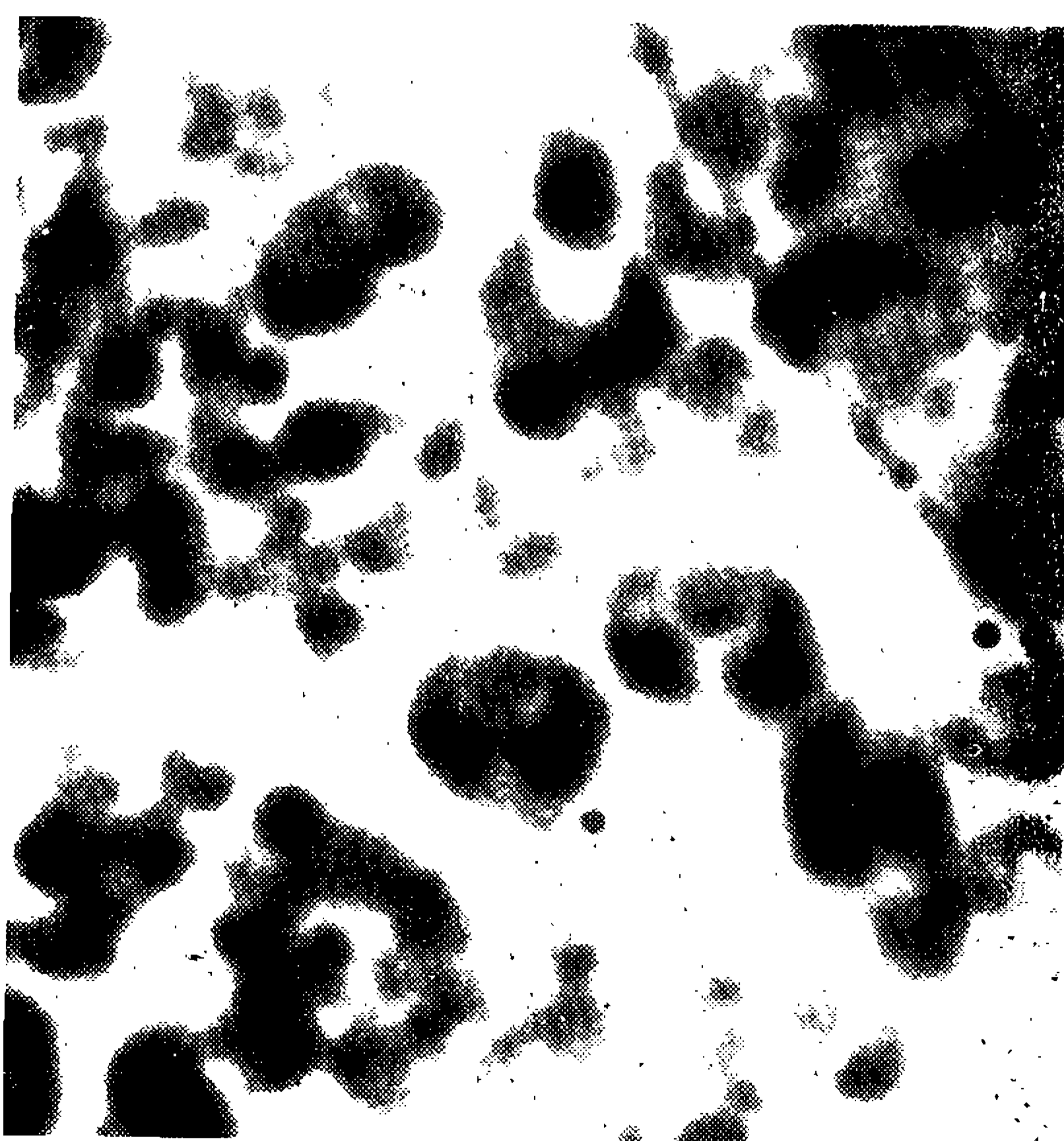


Fig. 82



## ESTAMPA 16

**Fig. 83:** Corte transversal de flagelos de espermios maduros, tirados da vesícula seminalis. Aumento 40 000 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.

**Fig. 84:** Corte diagonal de flagelos de espermios maduros, tirados da vesícula seminalis. Aumento 12 500 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.

**Fig. 85:** Reconstrução de um corte transversal do flagelo do espermio maduro.

**Fig. 83 —** Querschnitt durch die Geißel reifer Spermien, der Samenblase entnommen. Vergrößerung 40 000 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

**Fig. 84 —** Querschnitt durch die Geißel reifer Spermien, der Samenblase entnommen. Vergrößerung 12 500 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

**Fig. 85 —** Rekonstruktion eines Querschnittes durch die Geißel eines reifen Spermiums.

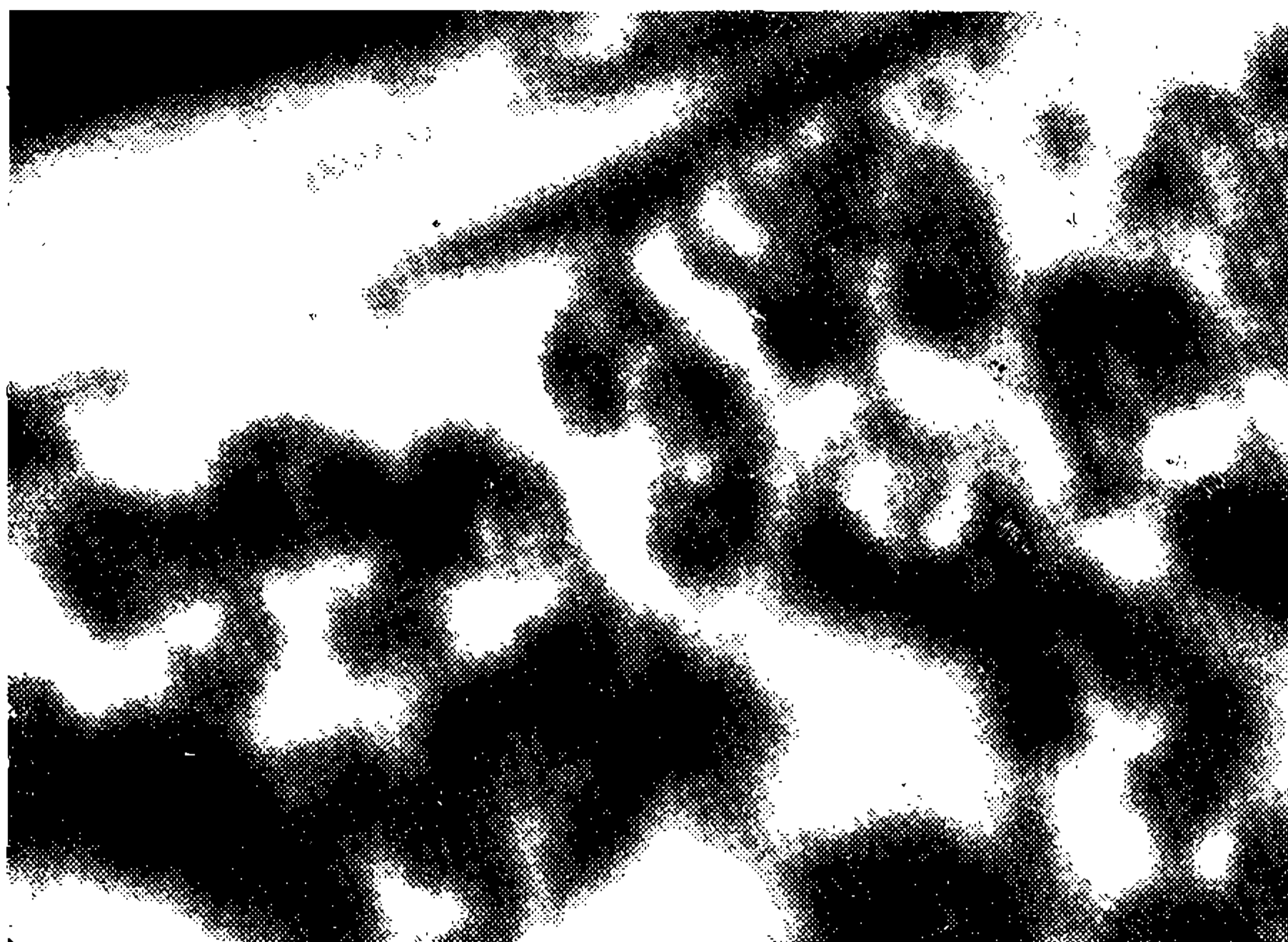


Fig. 83



Fig. 84

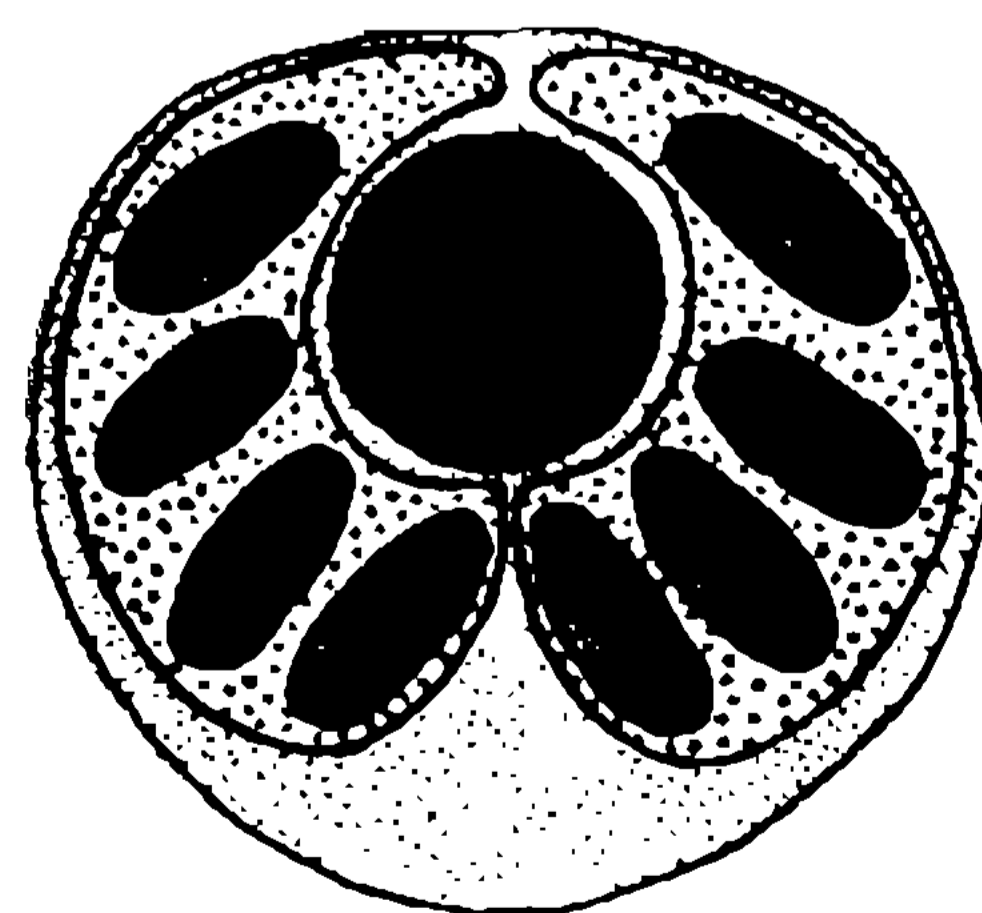


Fig. 85

## ESTAMPA 17

Fig. 86: Reconstrução de uma parte do flagelo do espermio maduro, em três dimensões.

Fig. 87: Parte dilacerada do flagelo do espermio de um ouriço do mar, composto de dois fios axiais (FA; FA) e de três grupos de fios mitocondriais contendo cada um três fios (1-3; 4-6; 7-9). Aumento 3 300 vezes. Fotografado no microscópio eletrônico por H. Muth.

Fig. 86 — Dreidimensionale Rekonstruktion eines Teils der Geissel eines reifen Spermiums.

Fig. 87 — Dilazerierter Teil der Geissel des Spermiums eines Seeigels, zusammengesetzt aus zwei Axialfilamenten (FA;FA) and drei Gruppen von je drei mitochondrialen Filamenten (1-3; 4-6; 7-9). Vergroesserung 3 300 fach. Fotografie im Elektronen-Mikroskop durch H. Muth.

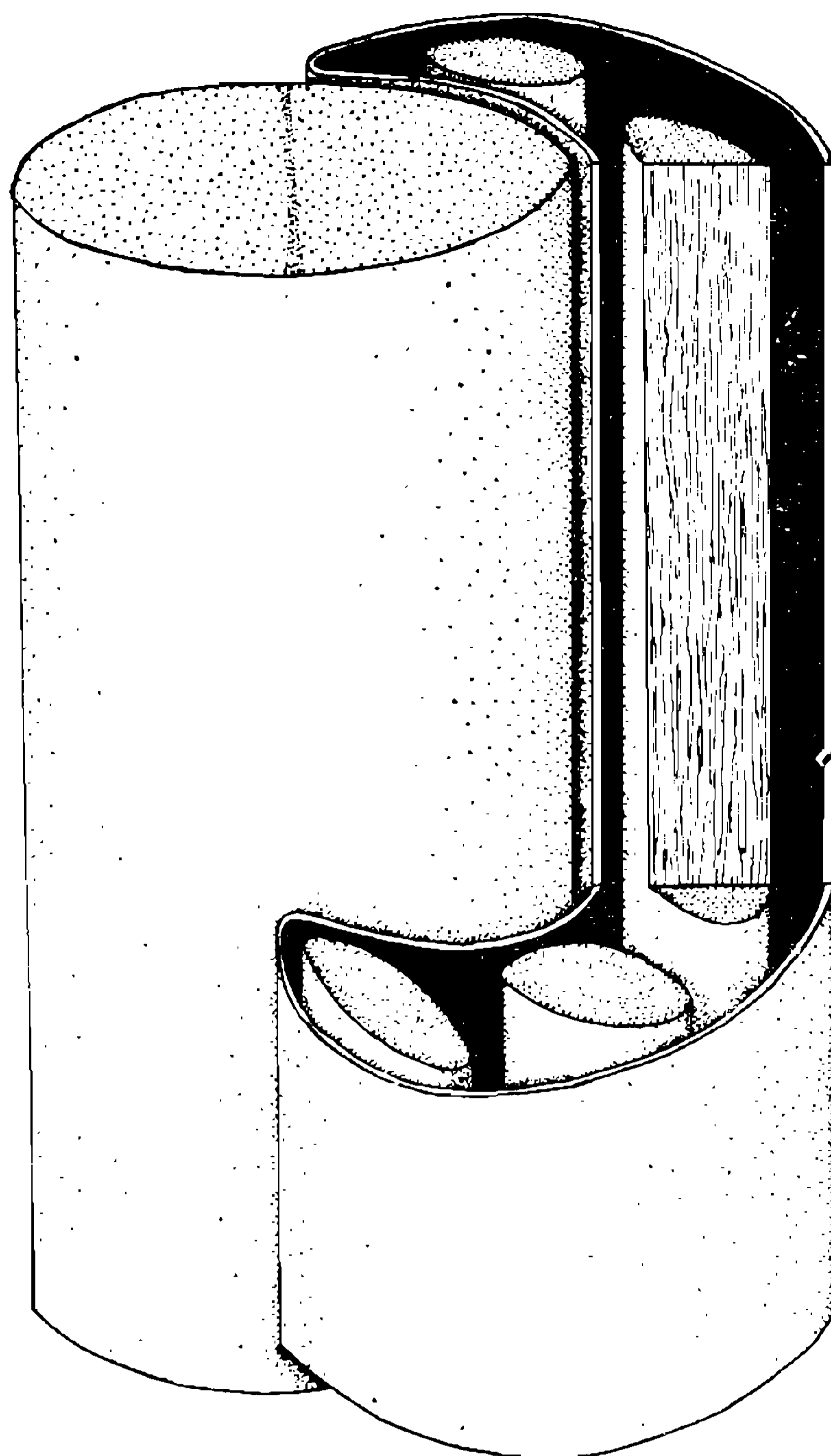


Fig. 86



Fig. 87