



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Emi Rosane Silistino de Souza

Biologia Reprodutiva de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* (Heteroptera: Coreidae), com ênfase aos aspectos ultraestruturais

São José do Rio Preto
2016

Emi Rosane Silistino de Souza

Biologia Reprodutiva de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* (Heteroptera: Coreidae), com ênfase aos aspectos ultraestruturais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama

São José do Rio Preto
2016

Emi Rosane Silistino de Souza

Biologia Reprodutiva de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus*
e *Sphictyrtus fasciatus* (Heteroptera: Coreidae), com ênfase aos aspectos
ultraestruturais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mary Massumi Itoyama
UNESP – São José do Rio Preto, SP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto, SP

Prof^a. Dr^a. Maria Etelvina Pinto Fochi
UNESP – São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
7 de Março de 2016

Agradecimento

Agradeço ao meu pai Joaquim Célio de Souza por sempre me incentivar, me apoiar e auxiliar de todas as formas. Por ser um exemplo de serenidade, determinação e educação sempre.

À minha mãe Rosana Silistino de Souza por me incentivar, compartilhar parte do seu conhecimento e me ajudar tanto de diversas maneiras desde a graduação.

Ao meu irmão e companheiro Davi Silistino de Souza por me ajudar no inglês independente da hora do dia ou da noite e por ser um exemplo de paciência, dedicação e organização.

À minha querida prima Mariana de Souza Gonçalves pela motivação, reconhecimento, carinho e palavras de conforto em momentos mais turbulentos.

Em especial à minha filha Mila Rosani Silistino Kaltenbaher, que mesmo sem saber, tem sido o principal motivo pra eu nunca desistir perante às dificuldades e por me fazer dar sempre o meu melhor. Por me acordar com beijos todos os dias e assim fazer cada dia o dia mais lindo!

Às minhas mais antigas, porém sempre presentes, amigas Gabriela Marino Silva, Iris Lopes Hepal, Maira Luizário Coelho e Fernanda Villa Angelino pela amizade e companheirismo durante todos esses anos em todos os momentos, independente da fase de cada uma ou da situação.

Às minhas queridas amigas Karoline da Silva Pires e Tatiane Reis Rodrigues pelas risadas e o carinho, por não me deixarem desanimar, por se preocuparem comigo e serem exemplo de determinação, esforço e bondade.

Ao meu melhor amigo e companheiro Fernando Cesar Silva Junior, com quem tive a honra de conviver durante não só a graduação, mas também a pós-graduação e durante todos esses anos, pude contar com uma amizade sincera nos momentos bons e ruins. Agradeço por tornar tudo tranquilo e favorável só com a sua presença, também pelas risadas, motivação e compreensão!

Aos amigos do laboratório Cecília Ártico Banho, Tatiani Seni de Souza Firmino e Luís Lenin Vicente Pereira pela amizade, risadas, todo o auxílio e por compartilharem seus conhecimentos durante essa jornada.

À minha orientadora profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, por ter me dado a oportunidade de aprender muito com ela e sobretudo pela compreensão e paciência comigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética coordenado pela Profa. Dra. Claudia Márcia Aparecida Carareto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e importante contribuição ao trabalho.

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

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A Subordem Heteroptera contém cerca de 75 famílias, incluindo Coreidae, na qual pertencem as espécies *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, analisadas no presente trabalho. Os indivíduos dessa família são conhecidos por serem exclusivamente fitófagos e alimentam-se de plantas de valor comercial. Apesar da grande diversidade desta subordem, há poucos estudos relacionados com a ultraestrutura da espermátide dessas espécies. Assim, nesse trabalho, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foi analisado o desenvolvimento da espermiogênese na cabeça e no flagelo, com ênfase na formação do acrossomo, do adjunto do centríolo e dos derivados mitocondriais. O acrossomo tem origem a partir do complexo de Golgi, por meio da formação de uma vesícula pró-acrossomal e concomitante a esse processo é formado o adjunto do centríolo. O acrossomo determina o polo anterior do espermatozoide e o adjunto do centríolo determina o polo posterior. Observou-se também que no início do processo espermiogênico, as mitocôndrias encontram-se espalhadas no citoplasma, então gradualmente se fundem e dão origem ao complexo mitocondrial, o qual se divide, posteriormente, em duas subestruturas, denominadas derivados mitocondriais. Essas se posicionam bilateralmente ao axonema, o qual possui o padrão típico de disposição dos microtúbulos de 9 + 9 + 2. O processo de formação do acrossomo e dos derivados e a conformação dos microtúbulos do axonema são típicos de insetos. Além do padrão de microtúbulos do axonema, foram encontradas características sinapomórficas de Heteroptera, como a presença de duas estruturas paracristalinas em cada derivado mitocondrial e a presença de pontes que ligam os derivados mitocondriais ao microtúbulos axonemais, os quais são ferramentas importantes para auxiliar análises filogenéticas e taxonômicas.

Palavras-chave: Ultraestrutura. Axonema. Espermátide. Espermatogênese

ABSTRACT

The suborder Heteroptera contains about 75 families, including Coreidae, to which the species Corecoris fuscus, Leptoglossus gonagra, L. zonatus and Sphictyrtus fasciatus belong. Individuals of this family are known for being exclusively phytophagous and feeding on commercially valuable plants. Despite this suborder great diversity, there are only few studies on the ultrastructure of these species spermatid. Thus, in this study, through transmission electron microscopy, we analyzed the development of spermiogenesis in the head and the flagellum of C. fuscus, L. gonagra, L. zonatus and S. fasciatus, with emphasis on the formation of the acrosome, of the centriole adjunct and on development of mitochondrial derivatives. The acrosome originates from the Golgi complex through the formation of a pro-acrosomal vesicle and concomitant to this process, is formed the centriole adjunct. The acrosome determines the anterior pole of the sperm and the centriole adjunct determines the posterior pole. It was also observed that at the beginning of the spermiogenic process, the mitochondria are scattered within the cytoplasm, then gradually fusing and originating the mitochondrial complex, which is subsequently divided into two substructures, called mitochondrial derivatives. They are positioned bilaterally to the axoneme, having the typical pattern arrangement of the microtubule, which is 9 + 9 + 2. The process of acrosomes and derivatives formation and the conformation of axoneme's microtubules are typical of insects. Besides the pattern of axoneme's microtubules, synapomorphic features of Heteroptera were found, as the presence of two paracrystalline structures in each mitochondrial derivative and the presence of bridges connecting derivatives mitochondrial to the axonemal microtubules, which are important tools to assist in phylogenetic and taxonomic analyzes.

Keywords: Ultrastructure. Axoneme. Spermatid. Spermatogenesis

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	10
1. Aspectos Gerais da Biologia de Heteroptera.....	11
2. Espermatogênese de insetos.....	12
3. Espermiogênese e Ultraestrutura dos Espermatozoides.....	12
3.1. Axonema.....	13
3.2. Complexo mitocondrial e derivados mitocondriais.....	13
3.3. Acrossomo.....	14
II. OBJETIVOS.....	16
1. Objetivo geral.....	17
2. Objetivos específicos.....	17
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1. Coleta dos espécimes.....	19
2. Processamento e inclusão para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..	19
IV. CAPÍTULO I.....	20
Análise ultraestrutural da espermiogênese de quatro espécies de Coreidae, com ênfase nas ultraestruturas flagelares	
V. CAPÍTULO II.....	34
Desenvolvimento da espermiogênese de quatro espécies de Coreidae, com ênfase na formação do acrossomo (Heteroptera: Coreidae)	
VI. DISCUSSÃO GERAL.....	48
VII. CONCLUSÕES.....	53
VIII. REFERÊNCIAS.....	56

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais da Biologia de Heteroptera

De acordo com Borror e DeLong's (2005), os insetos fazem parte de um grupo dominante que ocorre em praticamente todos os lugares e acredita-se que o número total de seus diferentes tipos aproxime-se de 30 milhões. Eles formam um grupo extremamente rico e abundante, representando cerca de 80% dos organismos já descritos no mundo, estimados em quase um milhão de espécies (NAME, 2008). Assumem um importante papel, pois são extremamente atuantes em processos indispensáveis para a manutenção da vida no planeta, por possuírem a maior biomassa, a maior variabilidade genética e o maior número de interações com outros seres (NAME, 2008). Os insetos são elementos essenciais na maioria das cadeias tróficas e energéticas (FERNÁNDEZ; RUF, 2006) e têm relação direta com os seres humanos devido a sua importância nutritiva, podendo auxiliar na superação da fome e da desnutrição em muitas partes do mundo (COSTA-NETO, 2003). Cerca de 1.509 espécies de insetos comestíveis já foram registradas em quase 3.000 grupos étnicos distribuídos em mais de 120 países (COSTA-NETO, 2003).

A subordem Heteroptera, conhecida como percevejos, é um dos maiores e mais diversos grupos de insetos com metamorfose incompleta (ovo, ninfa e adulto) e está amplamente distribuída no mundo, com exceção dos polos e locais de alta altitude. Possuem hábitos alimentares diversos, podendo ser hematófagos, fitófagos ou predadores de outros insetos (SCHUH; SLATER, 1995; VIANNA et al, 2003). Essa subordem possui cerca de 75 famílias, incluindo a família Coreidae (LANZONE; DE SOUZA, 2006), a qual possui cerca de 250 gêneros e pelo menos 1.800 espécies. Os indivíduos desse grupo são todos fitófagos e alguns possuem importância econômica (SCHUH; SLATER, 1995).

O gênero *Leptoglossus*, encontrado do sul do Canadá até a América Latina, (ALLEN, 1969; BRAILOVSKY; BARRERA, 1998, 2004), é citado em alguns trabalhos (JADHAV et al, 1980, SCHAEFER; MITCHELL, 1983) como sendo praga de plantas cultivadas, das famílias Gramineae, Leguminosae, Rubiaceae, Rutaceae e Punicaceae. Morril (1913) cita *L. zonatus* (Dallas), como sendo uma espécie de ampla distribuição nas Américas (ALLEN, 1969 apud PANIZZI, 2004), que se alimenta de pomelos, laranjas e pêssegos no Arizona (EUA). A espécie também é importante praga de produtos agrícolas na Venezuela, segundo Osuna (1979). Em seu trabalho sobre a espécie, Panizzi (1989) cita a presença do inseto em várias culturas, entre elas, o milho e o sorgo. Além de ocorrer

nessas plantas hospedeiras, *L. zonatus* foi registrado, também, em espécies de plantas frutíferas, forrageiras e ornamentais, pertencentes a 14 famílias (SOUZA; FILHO, 1999). Já o percevejo *L. gonagra*, também conhecido como percevejo do Melão-de-São-Caetano, pode também atacar a abóbora, algodão, araquá, bucha, chuchu, pepino, melancia, girassol, goiaba, mamona, manga, maracujá, romã e citros (SILVA et al, 1968; BRAILOVSKY; SÁNCHEZ, 1982; GALLO et al, 1988; BOARETTO et al, 1994; RUGGIERO et al, 1996; BOIÇA Jr., 1998).

Levantamentos bibliográficos realizados para as espécies *Corecoris fuscus* e *Sphictyrtus fasciatus* não localizaram trabalhos, ressaltando a importância de estudos relacionados a essas espécies.

2. Espermatogênese em insetos

A maioria dos insetos, incluindo os coreídeos, possui um par de testículos, o qual cada um é formado por um ou vários folículos (lobos) contendo vários cistos, dentro dos quais ocorre a espermatogênese (PHILLIPS, 1970; SOUZA et al, 2007). O cisto é essencialmente um conjunto de células germinativas circundado por uma célula somática de natureza epitelial e o número dessas células germinativas encontradas em seu interior é quase sempre constante e específico para cada espécie (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; QUAGIO-GRASSIOTO; LELLO, 1996).

Durante o processo espermatogênico ocorre a redução do número de cromossomos à metade por meio de divisões meióticas, formando assim os espermatozoides (LINO-NETO, 1993; JAMIESON et al, 1999). A espermatogênese pode ser dividida nas fases meióticas (meioses I e II), onde as espermatogônias originam um conjunto de espermátides interconectadas e por fim na fase da espermiogênese, onde as espermátides jovens, que inicialmente apresentam núcleo centralizado, esférico e com cromatina dispersa homogeneamente (LANDIM, 2004), passam por várias transformações morfológicas sincronicamente, originando assim os espermatozoides (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; QUAGIO-GRASSIOTO; LELLO, 1996; JAMIESON et al, 1999)., os quais são finos, alongados e compostos pela região da cabeça e cauda (QUICKE, 1997).

3. Espermiogênese e Ultraestrutura dos Espermatozoides

Durante a fase da espermiogênese, as espermátides formadas ao final do processo meiótico, sofrem profundas transformações morfofuncionais, como a perda

citoplasmática, formação do acrossomo e derivados mitocondriais, que as tornarão espermatozoides estrutural e funcionalmente aptos para fecundar o ovócito (NAME, 2008).

Nos vertebrados e invertebrados, os trabalhos abordando aspectos ultraestruturais das organelas, em desenvolvimento, durante a espermiogênese e, especificamente, a estrutura do espermatozoide perfazem uma literatura vasta e sempre crescente, como os de Baccetti, (1979) com *Diplolaboncu tumorificus* e *Anguilla anguilla*, de Werner e Bawa (1988) com *Diplotemnus sp.*, de Lanzavecchia et al (1991) com *Asphondylia ruebsaameni*, de Aires et al (2000) com *Brycon orbignyianus*, de Al-Dokhi (2009) com *Ptyodactylus hasselquisti*, de Foata et al (2012) com *Cavisoma Magnum* e de Santos et al (2013) com *Trichospilus diatraeae* e *Palmisticus elaeisis* e são particularmente importantes para análises taxonômicas e filogenéticas (NAME, 2008). Em insetos, o estudo de aspectos ultraestruturais da espermiogênese e do espermatozoide iniciaram-se na década de 70, desde a otimização dos métodos de microscopia eletrônica para material biológico (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; MESSIAS JR., 1990), mas em Heteroptera os trabalhos ainda são escassos. O axonema, derivados mitocondriais e o acrossomo são algumas das ultraestruturas descritas na literatura observadas durante a espermiogênese, como por exemplo, em Heteroptera (Phillips, 1970), Diptera (Name, 2012), Ephemeroptera (Mencarelli et al, 2014), Orthoptera, Thysanoptera e Zoraptera (Dallai, 2014).

3.1. Axonema

O axonema é uma estrutura flagelar e o estudo de sua organização estrutural, recebeu valiosas contribuições provenientes das inúmeras observações realizadas no flagelo do espermatozoide de *Drosophila* (PEROTTI, 1969; KIEFER, 1970; DALLAI; AFZELIUS, 1991). Na maioria dos insetos o padrão organizacional do axonema segue o esquema 9+9+2, que é o arranjo usual de uma dupla de microtúbulos centrais circundados por nove duplas periféricas e nove microtúbulos acessórios adicionais mais externos a esses (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972; FERNANDES, 1999).

3.2. Complexo mitocondrial e derivados mitocondriais

Outra organela bastante analisada durante a espermiogênese é a mitocôndria, cuja morfologia difere ao longo desse processo. Em insetos, a regularidade nas formas da mitocôndria é particularmente notável (PHILLIPS, 1970). No decorrer da

espermiogênese as mitocôndrias sofrem metamorfose, onde a estrutura típica da mitocôndria, pequena e ovalada com uma membrana externa e cristas mitocondriais, é completamente modificada ao longo do processo. Nos estágios iniciais de diferenciação ocorre um complexo processo de fusões e rearranjos das mitocôndrias formando o complexo mitocondrial que é frequentemente denominado “Nebenkern”, especialmente em trabalhos mais antigos (PRATT, 1970; PHILLIPS, 1970; TANDLER; HOPPEL, 1972; BACCETTI, 1972; BACCETTI; AFZELIUS, 1976). Com o prosseguimento da espermiogênese, ocorre a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais (DM), que no processo de alongamento do espermatozoide posicionam-se bilateralmente em relação ao axonema (TOKUYASU, 1974).

Durante o processo de diferenciação os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura de natureza proteica, organizada num padrão paracristalino, e muitas espécies de insetos acumulam essas estruturas nas mitocôndrias durante a espermiogênese (PHILLIPS, 1970). Essa estrutura paracristalina também é conhecida como cristalóide e é formado por uma proteína rica em prolina, que foi designada de cristalomitina (BACCETTI et al, 1977). Em Heteroptera foi evidenciada a presença de dois ou três corpos cristalinos no interior dos derivados mitocondriais (ARAUJO, 2011).

Perotti (1973) relacionava os derivados mitocondriais como uma herança citoplasmática paterna e supôs que o material armazenado nos derivados mitocondriais podia estar envolvido na ativação e nutrição do ovócito após a fertilização. Porém, atualmente as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, estão relacionadas no controle e regulação da forma do movimento flagelar e com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a sua mobilidade (PHILLIPS, 1974; YASUZUMI, 1974; TOKUYASU, 1975). Acrescentando a essas funções, Noguchi et al (2012) propuseram que a arquitetura dupla da membrana da mitocôndria, combinados com os microtúbulos citoplasmáticos, podem servir como suporte estrutural para o alongamento da cauda do espermatozoide.

3.3. Acrossomo

O acrossomo é uma organela fundamental para fecundação (PHILLIPS, 1970), pois está relacionado com a capacitação do espermatozoide onde suas enzimas podem funcionar para remover o mecanismo de proteção na superfície do espermatozoide e/ou na digestão de barreiras para a migração do espermatozoide dentro do trato reprodutor

da fêmea (FAWCETT; ITO, 1965), sendo sua origem a partir do complexo de Golgi (YASUZUMI, 1974; BÁO et al, 1989). Schrader e Leuchtenberger (1951) observaram uma variação na forma e posição do acrossomo em diferentes espécies animais e sugeriram que alterações no ambiente fisiológico podem afetar a formação dessa estrutura, causando algum grau de esterilidade.

Levando-se em consideração ao anteriormente mencionado, o nosso objetivo foi o de fornecer informações com relação à espermiogênese das espécies *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, por meio de análises e comparações das ultraestruturas durante esse importante processo, com ênfase nos derivados mitocondriais, axonema e acrossomo.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Devido à grande importância da espermiogênese para a reprodução e ao conhecimento ainda escasso da mesma, o objetivo geral do presente trabalho foi o de produzir dados que possam contribuir para um melhor conhecimento da biologia e sistemática da família Coreidae.

2. Objetivos específicos

- a) Analisar ultraestruturalmente a espermiogênese da porção da cabeça e do flagelo de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus*;
- b) Descrever a formação do acrossomo, o desenvolvimento do adjunto do centríolo, do complexo mitocondrial e, conseqüentemente, dos derivados mitocondriais, dessas espécies, e posterior comparação dessas ultraestruturas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta dos espécimes

Indivíduos das espécies *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, pertencentes à família Coreidae, foram coletados em São José do Rio Preto – SP (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W) no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, sendo os machos separados para o processamento e as fêmeas devolvidas ao ambiente.

2. Processamento e inclusão para Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os testículos de cinco indivíduos adultos de cada espécie foram extraídos e fixados em solução de Karnovsky, por 24 horas. Em seguida, submetidos a duas lavagens em tampão Millonig, e, então, realizado a pós-fixação com Tetróxido de Ósmio à 1%: Millonig (1:3), por 2 horas em geladeira. Posteriormente, o material foi lavado rapidamente em água bidestilada e desidratado em uma bateria de soluções com concentrações crescentes de acetona atingindo 100% de concentração. Após este processo, foi dado início à pré-infiltração em araldite:acetona (1:1) *overnight* em temperatura ambiente, em seguida a infiltração em araldite por 2 horas a 37°C e, logo após, a inclusão em araldite por 48 horas a 60°C. Foram obtidos cortes semifinos e ultra-finos, em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT. Os cortes ultra-finos foram coletados em *grids* e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e, depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1 N, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss 906, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP e do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Análise ultraestrutural da espermiogênese de quatro espécies de Coreidae, com ênfase nas ultraestruturas flagelares

Emi Rosane Silistino-Souza, Fernando Cesar Silva Junior, Luis Lênin Vicente Pereira, Mary Massumi Itoyama

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos.

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Bairro: Jardim Nazareth,
15054-000 - São José do Rio Preto, SP
Emi Rosane Silistino de Souza
emi.rosane@hotmail.com

Resumo

A Subordem Heteroptera contém cerca de 75 famílias, incluindo Coreidae, na qual pertencem as espécies *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*. Os indivíduos dessa família são conhecidos por serem exclusivamente fitófagos e alimentam-se de plantas de valor comercial. Apesar da grande diversidade desta subordem, há poucos estudos relacionados com a ultraestrutura das espermátides dessas espécies. Assim, nesse trabalho, foi analisado o desenvolvimento da espermiogênese no flagelo de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus*, com ênfase nas ultraestruturas flagelares. Observou-se que durante a prófase, as mitocôndrias encontram-se espalhadas no citoplasma, então gradualmente se fundem e dão origem ao complexo mitocondrial, o qual se divide posteriormente em duas subestruturas, denominadas derivados mitocondriais. Essas se posicionam bilateralmente ao axonema, o qual possui o padrão típico de disposição dos microtúbulos de 9 + 9 + 2. O processo de formação dos derivados e a conformação dos microtúbulos do axonema são típicos de insetos. Além do padrão de microtúbulos do axonema, foram encontradas características sinapomórficas de Heteroptera, como a presença de duas estruturas paracristalinas em cada derivado mitocondrial e a presença de pontes que ligam os derivados mitocondriais ao microtúbulos axonemais, os quais são ferramentas importantes para auxiliar em análises filogenéticas e taxonômicas.

Palavras-chave: ultraestrutura, axonema, espermátide, espermatogênese

Abstract

The suborder Heteroptera contains about 75 families, including Coreidae, to which the species *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* and *Sphictyrtus fasciatus* belong. Individuals of this family are known for being exclusively phytophagous and feeding on commercially valuable plants. Despite this suborder great diversity, there are only few studies on the ultrastructure of these species. Thus, in this study, we analyzed the development of spermatogenesis in the flagellum of *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* and *S. fasciatus*, with emphasis on development of mitochondrial derivatives. It was observed that during prophase, the mitochondria are scattered within the cytoplasm, then gradually fusing and originating the mitochondrial complex, which is subsequently divided into two substructures, called mitochondrial derivatives. They are positioned bilaterally to the axoneme, having the typical pattern arrangement of the microtubule, which is 9 + 9 + 2. The process of derivatives' formation and the conformation of axoneme's microtubules are typical of insects. Besides the pattern of axoneme's microtubules, synapomorphic features of Heteroptera were found, as the presence of two paracrystalline structures in each mitochondrial derivative and the presence of bridges connecting derivatives mitochondrial to the axonemal microtubules, which are important tools to assist in phylogenetic and taxonomic analyzes.

Keywords: ultrastructure, axoneme, spermatid, spermatogenesis

Introdução

A subordem Heteroptera é um dos maiores e mais diversos grupos de insetos (SCHUH; SLATER, 1995) e inclui a família cosmopolita Coreidae, os quais podem ser encontrados em todas as regiões zoogeográficas do mundo (LIMA, 1940). Os indivíduos pertencentes a essa família são todos fitófagos e alguns possuem importância econômica (SCHUH; SLATER, 1995), como os percevejos *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, por serem pragas agrícolas.

Dentre o gênero *Corecoris*, a espécie *C. fuscus* (Thunberg, 1783) é a mais encontrada em quase todo o Brasil e vive em Solanaceas silvestres, como o tomateiro (LIMA, 1940). O gênero *Leptoglossus*, encontrado do sul do Canadá até a América Latina, (ALLEN, 1969; BRAILOVSKY; BARRERA, 1998, 2004), é citado em alguns trabalhos como sendo praga de plantas cultivadas das famílias Gramineae, Leguminosae, Rubiaceae, Rutaceae e Punicaceae (JADHAV et al, 1980; SCHAEFER; MITCHELL, 1983). Há

registros no Brasil da presença de *L. zonatus* (Dallas, 1852) como uma das espécies de coreídeos que ocorrem com maior frequência em plantas de maracujazeiro, principalmente em *Passiflora edulis f. flavicarpa* (CAETANO, 2000). O inseto *L. gonagra*, também conhecido como percevejo do Melão-de-São-Caetano, é a única espécie do gênero que ocorre fora do hemisfério ocidental (ALLEN, 1969; BRAILOVSKY; BARRERA, 1998, 2004). Já a espécie *S. fasciatus* (Burmeister, 1835), foi encontrado no Rio Grande do Norte, em algodoeiro (LIMA, 1940). Em função do hábito alimentar, os percevejos, especialmente da família Coreidae, acabam provocando danos nos frutos, o que os torna alvo de maior atenção (DE BORTOLI; BUSOLI, 1987; TEIXEIRA, 1994 apud KOLBERG, 2009).

Em insetos, o estudo de aspectos ultraestruturais da espermiogênese e do espermatozoide iniciaram-se na década de 70, desde a otimização dos métodos de microscopia eletrônica para material biológico (PHILIPS, 1970; BACCETTI, 1972; MESSIAS JR., 1990). Atualmente encontram-se diversos trabalhos relacionados com a ultraestrutura da espermiogênese de insetos, como os de Russell et al (2013), Dallai (2014), Oliveira et al (2014) e Mencarelli et al (2014), porém, apesar da importância do grupo Heteroptera, ainda há poucos estudos envolvendo-os, tendo como exemplo os de Fernandes et al (2001), Morielle-Souza et al (2010) e Araújo et al (2012).

Os primeiros estudos mais completos sobre a modificação das mitocôndrias em derivados mitocondriais são de Bowen (1920 e 1922). Desde então outros trabalhos têm sido realizados com relação à formação dos derivados mitocondriais, sua morfologia e função, como os de Phillips (1970), Baccetti et al (1977), Araújo (2012) e Noguchi et al (2012).

Considerando a importância e diversidade de Heteroptera e da escassez de estudos relacionados a esse grupo, analisamos nesse trabalho em nível ultraestrutural a porção flagelar durante o transcorrer da espermiogênese em *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus*, com ênfase no desenvolvimento dos derivados mitocondriais.

Material e métodos

Após a coleta de espécimes de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus*, os testículos de cinco indivíduos de cada espécie foram extraídos e imediatamente fixados em solução de Karnovsky por 24 horas. Então, foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig, para em seguida serem pós-fixados com Tetróxido de Ósmio a 1%: Millonig (1:3), por 2 horas em geladeira. Logo após, os testículos foram lavados em água bidestilada

e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona, atingindo 100%. O material foi pré-infiltrado em araldite:acetona (1:1), *overnight*, em temperatura ambiente e infiltrado em araldite por 2 horas a 37°C. Após essa etapa, foram incluídos em araldite por 48 horas a 60°C. Os cortes semifinos foram obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, sendo, posteriormente, corados com azul de toluidina pH 4,0 (MELLO; VIDAL, 1980) para a verificação da presença de material na região do corte. A partir dessa região, foram feitos cortes ultrafinos, coletados em *grids* e, posteriormente, contrastados primeiro com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e então, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1 N, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de transmissão (MET) Leo – Zeiss 906 do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP e do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Resultados

Os resultados das quatro espécies de coreídeos estão apresentadas em conjunto, devido à similaridade verificada no processo. A análise das células germinativas, localizadas dentro dos cistos de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus* no início do processo de formação dos derivados mitocondriais durante a espermiogênese, mostraram que as mitocôndrias apresentam a membrana externa e as cristas mitocondriais, são pequenas e encontram-se dispersas no citoplasma, como observado na Figura 1a. Essas organelas migram para um dos polos da célula e lá se aglomeram (Figura 1b), para então iniciar um processo de coalescência que dará origem a uma estrutura volumosa, membranosa e enovelada denominada complexo mitocondrial (Figura 1c). Essa estrutura contém membranas remanescentes da membrana externa da mitocôndria e das cristas mitocondriais e áreas de citoplasma no interior (Figura 1c,d). Com o decorrer da espermiogênese, o complexo mitocondrial se divide em duas subestruturas (Figura 1e), possuindo, ainda, muito citoplasma e membranas. Após essa fase ela começa a se compactar e se tornar duas estruturas um pouco mais compactas, já não possuindo mais um material citoplasmático volumoso (Figura 1f). Essas subestruturas, ainda membranosas contendo algumas áreas citoplasmáticas concentradas em seu interior, se posicionam então bilateralmente ao centríolo distal, o qual dará origem, posteriormente, ao axonema, recebendo o nome de derivado mitocondrial (Figura 2a). Os derivados se tornam cada vez mais compactos e densos, perdendo o aspecto membranoso e o axonema encontra-se em

processo de desenvolvimento (Figura 2b). Nessa etapa é observada a formação de membranas próximas aos derivados e ao axonema (Figura 2b). Os derivados mitocondriais, com o desenvolvimento, tendem a se aproximar e dobrar em torno do axonema, envolvendo-o parcialmente, enquanto este já se encontra completamente circundado pela membrana, agora denominada de cisterna axonemal (Figura 2c). Em estágios mais avançados da espermiogênese, o axonema, envolto pela cisterna axonemal, e os derivados mitocondriais, encontram-se envolvidos completamente por uma membrana mais externa (Figura 2d). Entre essa membrana e as estruturas flagelares, encontra-se uma camada de microtúbulos (Figura 2d). Os derivados mitocondriais são simétricos e no interior de cada um, é observado o início da formação de estruturas paracristalinas (Figura 2d). Enquanto os derivados mitocondriais se compactam e há uma diminuição nas áreas citoplasmáticas e na quantidade de membranas no seu interior, essas estruturas complexas iniciam um processo de alongamento junto com o axonema, dando origem ao início do flagelo (Figura 2e,f).

No fim da espermiogênese o axonema atinge sua conformação final com relação ao padrão de microtúbulos com os quais é formado, que é $9 + 9 + 2$, ou seja, um par de microtúbulos centrais e ao redor destes, nove duplas periféricas e nove microtúbulos acessórios mais externos a esses (Figura 3a). A espermatíde em seu estágio mais avançado encontra-se bem compactada e a cisterna axonemal regride dando origem às duas membranas que conectam cada derivado mitocondrial aos microtúbulos axonemais, prendendo-os (Figura 3b). Em estágios avançados, todas as espécies analisadas possuem duas estruturas paracristalinas em cada derivado mitocondrial, as quais se modificam e adquirem um aspecto eletrolúcido (Figura 3b). Os derivados mitocondriais das quatro espécies observadas possuem a face voltada para a periferia da célula de forma convexa e a face voltada para o axonema, apresenta-se com um formato côncavo, variando pouco na morfologia de espécie para espécie (Figuras 2d, 3b e 4), sendo reniforme (Figura 2d), um pouco mais afilado (Figura 3b), mais estreito (Figura 4a) ou arredondados (Figura 4b).

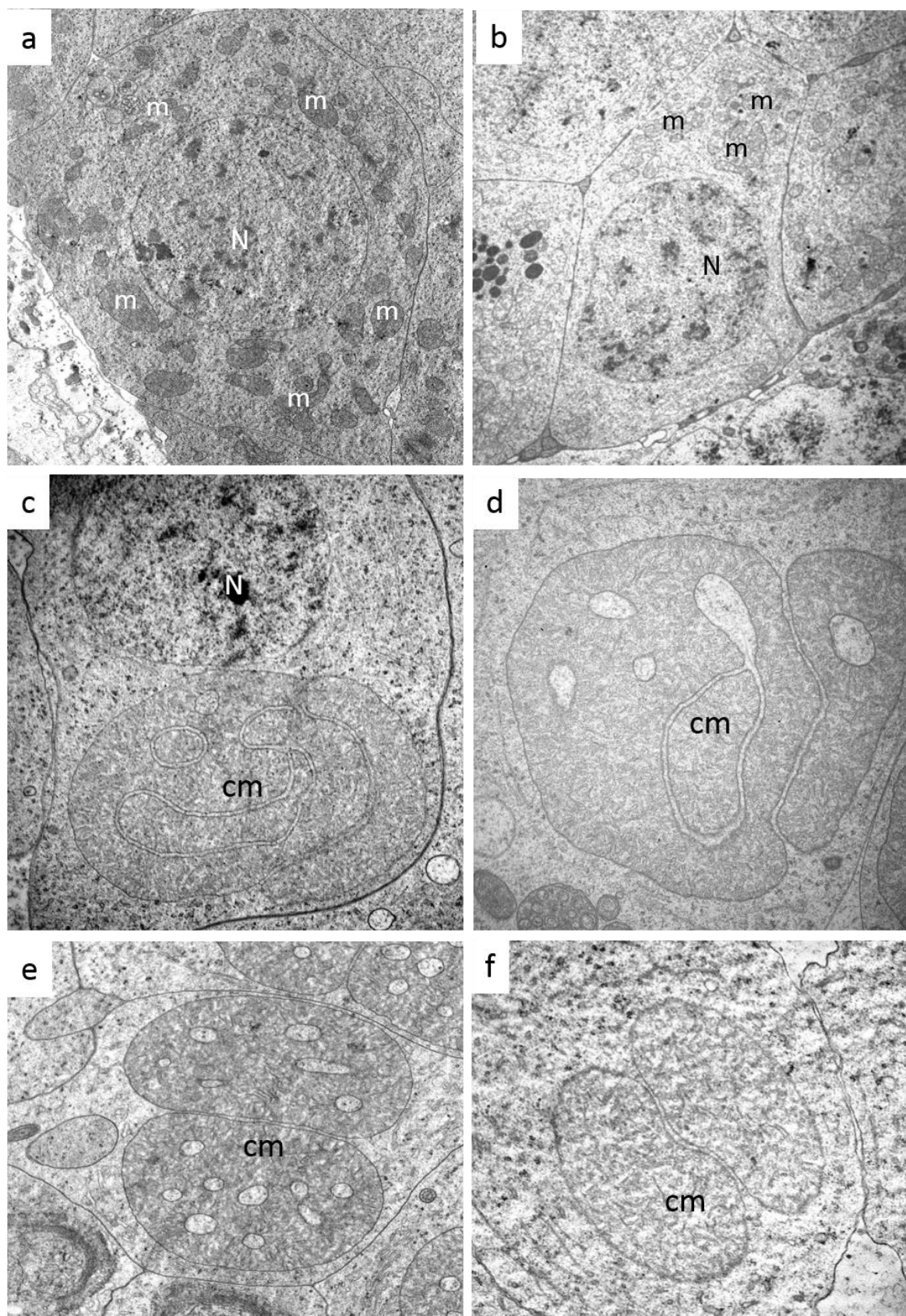


Figura 1. Formação do complexo mitocondrial em *L. gonagra* (a,e), *S. fasciatus* (b,d), *L. zonatus* (c) e *C. fuscus* (f). **a)** Mitocôndrias (m) dispersas no citoplasma. Núcleo: N; **b)** Mitocôndrias se aglomeram em um polo da célula; **c)** Início da formação do complexo mitocondrial (cm); **d)** Complexo mitocondrial em estágio intermediário de formação; **e)** Complexo mitocondrial em processo de divisão; **f)** Complexo mitocondrial dividido em duas estruturas. Aumentos: 7.750x, 8.000x, 18.000x, 20.000x, 21.560x e 10.000x, respectivamente.

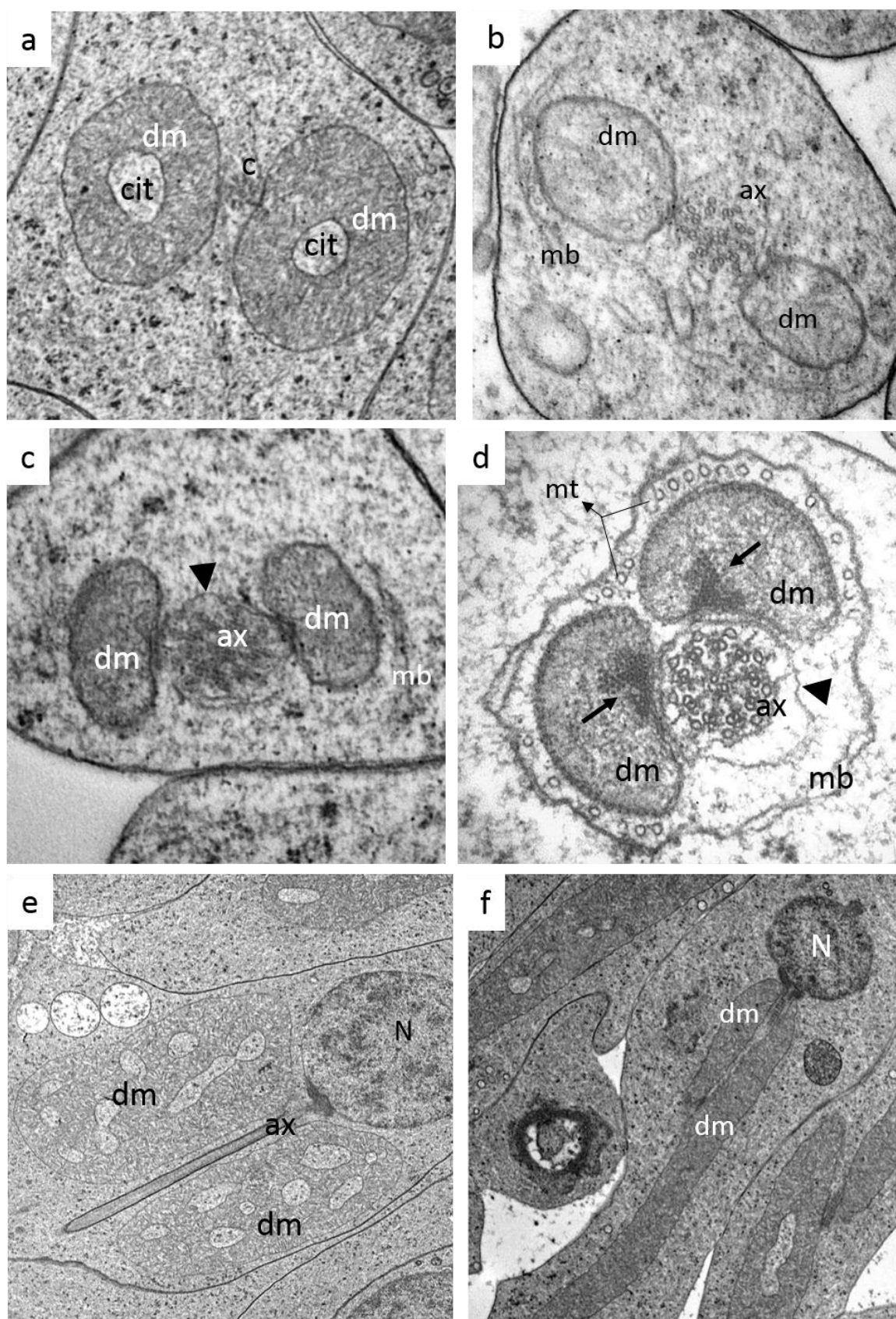


Figura 2. Desenvolvimento dos derivados mitocondriais em *L. zonatus* (a-c,f), *S. fasciatus* (d) e *L. gonagra* (e). **a)** Início da formação dos derivados mitocondriais (dm), com centríolo (c) disposto entre eles; **b-c)** Derivados mitocondriais se tornam maciços e gradualmente envolvem parcialmente o axonema (ax). Formação de uma membrana envolvendo os derivados (mb) e outra envolvendo o axonema, denominada cisterna axonemal (ponta de seta); **d)** Derivados mitocondriais em conformação final, envolvendo parcialmente o axonema e contendo em seu interior uma estrutura paracristalina (seta). A membrana mais externa envolve completamente as três estruturas e há uma camada de microtúbulos (mt) em seu interior; **e-f)** Concomitante ao

processo de desenvolvimento dos derivados mitocondriais, há o início do alongamento dessas estruturas junto com o axonema, dando origem ao flagelo. Núcleo: N. Aumentos: 16.700x, 60.000x, 35.970x, 100.000x, 12.930x e 10.000x, respectivamente.

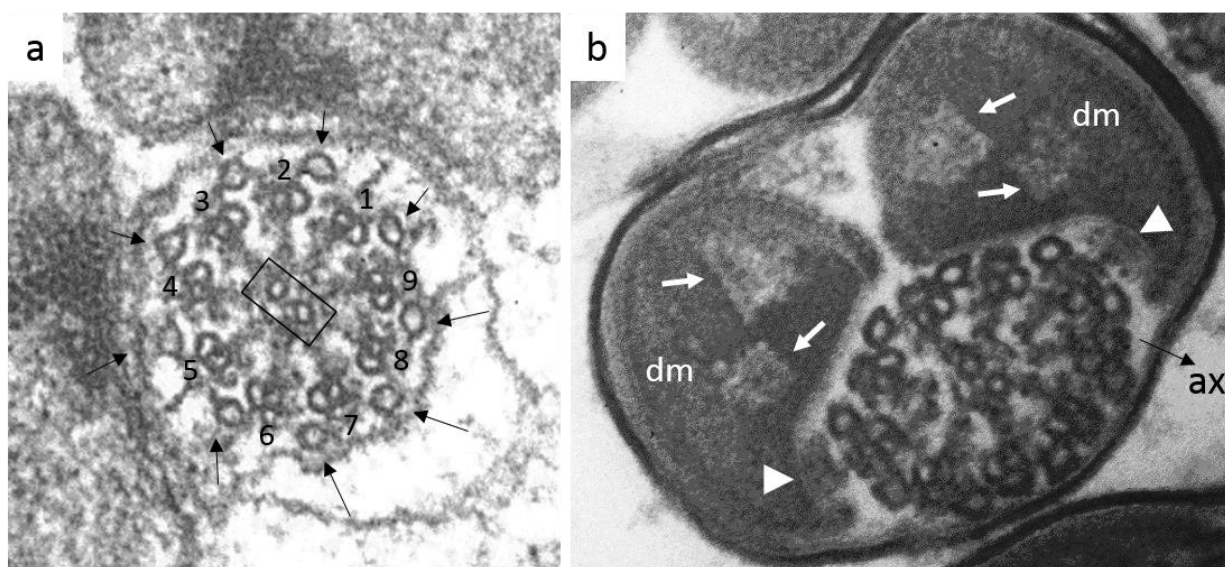


Figura 3. Cortes transversais da região do flagelo de espermátide de *S. fasciatus* e *C. fuscus*. **a)** Padrão do axonema. Par central: retângulo, duplas periféricas: número 1-9 e microtúbulos acessórios: setas pretas; **b)** Corte transversal do flagelo evidenciando as paracristalinas (setas brancas) dos derivados mitocondriais (dm) e membranas (ponta de seta) conectando os derivados mitocondriais ao axonema (ax). Aumentos: 100.000x e 140.000x, respectivamente.

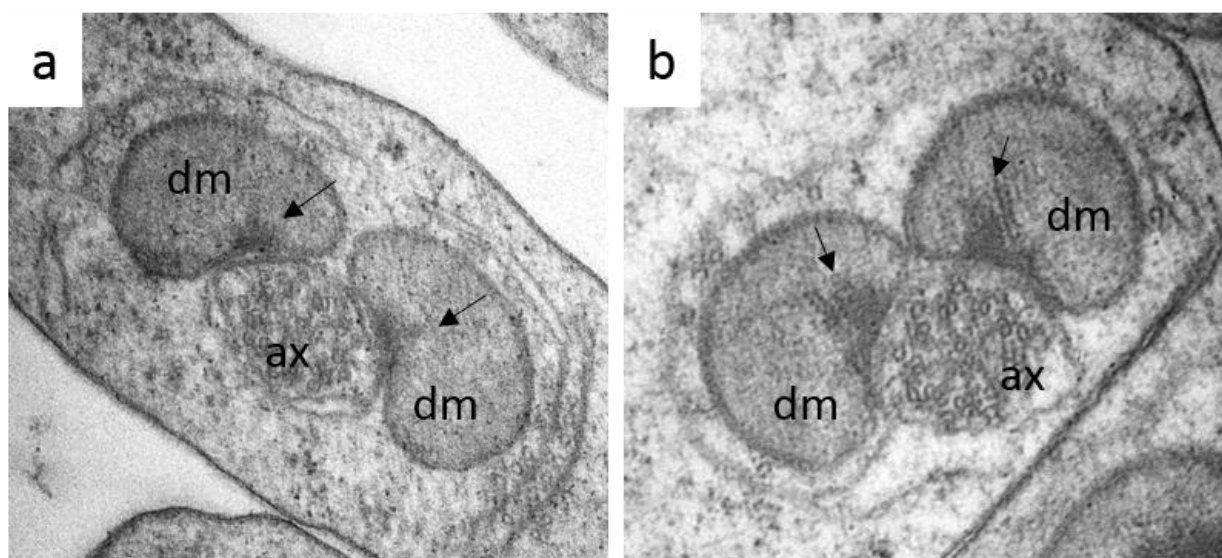


Figura 4. Cortes transversais da região flagelar de espermátide de *L. zonatus* e *L. gonagra* respectivamente, evidenciando a morfologia dos derivados mitocondriais (dm) e suas estruturas paracristalinas (seta). Axonema: ax. Aumentos: ambos 77.500x.

Discussão

No início da espermiogênese as mitocôndrias encontram-se distribuídas no citoplasma, com o prosseguimento dessa etapa, as mitocôndrias gradualmente se deslocam para um polo da célula e iniciam um processo de coalescência, dando origem ao complexo

mitocondrial ou “nebenkern”, do qual são formados dois derivados mitocondriais. Esse processo foi observado nas quatro espécies deste estudo e é semelhante em insetos (PHILLIPS, 1970; DALLAI, 2014). Em fases avançadas da espermiogênese, foi observada nas quatro espécies deste estudo, a presença de microtúbulos entre os derivados mitocondriais e uma membrana que os envolvia, cuja função ainda não é esclarecida. Segundo Phillips (1970), a função dos microtúbulos deve estar associada ao processo de alongamento das espermátides. Os derivados mitocondriais assumem formas espécie-específicas (PHILLIPS, 1970) e o padrão – os dois derivados mitocondriais são simétricos, estão posicionados bilateralmente ao axonema e possuem a face côncava voltada para o axonema e a convexa para o lado oposto - encontrado nas espécies analisadas no presente estudo, difere do identificado por Werner et al (2002) em *Aleochara curtula* (Coleoptera), por Russel et al (2013) em *Caurinus dectes* (Mecoptera) e por Dallai (2014) em *Drosophila bifurca* (Diptera), *Pezzotettix giornai* (Orthoptera), *Apopestes spectrum* (Lepidoptera), *Forficula auricularia* (Dermaptera), *Xenos vesparum* (Strepsiptera), *Calopteryx* sp. (Odonata) e *Vespa crabro* (Hymenoptera), os quais são assimétricos e/ou possuem a face voltada para o axonema convexa, ou então se encontram posicionados abaixo do axonema. Entretanto, o padrão encontrado nas quatro espécies desse trabalho, assemelha-se mais aos dos derivados mitocondriais de *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera), *Coptosoma scutellatum* (Heteroptera) (MERCATI et al, 2009), *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera) (ALEVI et al, 2015) e *Largus rufipennis* (Heteroptera) (ARAÚJO et al, 2012), os quais são todos simétricos com a face côncava voltada para o axonema e a convexa para o lado oposto e posicionados bilateralmente ao axonema, indicando que o padrão do formato dos derivados mitocondriais de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus* possivelmente é similar para insetos da mesma subordem.

Esse trabalho indicou nas espermátides em estado mais avançado das quatro espécies analisadas, a presença de duas estruturas paracristalinas no interior de cada derivado mitocondrial, corroborando a informação de que os Heteroptera possuem como característica comum, não encontrada em outros insetos, a presença de duas ou três estruturas paracristalinas (AFZELIUS et al, 1976; DALLAI; AFZELIUS, 1980). Outra característica também observada nos coreídeos desse presente estudo, que é considerada uma sinapomorfia de Heteroptera, é a presença de uma ponte ligando cada derivado mitocondrial a um microtúbulo axonemal (DALLAI; AFZELIUS, 1980). Segundo Bão e Souza (1994), essa ponte está relacionada com a mobilidade do flagelo para produzir um movimento coordenado.

Atualmente, várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, como a participação no controle e regulação da forma do movimento flagelar e estando relacionado com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a mobilidade flagelar (PHILLIPS, 1974; YASUZUMI, 1974; TOKUYASU, 1975). Acrescentando a essas funções, Noguchi et al (2012) propuseram que a arquitetura dupla da membrana da mitocôndria, combinados com os microtúbulos citoplasmáticos, podem servir como suporte estrutural para o alongamento da cauda do espermatozoide.

O axonema de hexápodos tem origem a partir do centríolo, como já descrito em trabalhos anteriores (DALLAI, 2014). Hexápodos basais possuem uma conformação básica dos microtúbulos do axonema básica de $9 + 2$, sendo essa uma condição ancestral (WHALLEY; JARZEMBOWSKI, 1981; DALLAI, 2014). A partir de Diplura até todos os insetos pterigotas, o axonema se torna mais complexo devido à presença de 9 microtúbulos acessórios adicionais localizados externamente à estrutura básica $9 + 2$. Essa nova aquisição é uma importante sinapomorfia de Insecta + Diplura, não sendo compartilhada com nenhum outro organismo (DALLAI; AFZELIUS, 1999). Tal informação corrobora com o padrão da conformação dos microtúbulos do axonema identificado para as quatro espécies desse presente estudo, o qual é de $9 + 9 + 2$.

Nesse estudo sobre a formação dos derivados mitocondriais, bem como a estrutura do axonema de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, foi observado um padrão de conformação dos microtúbulos axonemais de $9 + 9 + 2$, o qual é uma sinapomorfia de Insecta + Diplura. Foram encontradas características sinapomórficas de Heteroptera para todas as quatro espécies, como a presença de duas estruturas paracristalinas em cada derivado mitocondrial e a presença de duas pontes que ligam os derivados mitocondriais aos microtúbulos axonemais. Observou-se também que a morfologia dos derivados mitocondriais é espécie-específicos, entretanto assemelham-se mais aos derivados mitocondriais de espécies pertencentes à mesma ordem. Os dados obtidos são ferramentas importantes para auxiliar em análises filogenéticas e sistemáticas. Novos estudos das etapas da espermiogênese permitirão revelar novas sinapomorfias e aprofundar o conhecimento relacionado ao grupo Heteroptera em nível ultraestrutural, cujos estudos ainda são escassos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/19864-5), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

- AFZELIUS, B. A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of *Notonecta*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 8, p. 149–161, 1976.
- ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, v. 93, p. 239–244, 2012.
- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F.; AFZELIUS, B. A. Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. **The Journal of cell biology**, v. 73, n. 3, p. 594-600, 1977.
- BÁO, S. N.; LINS, U.; FARINA, B.; DE SOUZA, W. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon: Some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. **Journal of Structural Biology**, v. 109, p. 46-51, 1992.
- BÁO, S.N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DOLDER, H. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Cytobios**, v. 58 p. 93-100, 1989.
- BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. **The Biological Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 316-362, 1920.
- BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. III. On the structure of the nebenkern in the insect spermatid and the origin of nebenkern patterns. **The Biological Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 53-84, 1922.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). **Journal of Morphology**, v. 164, p. 301–309, 1980.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance. **The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications**. Cache River Press, Vienna, IL, p. 333-350, 1999.
- DALLAI, Romano. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod structure & development**, v. 43, n. 4, p. 257-290, 2014.
- FAWCETT, D.W.; ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. **The American journal of anatomy**, v. 116 p. 567-610, 1965.

- FERNANDES, A. P.; CURI, G.; BÁO, S. N. Contribution of the golgi complex - endoplasmic reticulum system during spermiogenesis in three species of phytophagous bugs: (Hemiptera: Pentatomidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, v. 16, n. 2, p. 124-139, 1998.
- FERNANDES, A. P.; CURI, G.; FRANÇA, F. G. R.; BÁO, S. N. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue & Cell**, n. 33, v. 3, p. 286-293, 2001.
- KOLBERG, R.; REDAELLI, L. R.; CANTO-SILVA, C. R.; IDALGO, T. D. Biology of *Holhymenia rubiginosa* Breddin (Hemiptera: Coreidae) on *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Neotropical entomology**, v. 38, n. 6, p. 741-745, 2009.
- LANZONE, C.; SOUZA, M. J. Chromosome complement and meiosis in three species of the Neotropical bug genus *Antiteuchus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Gen. Mol. Biol.**, n. 29, v. 29, p. 49-55, 2006.
- LIMA, C. Insetos do Brasil, **Escola Nacional de Agronomia**, série didática, n. 3, 1940.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP: Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil, 1980.
- MENCARELLI, C.; MERCATI, D.; DALLAI, R.; LUPETTI, P. Ultrastructure of the sperm axoneme and molecular analysis of axonemal dynein in ephemeroptera (Insecta). **Cytoskeleton**, v. 71, n. 5, p. 328-339, 2014.
- MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R. A Novel Membrane Specialization in the Sperm Tail. **Journal of Morphology**, v. 270, p. 825–833, 2009.
- MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R. A novel membrane specialization in the sperm tail of Bug Insects (Heteroptera). **Journal of Morphology**, v. 270, p. 825–833, 2009.
- MORIELLE-SOUZA, A.; TABOGA, S. R.; DE AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Ultrastructural analysis of the nucleolar aspects at spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Triatominae). **Micron**, v. 41, n. 7, p. 791-796, 2010.
- NAME, K. P. O. **Análise morfológica das espermátides e dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores.** 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- NOGUCHI, T.; KOIZUMI, M.; HAYASHI, S. Mitochondria-driven cell elongation mechanism for competing sperms. **Landes Bioscience**, n. 6, v. 2, p. 113-116, 2012.
- OLIVEIRA, C. M.; MOREIRA, J.; GOMES, L. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; LINO-NETO, J. Sperm Bundles in the Seminal Vesicle of the *Crematogaster victima* (Smith) Adult Males (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical entomology**, v. 43, n. 3, p. 201-208, 2014.
- PACKAUSKAS, R. J. Key to the subfamilies and tribes of the new world coreidae (Hemiptera), with a checklist of published keys to genera and species. **Proc. entomol. Soc. Wash.** n. 1, v. 96, p.44-53, 1994.

- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 44 p. 243-277, 1970.
- PHILLIPS, D. M. Structural variants in invertebrate sperm flagella and their relationship to motility. **Cilia and Flagella**, p. 379-402, 1974.
- ROSATI, F.; SELMI, G.; MAZZINI, M. Comparative observation on the mitochondrial derivatives of insect sperm. **Journal of submicroscopic cytology**, v.8 p. 56-67, 1976.
- RUSSELL, L. K.; DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. The sperm ultrastructure of *Caurinus dectes* Russell (Mecoptera: Boreidae) and its phylogenetic implications. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 6, p. 397-401, 2013.
- SCHUH, T. T.; SLATER, J. A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history, Cornell UNIVERSITY press, Ithaca, New York, v. 12, 338 p., 1995.
- TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. **Experimental Cell Research**, v. 84 p. 239-250, 1974.
- TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Headtail alignment. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 50, p. 117-129, 1975.
- VENABLE, J. H.; COGGESHALL R. A. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**. v. 25, p. 407- 408, 1965.
- WARNER, F. D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 35, p. 210-232, 1971.
- WATSON, M. L. Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v. 4, p. 475-478, 1958.
- WERNER, M.; TSCHEULIN, T.; SPECK, T.; ZISSLER, D.; PESCHKE, K. Ultrastructure and motility pattern of the spermatozoa of *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). **Arthropod, Structure & Development**, v. 31, p. 243-254, 2002.
- WHALLEY, P.; JARZEMBOWSKI, E. A. A new assessment of Rhyniella, the earliest known insect, from the Devonian of Rhynie, Scotland. **Nature**, p. 317, 1981.
- YASUZUMI, G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. **International Review of Cytology**, v. 37, p.53-119, 1974.

Desenvolvimento da espermiogênese de quatro espécies de Coreidae, com ênfase na formação do acrossomo (Heteroptera: Coreidae)

Emi Rosane Silistino-Souza, Fernando Cesar Silva Junior, Luis Lênin Vicente Pereira, Mary Massumi Itoyama

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos.

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Bairro: Jardim Nazareth,
15054-000 - São José do Rio Preto, SP
Emi Rosane Silistino de Souza
emi.rosane@hotmail.com

Resumo

As espécies *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* pertencem à família Coreidae (Heteroptera) e são conhecidos por serem todos fitófagos e por se alimentarem de plantas de valor comercial. Apesar da grande diversidade, da importância dessa subordem e relevância da técnica utilizada, ainda há poucos estudos relacionados às ultraestruturas dessa subordem. Portanto, neste estudo, foi analisada a espermiogênese das quatro espécies em nível ultraestrutural com ênfase na formação do acrossomo. Observou-se que essa estrutura é formada a partir do complexo de Golgi e durante o processo, foi observada a formação da vesícula pró-acrossomal e do adjunto do centríolo, o qual determina o polo posterior do espermatozoide. Enquanto o adjunto do centríolo se desenvolve, os derivados mitocondriais e o axonema se alongam formando o flagelo. Concomitante a esse processo, o acrossomo passa por transformações e se alonga, determinando o polo anterior do espermatozoide.

Palavras-chave: ultraestrutura, hemiptera, espermátide, adjunto do centríolo

Introdução

Dentre os diversos tipos celulares de insetos, o espermatozoide é o mais diversificado nas diferentes espécies (JAMIESON, 1987; JAMIESON et al, 1999), sendo uma célula especializada com características incomuns (PHILLIPS, 1970). Os principais compartimentos de um espermatozoide típico de insetos são a cabeça (núcleo e acrossomo) e a cauda (axonema e derivados mitocondriais) (PHILLIPS, 1970). Na região entre o

núcleo e o flagelo geralmente está localizado um material eletrodense, o qual forma o adjunto do centríolo (JAMIESON, 1987; JAMIESON et al, 1999).

As características ultraestruturais dos espermatozoides têm sido utilizadas como ferramenta para auxiliar na resolução de questões relacionadas com a filogenia e taxonomia de vários grupos de animais, incluindo os insetos (JAMIESON, 1999).

A formação do acrossomo, por meio do complexo de Golgi (YASUZUMI, 1974; BÁO et al, 1989), é considerada essencial para o processo de penetração do espermatozoide no ovócito, tanto em animais superiores como em insetos (PHILLIPS, 1970). Caracteres como o tamanho (pequeno ou grande) e estrutura interna dessa ultraestrutura (formada por 1 a 3 camadas) foram verificados que variam entre diferentes espécies de animais (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1951; ANDERSON; PERSONNE, 1975; DALLAI, 2014). O nome adjunto do centríolo foi dado por Gatenby e Tahmisian (1959), por ser formado ao redor do centríolo na região de transição núcleo-flagelo (ARAUJO et al, 2011). Acredita-se que a função dessa estrutura eletrodensa seja a de manter unidas as estruturas do flagelo entre si e ao núcleo (PHILLIPS, 1970). Há estudos do desenvolvimento, função e morfologia do adjunto do centríolo em diversas espécies de insetos, como, por exemplo, nessas de Heteroptera: *Eurydema ventralis* Kol. (Trandaburu, 1973), *Euschistus heros* (Cossolin, 2015) e *Coptosoma scutellatum* (Dias et al, 2016).

Nesse trabalho analisamos a espermiogênese de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* em nível ultraestrutural, com ênfase no desenvolvimento do acrossomo por meio da vesícula pró-acrossomal e da formação do adjunto do centríolo.

Material e métodos

Espécimes de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* foram coletados e os testículos de cinco indivíduos de cada espécie foram extraídos e imediatamente fixados em solução de Karnovsky, por 24 horas. Após a fixação, foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig e pós-fixados com Tetróxido de Ósmio à 1%: Millonig (1:3), por 2 horas em geladeira. Em seguida, os testículos foram lavados em água bidestilada e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona, atingindo 100%. Logo após, o material foi pré-infiltrado em araldite:acetona (1:1), deixados *overnight*, em temperatura ambiente e infiltrado em araldite por 2 horas a 37°C. Após essa etapa, foram incluídos em araldite por 48 horas a 60°C. Os cortes semifinos

foram obtidos em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, sendo, posteriormente, corados com azul de toluidina pH 4,0 (MELLO; VIDAL, 1980) para a verificação da presença de material na região do corte. Então foram feitos cortes ultrafinos, coletados em *grids* e, posteriormente, contrastados primeiro com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1 N, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). As imagens foram obtidas por meio do microscópio eletrônico de transmissão (MET) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Resultados

As análises das espermátides de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* mostraram resultados semelhantes morfológicamente, portanto os resultados foram apresentados em conjunto. Foi possível verificar que no início da formação do acrossomo, o complexo de Golgi mantém sua face trans voltada para o núcleo (Figuras 1a-f, 2c) e dele inicia um processo de liberação de diversas vesículas (Figura 1a-d), as quais irão se fundir dando origem a uma estrutura maior (Figuras 1a-f, 2a-c). Essa estrutura, denominada grânulo ou vesícula pró-acrossomal é esférica com uma membrana simples e localiza-se entre o complexo de Golgi e o núcleo (Figuras 1a-f, 2a-c). Concomitante a esse processo, na face do núcleo voltada para a vesícula pró-acrossomal, inicia-se a formação de uma estrutura achatada e eletrodensa, a qual aumenta de tamanho progressivamente, denominado adjunto do centríolo (Figuras 1a-e, 2a-c) e uma estrutura mais eletrolúcida que também aumenta de volume gradualmente (Figuras 1c-e, 2a,c). Paralelamente, no interior da vesícula pró-acrossomal, é formada uma região mais eletrodensa dentro de outra mais eletrolúcida, localizada na periferia da vesícula, na região voltada para o núcleo (Figuras 1b,f, 2a-c).

Durante o processo de formação da vesícula pró-acrossomal, essa se aproxima gradualmente do núcleo e se anexa a ele ao lado do adjunto do centríolo e da estrutura mais eletrolúcida (Figuras 1a-f, 2a-c). Em parte desta etapa, foi observada nas espermátides das espécies analisadas, a presença de diversos microtúbulos circundando o núcleo, apresentando cromatina filamentososa, o acrossomo ainda em desenvolvimento e o adjunto do centríolo dividido em duas porções associadas ao envoltório nuclear (Figura 2d,e). Em corte transversal da porção mais basal do núcleo foi possível observar que parte do material eletrodense do adjunto do centríolo se projeta em direção ao citoplasma em

forma de cordão (Figura 2f). Na Figura 3a observamos com maior clareza que essa projeção do adjunto do centríolo encontra-se conectada ao centríolo. No início da porção flagelar em corte transversal, observamos os derivados mitocondriais posicionados bilateralmente ao centríolo modificado, o qual dará origem ao axonema. Nesse conecta-se a projeção do material eletrodenso com o qual é formado o adjunto do centríolo (Figura 3b).

Após algumas transformações durante a espermiogênese, a vesícula pró-acrossomal dá origem à um acrossomo achatado e eletrodenso, o qual determina o polo anterior do espermatozoide (Figura 3c). O acrossomo passa por alterações morfológicas, se tornando cada vez mais volumoso e pontudo com o prosseguimento do processo espermiogênico (Figuras 3c,d e 4a-d). O adjunto do centríolo e o acrossomo tendem a se posicionar em polos opostos (Figura 3d). Em estágios mais avançados da espermiogênese, observa-se o acrossomo no polo anterior e no polo oposto o adjunto do centríolo já desenvolvido (Figura 4b-c). Os derivados mitocondriais são formados em contato com a região basal do adjunto do centríolo (Figura 4b). Em *L. gonagra* é possível observar em corte longitudinal de espermátides que o acrossomo segue do polo anterior do núcleo até sua lateral (Figura 4c). O adjunto do centríolo, em estágios avançados da espermiogênese localiza-se na porção lateral do núcleo na região de transição núcleo-flagelo (Figura 4c,e).

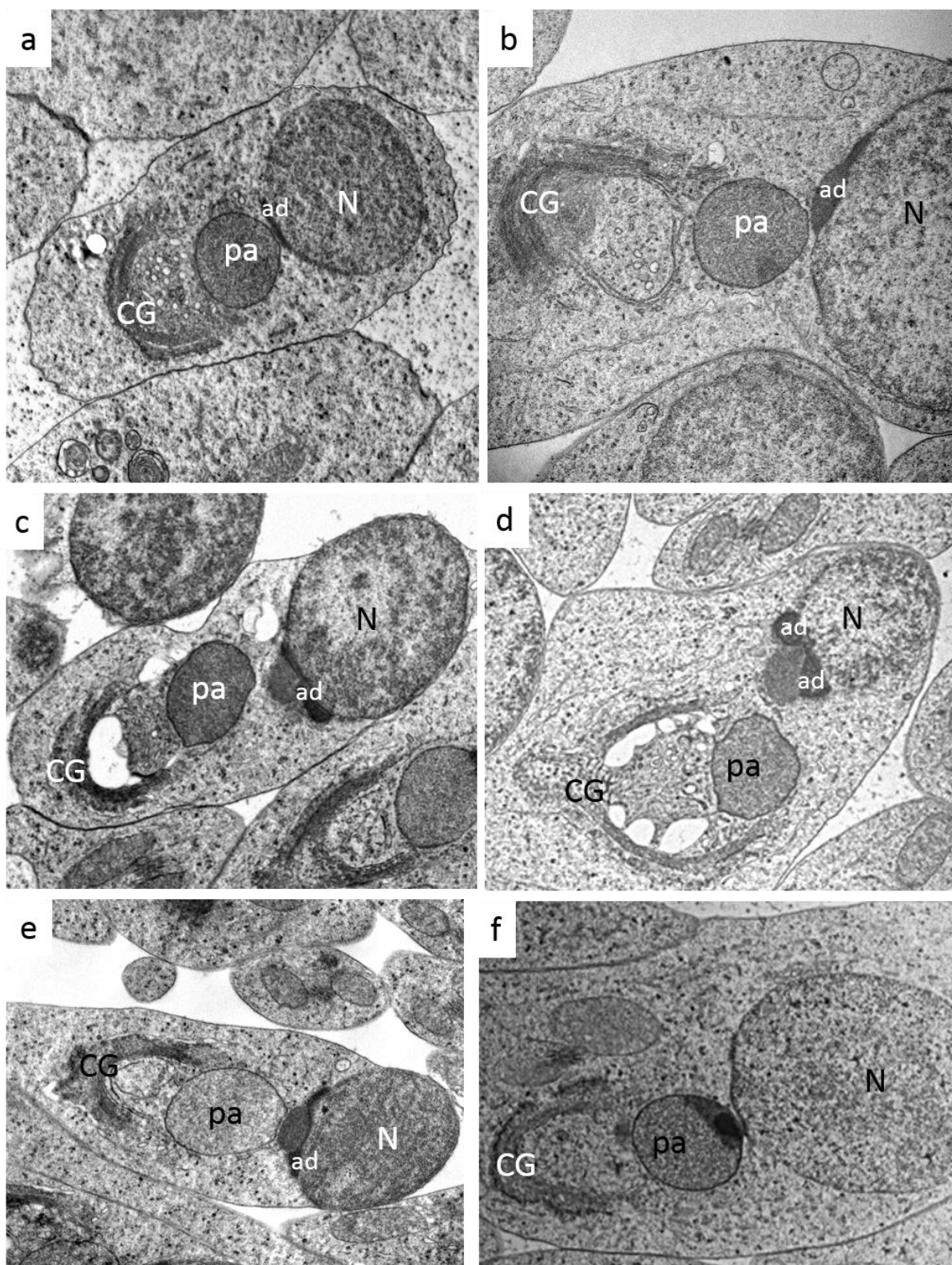


Figura 1. Início da formação do acrossomo e do adjunto do centríolo em *C. fuscus* (a), *S. fasciatus* (b,d), *L. zonatus* (c) e *L. gonagra* (e,f). **a-f)** Corte transversal de espermátides evidenciando a posição do grânulo pró-acrossomal (pa) entre o complexo de Golgi (CG) e o núcleo (N) e a formação do adjunto do centríolo (ad). Aumentos: 12.930x, 16.700x, 12.930x, 10.000x, 10.000x e 12.930x, respectivamente.

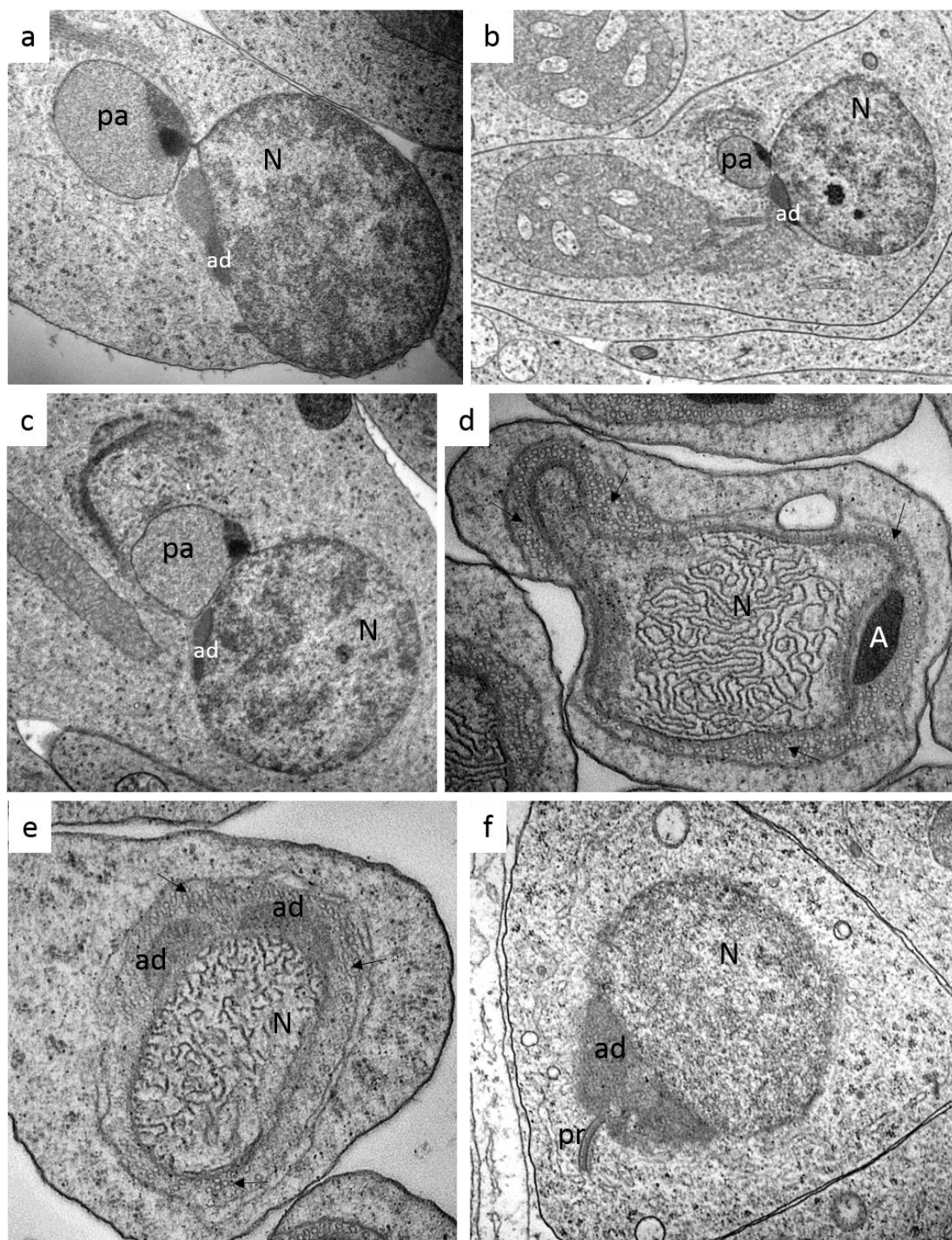


Figura 2. Vesícula pró-acrossomal se anexando ao núcleo dando origem ao acrossomo e desenvolvimento do adjunto do centríolo em *L. zonatus* (a-f). **a-c)** Cortes transversais de espermatídes mostrando a vesícula pró-acrossomal se anexando ao núcleo gradualmente. Núcleo: N, vesícula pró-acrossomal: pa; **d-e)** Acrossomo se formando e aumentando de tamanho e adjunto do centríolo em duas porções anexadas ao núcleo. Acrossomo: A, adjunto do centríolo: ad e microtúbulos: seta; **f)** Projeção do material do adjunto do centríolo (pr). Aumentos: 21.560x, 7.750x, 16.700x, 60.000x, 46.460x e 21.560x, respectivamente.

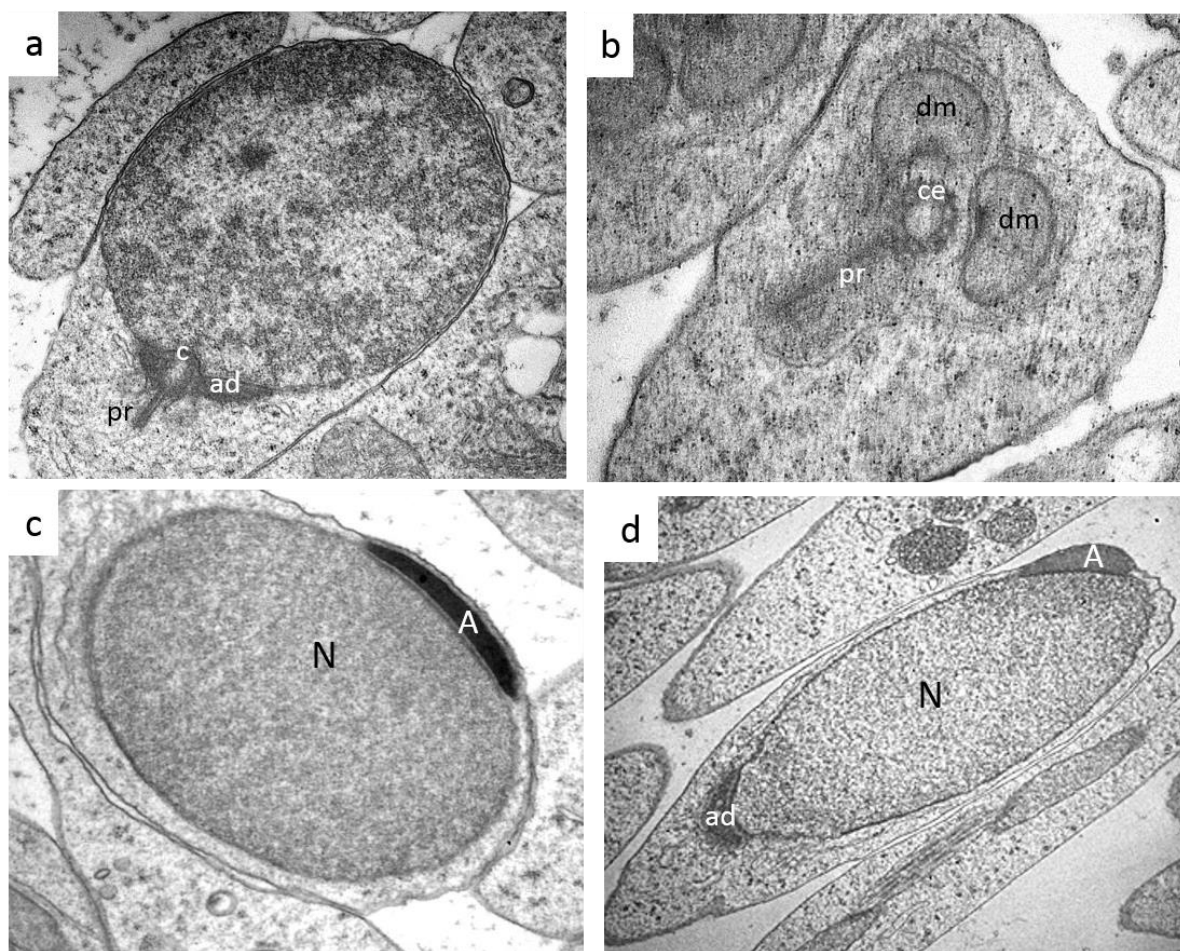


Figura 3. Formação do acrossomo e do adjunto do centríolo em *L. zonatus* (a-d). **a)** Adjunto do centríolo (ad) anexado ao núcleo (N), com projeção do seu material eletrodense (pr) conectada ao centríolo (c); **b)** Corte transversal na região flagelar abaixo do núcleo evidenciando a projeção do material do adjunto do centríolo (pr) conectada ao centríolo modificado (ce). Derivados mitocondriais: dm; **c-d)** Desenvolvimento do acrossomo (A) e do adjunto do centríolo. Aumentos: 21.560x, 60.000x, 16.700x e 20.000x.

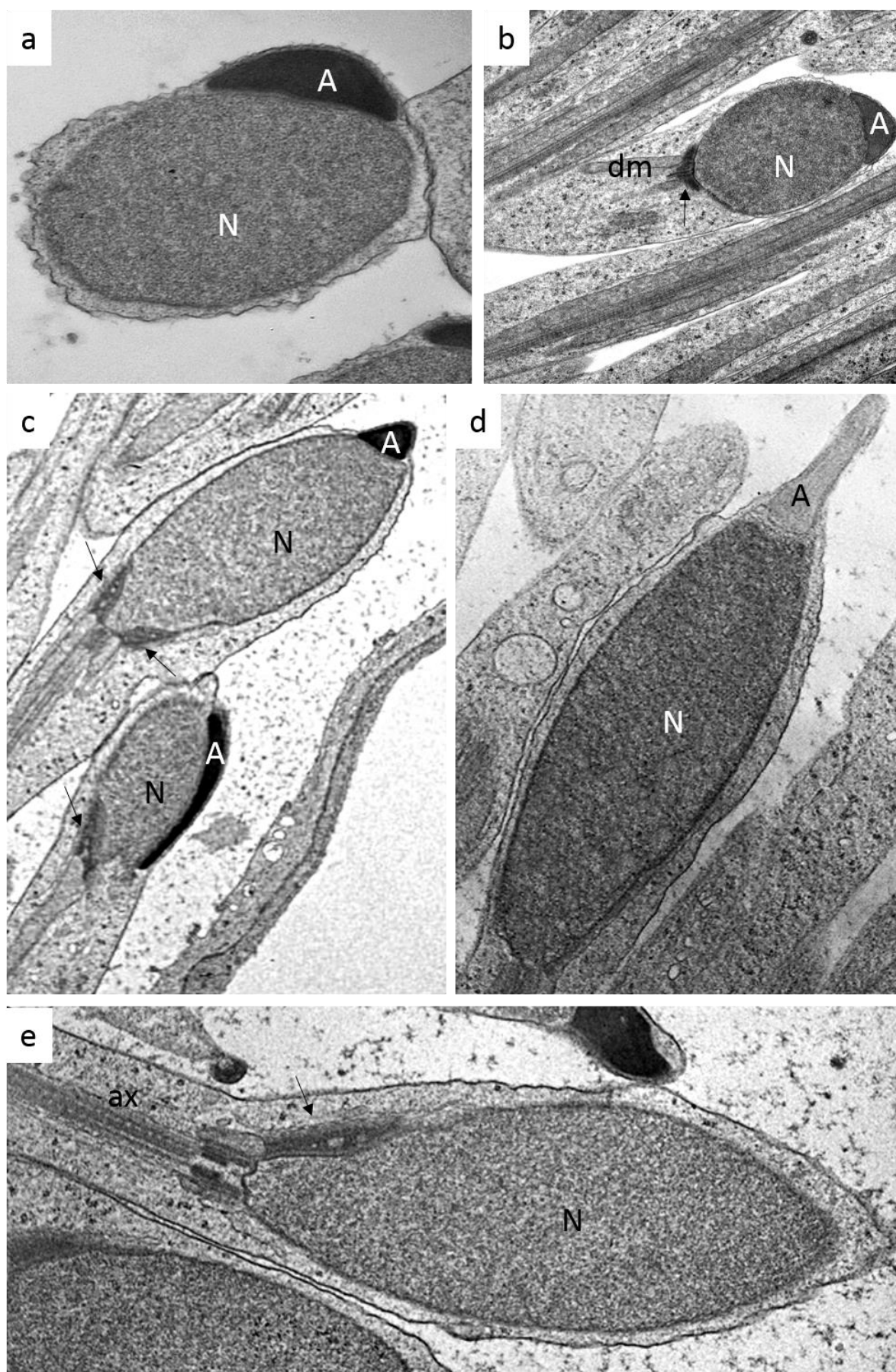


Figura 4. Cortes transversal (a) e longitudinais (b-e) de espermátides evidenciando o desenvolvimento do acrossomo em *L. zonatus* (a), *L. gonagra* (b,c) e *S. fasciatus* (d,e). **a)** Espermátide com acrossomo (A). Núcleo: N; **b)** Espermátide evidenciando a posição do acrossomo e do adjunto do centríolo (seta). Derivado mitocondrial: dm; **c)** Espermátides mostrando o acrossomo na posição apical e

lateral do núcleo; **d**) Espermátide em estado avançado de desenvolvimento; **e**) Espermátide em estado avançado. Axonema: ax. Aumentos: 21.560x, 10.000x, 6.000x, 12.930x e 12.930x.

Discussão

No início da espermiogênese ocorre a formação do acrossomo, com envolvimento direto do complexo de Golgi por meio da liberação de diversas vesículas pequenas, as quais se fundem dando origem a uma única maior, denominada vesícula pró-acrossomal. Esse processo foi observado nesse trabalho em *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphiclyrtus fasciatus* e em outros organismos como *Acrosternum aseedum*, *Nezara viridula*, *Euchistus heros* (Pentatomidae) por Fernandes e Bão (1998) e Fernandes et al (2001), *Ptyodactylus hasselquisti* (Squamata) por Al-dokhi (2009), *Lucilia cuprina* e *L. eximia* (Diptera) por Name et al (2012), indicando ser um processo similar desses grupos.

Foi observado, também, nesse estudo que a vesícula pró-acrossomal, durante os estágios iniciais de sua formação, encontra-se entre as cisternas da face trans do complexo de Golgi e o núcleo. Tal disposição foi observada em várias espécies, com exceção do gafanhoto *Conocephalus* sp., cuja vesícula pró-acrossomal é formada na face convexa do complexo de Golgi (PHILLIPS, 1970). Nas quatro espécies analisadas nesse trabalho, foi observada a aproximação gradual da vesícula pró-acrossomal em relação ao núcleo até se anexar a ele, determinando o polo anterior do futuro espermatozoide, corroborando com os resultados de Dallai (2014). Em estágios avançados da espermiogênese, a vesícula pró acrossomal, já anexada ao núcleo, dá origem ao acrossomo (PHILLIPS, 1970), como observado por Lino-Neto (1993) em *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera) e por Fernandes et al (1998) em *Acrosternum aseedum*, *Euchistus heros* e *Nezara viridula* (Pentatomidae, Heteroptera).

Simultaneamente ao processo de formação do acrossomo, ocorre o desenvolvimento do adjunto do centríolo de estrutura eletrodensa, cuja função principal acredita-se ser a de manter as estruturas flagelares associadas ao núcleo (PHILLIPS, 1970), como registrado em *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) (Heteroptera) (DIAS et al, 2016). Essa estrutura encontra-se aderida ao envoltório nuclear e dá origem ao polo posterior (WERNER; WERNER, 1993). É formada principalmente por proteínas, porém já foi detectada a presença DNA em seu interior (CANTACUZÈNE, 1970; BACCETTI, 1970 *apud* DALLAI, 2014). Foi proposto que o corpo cromatoide, outra estrutura observada durante o processo espermiogênico, daria origem ao adjunto do centríolo, além de outras estruturas durante a espermiogênese (LANDIM, 2009).

Foi observada nesse trabalho a presença de diversos microtúbulos circundando o núcleo, o acrossomo e o adjunto do centríolo em cortes transversais das espermatídes das espécies analisadas. Segundo Dallai (2014) esses microtúbulos teriam como função modificar a forma tanto do acrossomo quanto do núcleo durante a espermiogênese. Conseqüentemente, a forma da cabeça do espermatozoide seria alterada também, podendo apresentar-se mais alongada ou não. Observamos ainda, nas espécies analisadas no presente trabalho, que nessa etapa de maturação, a cromatina apresenta-se filamentosa, similar ao observado por Dallai et al (2014) em *Zorotypus huxleyi* (Zoraptera). Ainda não há pesquisas esclarecendo o motivo pelo qual a cromatina se encontra filamentosa nessa etapa do desenvolvimento.

Nesse estudo observamos o adjunto do centríolo disposto em duas estruturas ligadas ao núcleo e ambos envoltos por diversos microtúbulos. Essa disposição do adjunto do centríolo em duas regiões foi observada em *Coptosoma scutellatum* (Heteroptera) por Dias et al (2016), entretanto essas regiões mostraram na porção superior dos derivados mitocondriais a formação de dois anéis ao seu redor, apresentando assim, uma disposição complexa do adjunto do centríolo na espermatíde. Em um corte transversal da região mais basal do núcleo das espermatídes das espécies aqui analisadas, observamos uma projeção do material eletrodense do adjunto do centríolo em forma de fita ou cordão, o qual está conectado diretamente ao centríolo. Esta fita ou cordão também é observada em corte transversal da região do início do flagelo conectando-se ao centríolo modificado, o qual dará origem posteriormente ao axonema. Essa projeção do adjunto do centríolo observada nesse estudo em cortes transversais, em diferentes porções da espermatíde, também foram observadas por Dias et al (2016) em *C. scutellatum* (Heteroptera). Tal observação, portanto, indica que esse não é um processo isolado para as espécies da família Coreidae, como observado no presente estudo, mas presentes em outras famílias, como Plataspididae.

Portanto verificamos que a formação do acrossomo por meio da vesícula pró-acrossomal relatada nesse estudo nas quatro espécies de coreídeos, é típica de insetos e o desenvolvimento do adjunto do centríolo aqui descrito, foi o similar ao já retratado em outros trabalhos, como os mencionados anteriormente.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/19864-5), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

AMARO, G. B. Ageitec - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn7f7wkv02wx5ok0liq1mqw3jz66y.html>>. Acesso em: 23 de Outubro de 2014.

ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, v. 93, p. 239–244, 2012.

BACCETTI, B. Insect Sperm Cell. **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 315-397, 1972.

BÁO, S. N.; LINS, U.; FARINA, B.; DE SOUZA, W. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon: Some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. **Journal of Structural Biology**, v. 109, p. 46-51, 1992.

BÁO, S. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DOLDER, H. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Cytobios**, v. 58 p. 93-100, 1989.

COSSOLIN, J. F. S. **Polimorfismo e ultraestrutura dos espermatozoides de Euschistus heros (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2015. 24 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod structure & development**, v. 43, n. 4, p. 257-290, 2014.

DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; MERCATI, D.; MACHIDA, R.; MASHIMO, Y.; MATSUMURA, Y.; RAFAEL, J. A; BEUTEL, R. G. Comparative morphology of spermatozoa and reproductive systems of zorapteran species from different world regions (Insecta, Zoraptera). **Arthropod structure & development**, v. 43, n. 4, p. 371-383, 2014.

DIAS, G., LINO-NETO, J., MERCATI, D., & DALLAI, R. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. **Micron**, v. 82, p. 33-40, 2016.

FAWCETT, D. W.; ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. **The American journal of anatomy**, v. 116 p. 567-610, 1965.

FERNANDES, A. P.; CURI, G.; BÁO, S. N. Contribution of the golgi complex - endoplasmic reticulum system during spermiogenesis in three species of phytophagous bugs: (Hemiptera: Pentatomidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol**, v. 16, n. 2, p. 124-139, 1998.

FERNANDES, A. P.; CURI, G.; FRANÇA, F. G. R.; BÁO, S. N. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue & Cell**, v. 33, n. 3, p. 286-293, 2001.

LANDIM, C. C. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 408 p., 2009.

LIMA, C. Insetos do Brasil, **Escola Nacional de Agronomia**, série didática, n. 3, 1940.
MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP: Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil, 1980.

MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R. A Novel Membrane Specialization in the Sperm Tail. **Journal of Morphology**, v. 270, p. 825–833, 2009.

NAME, K. P. O. **Análise morfológica das espermatídes e dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores.** 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PACKAUSKAS, R. J. Key to the subfamilies and tribes of the new world coreidae (Hemiptera), with a checklist of published keys to genera and species. **Proc. entomol. Soc. Wash.** n. 1, v. 96, p.44-53, 1994.

PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 44 p. 243-277, 1970.

PHILLIPS, D.M. Structural variants in invertebrate sperm flagella and their relationship to motility. In: SLEIGH, M. A. Cilia and Flagella London: **Academic Press**, p. 379-402, 1974.

ROSATI, F.; SELMI, G.; MAZZINI, M. Comparative observation on the mitochondrial derivatives of insect sperm. **Journal of submicroscopic cytology**, v.8 p. 56-67, 1976.

RUSSELL, L. K.; DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. The sperm ultrastructure of *Caurinus dectes* Russell (Mecoptera: Boreidae) and its phylogenetic implications. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 6, p. 397-401, 2013.

SCHUH, T. T.; SLATER, J. A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history, **Cornell UNIVERSITY press**, Ithaca, New York, v. 12, 338 p., 1995.

TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. **Experimental Cell Research**, v. 84 p. 239-250, 1974.

TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Headtail alignment. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 50, p. 117-129, 1975.

TRANDABURU, V. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). **Trav. Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa"**, v. 13, p. 137-145, 1973.

VENABLE, J. H.; COGGESHALL R. A. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**. v. 25, p. 407- 408, 1965.

WARNER, F. D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 35, p. 210-232, 1971.

WATSON, M. L. Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v. 4, p. 475-478, 1958.

WERNER, M.; TSCHEULIN, T.; SPECK, T.; ZISSLER, D.; PESCHKE, K. Ultrastructure and motility pattern of the spermatozoa of *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). **Arthropod, Structure & Development**, v. 31, p. 243-254, 2002.

WERNER, G.; WERNER, K. Changes in the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and acrosome during spermiogenesis in the waterstrider, *Gerris najas* deg. (Heteroptera : Gerridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. v. 22 p. 521-534, 1993.

YASUZUMI, G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. **International Review of Cytology**, v. 37, p.53-119, 1974.

VI. DISCUSSÃO GERAL

VI. DISCUSSÃO GERAL

A subordem Heteroptera é um grupo diverso e importante economicamente, sendo alguns indivíduos fitófagos, os quais podem ser praga de diversos cultivos (SCHUH; SLATER, 1995). Algumas famílias desse grupo já foram estudadas com relação à espermiogênese a nível ultraestrutural como em Reduviidae (BAO; DE SOUZA, 1994), em Pentatomidae (ARAUJO et al, 2011), em Largidae (ARAUJO et al, 2012) e em Plataspidae (DIAS et al, 2016). No presente trabalho foram analisadas algumas ultraestruturas observadas durante o processo espermiogênico.

Durante a espermiogênese as mitocôndrias encontram-se distribuídas no citoplasma, com o prosseguimento dessa etapa, as mitocôndrias gradualmente se deslocam para um polo da célula e inicia um processo de coalescência, dando origem ao complexo mitocondrial ou “nebenkern”, do qual são formados dois derivados mitocondriais. Esse processo observado nas quatro espécies deste estudo é semelhante em insetos (PHILLIPS, 1970; DALLAI, 2014). Os derivados mitocondriais assumem formas espécie-específicas (PHILLIPS, 1970) e o padrão - côncavo voltado para o axonema e convexo para o lado oposto - encontrado nas espécies analisadas no presente estudo, difere do encontrado por Werner et al (2002) em *Aleochara curtula* (Coleoptera), por Russel et al (2013) em *Caurinus dectes* (Mecoptera) e por Dallai (2014) em *Drosophila bifurca* (Diptera), *Pezzotettix giornai* (Orthoptera), *Apopestes spectrum* (Lepidoptera), *Forficula auricularia* (Dermaptera), *Xenos vesparum* (Strepsiptera), *Calopteryx* sp. (Odonata) e *Vespa crabro* (Hymenoptera), porém esse padrão assemelha-se mais aos dos derivados mitocondriais de *Pyrrochoris apterus* (Heteroptera), *Coptosoma scutellatum* (Heteroptera) (MERCATI et al, 2009), *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera) (ALEVI et al, 2015) e *Largus rufipennis* (Heteroptera) (ARAUJO et al, 2012), todos periformes, indicando que o padrão do formato dos derivados mitocondriais de *C. fuscus*, *L. gonagra*, *L. zonatus* e *S. fasciatus* é similar para insetos da mesma ordem.

Esse trabalho indicou em espermátides no seu estado mais avançado, a presença de duas estruturas paracristalinas no interior de cada derivado mitocondrial, corroborando a informação de que os Heteroptera possuem como característica comum, não encontrada em outros insetos, a presença de duas ou três estruturas paracristalinas (AFZELIUS et al, 1976; DALLAI; AFZELIUS, 1980). Outra característica também observada nos coreídeos desse presente estudo, que é considerada uma sinapomorfia de Heteroptera, é a presença de uma ponte entre os derivados mitocondriais e dois dos microtúbulos axonemais (DALLAI; AFZELIUS, 1980). Segundo Bão e Souza (1994), essa

ponte está relacionada com a mobilidade do flagelo para produzir um movimento coordenado.

Atualmente, várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, como a participação no controle e regulação da forma do movimento flagelar e estando relacionado com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a mobilidade flagelar (PHILLIPS, 1974; YASUZUMI, 1974; TOKUYASU, 1975). Acrescentando a essas funções, Noguchi et al (2012) propuseram que a arquitetura dupla da membrana da mitocôndria, combinados com os microtúbulos citoplasmáticos, podem servir como suporte estrutural para o alongamento da cauda do espermatozoide.

Nesse estudo sobre a formação dos derivados mitocondriais, bem como a estrutura do axonema de *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, foi observado um padrão de conformação dos microtúbulos axonemais de 9 + 9 + 2, o qual é uma sinapomorfia de Insecta + Diplura. Foram encontradas características sinapomórficas de Heteroptera para todas as quatro espécies, como a presença de duas estruturas paracristalinas em cada derivado mitocondrial e a presença de duas pontes que ligam os derivados mitocondriais aos microtúbulos axonemais. Neste trabalho observou-se também que a morfologia dos derivados mitocondriais são espécie-específicos, entretanto assemelham-se mais aos derivados mitocondriais de espécies pertencentes à mesma ordem. Os dados obtidos são ferramentas importantes para auxiliar em análises filogenéticas. Novos estudos das etapas da espermiogênese permitirão revelar novas sinapomorfias e aprofundar o conhecimento relacionado ao grupo Heteroptera em nível ultraestrutural, cujos estudos ainda são escassos.

No início da espermiogênese ocorre a formação do acrossomo, com envolvimento direto do complexo de Golgi por meio da liberação de diversas pequenas vesículas, as quais se fundem dando origem a uma única maior, denominada vesícula pró-acrossomal. Esse processo, identificado nesse trabalho em *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* também foi observado em diversos insetos e outros grupos de animais como *Acrosternum aseedum*, *Nezara viridula*, *Euchistus heros* (Pentatomidae) (FERNANDES; BÁO, 1998; FERNANDES et al, 2001), *Ptyodactylus hasselquisti* (Squamata) (AL-DOKHI, 2009), *Lucilia cuprina* e *L. eximia* (Diptera) (NAME et al, 2012), indicando ser um processo similar desses grupos. Foi observado nesse estudo que a vesícula pró-acrossomal, durante os estágios iniciais de sua formação, encontra-se entre as cisternas da face trans do complexo de Golgi e o núcleo, tal disposição foi observada em várias espécies, com exceção do gafanhoto *Conocephalus* sp., cuja

vesícula pró-acrossomal é formada na face convexa do complexo de Golgi (PHILLIPS, 1970). Nas quatro espécies analisadas neste trabalho, foi observada a aproximação gradual da vesícula pró-acrossomal em relação ao núcleo até se anexar a ele, determinando o polo anterior do futuro espermatozoide (DALLAI, 2014), e formando, após subsequente desenvolvimento, o acrossomo em estágios avançados da espermiogênese (PHILLIPS, 1970), como observado por Lino-Neto (1993) em *C. sordidus* (Coleoptera) e por Fernandes et al (1998) em *A. aseadum*, *E. heros* e *N. viridula* (Pentatomidae, Heteroptera).

Simultaneamente ao processo de formação do acrossomo, ocorre o desenvolvimento do adjunto do centríolo, estrutura eletrodensa, cuja função principal acredita-se ser a de manter as estruturas flagelares associadas ao núcleo (PHILLIPS, 1970), como registrado em *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) (Heteroptera) (DIAS et al, 2016). Essa estrutura encontra-se aderida ao envoltório nuclear e dá origem ao polo posterior (WERNER; WERNER, 1993). É formada principalmente por proteínas, porém já foi detectada a presença DNA em seu interior (CANTACUZÈNE, 1970; BACCETTI, 1970 *apud* DALLAI, 2014). Foi proposto que o corpo cromatoide, outra estrutura observada durante o processo espermiogênico, daria origem ao adjunto do centríolo, além de outras estruturas durante a espermiogênese (LANDIM, 2009).

Foi observado neste trabalho a presença de diversos microtúbulos circundando o núcleo, o acrossomo e o adjunto do centríolo em cortes transversais da espermátide de *L. zonatus*, os quais segundo Dallai (2014), teriam como função modificar a forma tanto do acrossomo quanto do núcleo durante a espermiogênese. Ainda nessa etapa de maturação, a cromatina apresenta-se filamentosa, similar ao observado por Dallai et al (2014) em *Zorotypus huxleyi* (Zoraptera). Neste estudo observamos o adjunto do centríolo disposto em duas estruturas ligadas ao núcleo e ambos envoltos por diversos microtúbulos. Essa disposição do adjunto do centríolo em duas regiões foi observada em *C. scutellatum* (Heteroptera) por Dias et al (2016), entretanto essas regiões mostraram na porção superior dos derivados mitocondriais a formação de dois anéis ao seu redor, apresentando assim, uma disposição complexa do adjunto do centríolo na espermátide. Em um corte transversal da região mais basal do núcleo da espermátide de *L. zonatus* aqui analisada, observamos uma projeção do material eletrodense do adjunto do centríolo em forma de fita ou cordão, o qual está conectado diretamente ao centríolo. Esta fita ou cordão também é observada em corte transversal da região do início do flagelo conectando-se ao centríolo modificado, o qual dará origem posteriormente ao axonema. Essa projeção do adjunto do centríolo observada nesse estudo em cortes transversais, em diferentes porções da espermátide, também foram observadas por Dias et al (2016) em *C. scutellatum* (Heteroptera).

A formação do acrossomo por meio da vesícula pró-acrossomal relatada neste estudo nas quatro espécies de coreídeos, é típica de insetos e o desenvolvimento do adjunto do centríolo aqui descrito, foi o similar ao já retratado em outros trabalhos, como os mencionados anteriormente. Mais estudos com relação ao desenvolvimento do acrossomo serão importantes para acompanhar o início da formação da vesícula pró-acrossomal.

VII. CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

O trabalho realizado com *Corecoris fuscus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus*, pertencentes à família Coreidae (Heteroptera), permitiu-nos concluir que:

- O desenvolvimento dos derivados mitocondriais, que ocorre durante a espermiogênese, para formação do flagelo das quatro espécies analisadas, é típico de insetos;
- Todas as espécies analisadas possuem um padrão de conformação de microtúbulos do axonema de $9 + 9 + 2$, sendo essa uma sinapomorfia de Insecta + Diplura;
- Todas as espécies analisadas possuem as características sinapomórficas de Heteroptera, como a presença de duas estruturas paracristalinas em cada um dos dois derivados mitocondriais e a presença de pontes que conectam os derivados mitocondriais aos microtúbulos axonemais;
- A morfologia dos derivados mitocondriais é espécie-específica, porém possuem uma aparência mais similar às espécies pertencentes à mesma subordem. Os derivados mitocondriais em fase avançada da espermiogênese dos Heteroptera são periformes, variando levemente entre as espécies, sendo os de algumas um pouco mais achatados como em *L. zonatus* e outros arredondados como em *L. gonagra* ou pontiagudos como em *C. fuscus*;
- A formação do acrossomo se dá por meio da vesícula pró-acrossomal, a qual tem origem da fusão de vesículas do complexo de Golgi. Este processo é típico de insetos;
- O desenvolvimento do adjunto do centríolo foi concomitante à formação do acrossomo nos quatro coreídeos aqui estudados, havendo registros semelhantes em diversos grupos de insetos.

Até o presente momento ainda são poucos os estudos com relação à espermiogênese em nível ultraestrutural de Heteroptera, portanto, fazem-se necessários mais estudos abrangendo uma maior diversidade das espécies, de forma que a base de

dados atualmente existente seja ampliada. No futuro, a realização de trabalhos com relação ao desenvolvimento do acrossomo será importante para acompanhar o início da formação da vesícula pró-acrossomal, o qual ainda não se encontra completamente esclarecido.

VIII. REFERÊNCIAS

VIII. REFERÊNCIAS

- AFZELIUS, B. A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of *Notonecta*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 8, p. 149–161, 1976.
- AIRES, E. D.; STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 183-188, 2000.
- AL-DOKHI, O. A. Morphogenesis of the acrosomal vesicle during spermiogenesis in the House Gecko, *Ptyodactylus hasselquistii* (Squamata, Reptilia). **Int. J. Zool Res**, v. 5, p. 136-149, 2009.
- AMARO, G. B. v - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn7f7wkv02wx5ok0liq1mqw3jz66y.html>>. Acesso em: 23 de Outubro de 2014.
- ANDERSON, W. A.; PERSONNE, P. The form and function of spermatozoa: a comparative view. In: Afzelius, B. A. (ed) *The Functional Anatomy of the Spermatozoon*, Pergamon Press, Oxford, p. 3-14, 1975.
- ARAÚJO, V. A.; BÁO, S. N.; LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, v. 93, p. 239–244, 2012.
- ARAÚJO, V. A.; LINO-NETO, J.; RAMALHO, F. S.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). **Micron**, v. 42 p. 560–567, 2011.
- BACCETTI, B. Insect sperm cell, **Advances in Insect Physiology**, v. 9, p. 315-397, 1972.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. *The biology of the sperm cell*. Basel, New York, Karger, 254 p, 1976.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A. G.; DALLAI, R.; PALLINI, V. The dynein electrophoretic bands in axonemes naturally lacking the inner or the outer arm. **The Journal of cell biology**, v. 80, n. 2, p. 334-340, 1979.
- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F.; AFZELIUS, B. A. Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. **The Journal of cell biology**, v. 73, n. 3, p. 594-600, 1977.
- BALDIN, E. L. L.; CAETANO, A. C.; LARA, F. M. Atração e desenvolvimento de *Leptoglossus gonagra* (Fabr.) (Hemiptera: Coreidae) em cultivares de abóbora e moranga. **Scientia Agricola**, v.59, n.1, p.191-196, 2002.
- BÁO, S. N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DOLDER, H. Acrosome formation in *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Cytobios**, v. 58 p. 93-100, 1989.
- BORROR, D. J.; DELONG'S, D. M. *Introduction to the study of insects*. 7 ed. Thomson Brooks/Cole. USA. 864 p.

- BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis I. The history of the cytoplasmic components of the sperm in Hemiptera. **The Biological Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 316-362, 1920.
- BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. III. On the structure of the nebenkern in the insect spermatid and the origin of nebenkern patterns. **The Biological Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 53-84, 1922.
- BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; FUMAGALLI, E.; VAN DOESBURG, P.H.; LARRAMENDY, M.L. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Krakow), v. 51, p. 135-141, 2003.
- CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a marked RON revealing aspect of the chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.
- CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1343-1356, 2010.
- COSSOLIN, J. F. S. **Polimorfismo e ultraestrutura dos espermatozoides de Euschistus heros (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**. 2015. 24 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.
- COSTA-NETO, E. M. Insetos como fontes de alimentos para o homem: valoração de recursos considerados repugnantes. **INCI**, v. 28, n. 3, 2003.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). **Journal of Morphology**, v. 164, p. 301–309, 1980.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance. **The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications**. Cache River Press, Vienna, IL, p. 333-350, 1999.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Diptera). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.20 p. 215-222, 1991.
- DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. **Arthropod structure & development**, v. 43, n. 4, p. 257-290, 2014.
- DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; MERCATI, D.; MACHIDA, R.; MASHIMO, Y.; MATSUMURA, Y.; RAFAEL, J. A; BEUTEL, R. G. Comparative morphology of spermatozoa and reproductive systems of zorapteran species from different world regions (Insecta, Zoraptera). **Arthropod structure & development**, v. 43, n. 4, p. 371-383, 2014.

DIAS, G., LINO-NETO, J., MERCATI, D., & DALLAI, R. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. **Micron**, v. 82, p. 33-40, 2016.

FAWCETT, D. W.; EDDY, E. M.; PHILLIPS, D. M. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, n.2, v. 1, p. 129-153, 1970.

FAWCETT, D.W.; ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. **The American journal of anatomy**, v. 116 p. 567-610, 1965.

FERNANDES, A. P.; CURI, G.; BÁO, S. N. Contribution of the golgi complex - endoplasmic reticulum system during spermiogenesis in three species of phytophagous bugs: (Hemiptera: Pentatomidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol**, v. 16, n. 2, p. 124-139, 1998.

FERNANDES, A. P.; CURI, G.; FRANÇA, F. G. R.; BÁO, S. N. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue & Cell**, n. 33, v. 3, p. 286-293, 2001.

FOATA, J.; QUILICHINI, Y., JUSTINE, J. L., BRAY, R. A., MARCHAND, B. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Cavisoma magnum* (Southwell, 1927) (Acanthocephala, Palaeacanthocephala, Cavisomidae), from *Siganus lineatus* (Pisces, Teleostei, Siganidae) (Valenciennes, 1835) in New Caledonia. **Micron**, v. 43, n. 2, p. 141-149, 2012.

JAMIESON, B. G. M.; DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Insects: their spermatozoa and phylogeny. **Science Publishers, Inc.**, Enfield, New Hampshire, USA, 1999.

KOLBERG, R.; REDAELLI, L. R.; CANTO-SILVA, C. R.; IDALGO, T. D. Biology of *Holhymenia rubiginosa* Breddin (Hemiptera: Coreidae) on *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Neotropical entomology**, v. 38, n. 6, p. 741-745, 2009.

LANDIM, C. C. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo: **Editora UNESP**, 408 p., 2009.

LANZAVECCHIA, S.; DALLAI, R.; BELLON, P. L.; AFZELIUS, B. A. The sperm tail of a gall midge and its microtubular arrangement studied by two strategies of image analysis (Cecidomyiidae, Diptera, Insecta). **Journal of structural biology**, v. 107, n. 1, p. 65-75, 1991.

LIMA, C. Insetos do Brasil, **Escola Nacional de Agronomia**, série didática, n. 3, 1940.

LINO-NETO, J. Estudo ultra-estrutural da espermiogênese e dos espermatozoides de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Dissertação (Mestrado), **UNICAMP**, São Paulo, 1993.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP: Editora Edgard **Blücher LTDA**, Campinas, São Paulo, Brasil, 1980.

- MENCARELLI, C.; MERCATI, D.; DALLAI, R.; LUPETTI, P. Ultrastructure of the sperm axoneme and molecular analysis of axonemal dynein in ephemeroptera (Insecta). **Cytoskeleton**, v. 71, n. 5, p. 328-339, 2014.
- MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R. A novel membrane specialization in the sperm tail of Bug Insects (Heteroptera). **Journal of Morphology**, v. 270, p. 825–833, 2009.
- MORIELLE-SOUZA, A.; TABOGA, S. R.; DE AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Ultrastructural analysis of the nucleolar aspects at spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Triatominae). **Micron**, v. 41, n. 7, p. 791-796, 2010.
- NAME, K. P. O. Análise morfológica das espermatídes e dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, **Universidade de Brasília**, Brasília, 2008.
- NAME, K. P. O.; BARROS-CORDEIRO, K. B.; JOSÉ FILHO, B. G.; WOLFF, M.; PUJOL-LUZ, J. R.; BÁO, S. N. Structure and ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in three species of *Lucilia Robineau-desvoidy*, 1830 (Diptera: Calliphoridae). **Journal of morphology**, v. 273, n. 2, p. 160-172, 2012.
- NOGUCHI, T.; KOIZUMI, M.; HAYASHI, S. Mitochondria-driven cell elongation mechanism for competing sperms. **Landes Bioscience**, n. 6, v. 2, p. 113-116, 2012.
- OLIVEIRA, C. M.; MOREIRA, J.; GOMES, L. F.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; LINO-NETO, J. Sperm Bundles in the Seminal Vesicle of the *Crematogaster victima* (Smith) Adult Males (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical entomology**, v. 43, n. 3, p. 201-208, 2014.
- PACKAUSKAS, R. J. Key to the subfamilies and tribes of the new world coreidae (Hemiptera), with a checklist of published keys to genera and species. **Proc. entomol. Soc. Wash.** n. 1, v. 96, p.44-53, 1994.
- PANIZZI, A. R. A possible territorial or recognition behavior of *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Heteroptera, Coreidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 4, p. 577-579, 2004.
- PEROTTI, M. E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. **Journal of submicroscopic cytology**, v.1 p. 171-196, 1969.
- PEROTTI, M. E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. **Journal of Ultrastructure Research**, v.44, p. 181-198, 1973.
- PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: Is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura). **Micron**, v. 42 p. 87-96, 2011.
- PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 44 p. 243-277, 1970.

- PHILLIPS, D. M. Structural variants in invertebrate sperm flagella and their relationship to motility. **Cilia and Flagella**, p. 379-402, 1974.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; LELLO, E. Centriole behaviour during meiosis of male germ cells of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Cytobios**, v. 85, n. 341, p. 73-80, 1996.
- QUICKE, D. J. L. Preimaginal development: from gametogenesis to syngamy. In *Parasitic Wasps* (Ed. Quicke, D. J. L.) **Chapman & Hall**, London, p. 79-101, 1997.
- RUSSELL, L. K.; DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. The sperm ultrastructure of *Caurinus dectes* Russell (Mecoptera: Boreidae) and its phylogenetic implications. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 6, p. 397-401, 2013.
- SANTOS, H. P.; ZAMA, U.; DOLDER, H.; LINO-NETO, J. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). **Micron**, v. 51, p. 36-40, 2013.
- SCHRADER, F.; LEUCHTENBERGER, C. The cytology and chemical nature of some constituents of the developing sperm. **Chromosoma**. v. 4, n. 1, p. 404-428, 1951.
- SCHUH, T. T.; SLATER, J. A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history, **Cornell UNIVERSITY press**, Ithaca, New York, v. 12, 338 p., 1995.
- SOUZA, C. E. P.; FILHO, B. F. A. Nova Planta Hospedeira de *Leptoglossus zonatus* (Dallas) (Heteroptera: Coreidae), **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 28, n. 4, p. 753-756, 1999.
- SOUZA, H. V.; ARAKAKI, R. L. M.; DIAS, L.; MURAKAMI, A. S.; COSTA, L. A. A.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007.
- TAVARES, M.G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.J.V. Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera: Reduviidae) as analyzed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.
- TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. **Experimental Cell Research**, v. 84 p. 239-250, 1974.
- TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. V. Headtail alignment. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 50, p. 117-129, 1975.
- TRANDABURU, V. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). **Trav. Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa"**, v. 13, p. 137-145, 1973.
- VENABLE, J. H.; COGGESHALL R. A. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**. v. 25, p. 407- 408, 1965.

WARNER, F. D. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 35, p. 210-232, 1971.

WATSON, M. L. Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v. 4, p. 475-478, 1958.

WERNER, G.; BAWA, S. R. Spermatogenesis in the Pseudoscorpion *Diplotemnus sp.* with special reference to nuclear changes. **Journal of ultrastructure and molecular structure research**, v. 98, n. 2, p. 119-136, 1988.

WERNER, M.; TSCHEULIN, T.; SPECK, T.; ZISSLER, D.; PESCHKE, K. Ultrastructure and motility pattern of the spermatozoa of *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). **Arthropod, Structure & Development**, v. 31, p. 243-254, 2002.

WERNER, G.; WERNER, K. Changes in the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and acrosome during spermiogenesis in the waterstrider, *Gerris najas* deg. (Heteroptera : Gerridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. v. 22 p. 521-534, 1993.

YASUZUMI, G. Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. **International Review of Cytology**, v. 37, p.53-119, 1974.