



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

Fernando Cesar Silva Junior

Estudo ultraestrutural da espermatogênese de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* (Heteroptera: Pentatomidae)

São José do Rio Preto
2016

Fernando Cesar Silva Junior

Estudo ultraestrutural da espermatogênese de *Chinavia impicticornis*, *Edessa mediatubunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* (Heteroptera: Pentatomidae)

Dissertação apresentada 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, SP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Mary Massumi Itoyama

**São José do Rio Preto
2016**

Silva Junior, Fernando Cesar.

Estudo ultraestrutural da espermatogênese de *Chinavia impicticomis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* (Heteroptera: Pentatomidae) / Fernando Cesar Silva Junior. -- São José do Rio Preto, 2016

76 f. : il.

Orientador: Mary Massumi Itoyama

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia. 2. Espermatogênese. 3. Hemiptera. 4. Ultraestrutura (Biologia) 5. Cromatina. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 591.463.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Fernando Cesar Silva Junior

Estudo ultraestrutural da espermatogênese de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* (Heteroptera: Pentatomidae)

Dissertação apresentada 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, SP.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto - SP

Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos
UFG – Goiânia - GO

São José do Rio Preto
2016

“Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Lourdes Marques dos Santos e Fernando Cesar Silva por sempre me ajudarem e apoiarem em todos os momentos. Muito Obrigado!”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria de Lourdes Marques dos Santos e Fernando Cesar Silva e meu irmão Gabriel Marques dos Santos Silva por estarem sempre me apoiando em todas as etapas dessa caminhada, me incentivando em qualquer escolha que fizesse, e por tudo que me ensinaram em minha vida;

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde o ensino fundamental Carolina Anália Rocha Costa e Lázaro Maria da Silva Neto por estarem sempre comigo em momentos bons ou ruins. Amo vocês;

À minha família em geral por sempre se orgulharem de mim, pelas sábias palavras de incentivo e por sempre me apoiarem;

À minha orientadora, Profa. Dra. Mary Massumi Itoyama, pela oportunidade que me deu e por não só me formar como pesquisador, mas também como uma pessoa melhor;

Ao Luis Lenin Vicente Pereira por aceitar ser meu co-orientador durante a iniciação científica, pela paciência que sempre teve, por me passar todo seu conhecimento e abrir minha mente para a pesquisa de ultraestruturas;

As minhas grandes amigas e companheiras de laboratório Cecília Ártico Banho e Tatiani Seni de Souza Firmino por serem pessoas maravilhosas e estarem comigo nos momentos mais importantes, sempre me apoiando;

A todos os grandes amigos que fiz durante os anos graduação e pós-graduação, em especial Wândria Coelho, Juliana Rezende, Fernanda Fernandes, Nayara Oliveira, Keila Dantas de Moura, Bruno Luís Perissotti, Felipe Miranda Ramos, Juliana Birello, Marcelia Georgia Candido dos Santos, Danilo Machado, Renan Willian da Costa, Simone Alves Reis, Rômulo Ornelas de Oliveira Junior e Rodrigo Moraes por todas as conversas, desabafos, momentos felizes e tristes que passamos durante todo esse período. Levarei vocês para sempre em meu coração;

À minha grande amiga Emi Rosane Silistino de Souza por sempre me acompanhar e me apoiar em tudo, por me fazer rir, me fazer companhia todas as manhãs, por ser uma das melhores e mais incríveis pessoas que eu pude conhecer nesses anos todos. Muito obrigado por tudo;

*À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” –
Campus de São José do Rio Preto por me receber e possibilitar que realizasse
esse sonho;*

*A banca examinadora da qualificação Prof^ª. Dr^ª. Patricia Simone
Leite Vilamaior e Prof^ª. Dr^ª. Silvana Gisele Pegorin de Campos por todos os
conselhos dados.*

*Aos membros da banca examinadora Prof^ª. Dr^ª. Maria Tercília
Vilela de Azeredo Oliveira e Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cristina Alcântara dos Santos
por disponibilizarem seu tempo e pela contribuição preciosa ao meu trabalho;*

*Por último, mas não menos importante, agradeço aos técnicos Dra.
Rosana Silistino de Souza e Me. Luiz Roberto Faleiros (IBILCE-UNESP) e
também a Sr^ª. Maria Dolores Seabra Ferreira e Sr. José Augusto Maulin (FMRP-
USP) pela colaboração na realização das técnicas e captura das imagens, por
tudo que aprendi com vocês e por sempre me auxiliarem quando precisei;*

*Agradeço a todas as pessoas que conheci desde o cursinho até este
momento por me auxiliarem a ser uma pessoa melhor em todos os aspectos. A
todos vocês muito obrigado!*

*“Pense como uma
pessoa de ação e aja
como uma pessoa que
pensa.”*

Henri-Louis Bergson

RESUMO

Heteroptera é uma Subordem da Ordem Hemiptera, que possui cerca de 40 mil espécies distribuídas em oitenta famílias, dentre elas está a família Pentatomidae que se destaca por ser uma das maiores famílias com cerca de 4.100 espécies, representando, aproximadamente, 11% do total de espécies de Heteroptera. As espécies de Pentatomidae *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* foram estudadas nesse trabalho devido ao sua importância econômica, tendo em vista que são espécies fitófagas que causam grandes perdas em diversas culturas. Os machos das espécies foram coletados na região de São José do Rio Preto, os testículos foram fixados e posteriormente processados para análise em microscopia eletrônica de transmissão, os blocos obtidos foram trimados, cortados, contrastados e analisados com microscópio eletrônico de transmissão Leo – Zeiss, do Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP) e com o microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM - 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). As eletromicrografias das espécies estudadas apresentaram características ultraestruturais semelhantes às encontradas para diversos indivíduos de diferentes ordens, dentre essas características estão a formação do acrossomo, a partir de uma grande vesícula secretada pelo complexo de Golgi e que se localiza na região apical/lateral do núcleo. O núcleo, também, sofre transformações semelhantes às relatadas para grande parte dos insetos passando de um estado grande e esférico com a cromatina dispersa para um estado pequeno e fusiforme e com a cromatina extremamente condensada. Outra estrutura observada foi o adjunto do centríolo que se mostrou uma estrutura eletrondensa na região basal do núcleo. Também foi observada a migração das mitocôndrias para um polo celular e sua posterior fusão formando o complexo mitocondrial ou “*Nebenkern*”, que, posteriormente, se divide formando os dois derivados mitocondriais simétricos, com a presença de estruturas paracrystalinas em seu interior. O padrão de microtúbulos encontrado no axonema, para todas as

espécies, foi de 9+9+2, típico de insetos, sendo formado entre os derivados mitocondriais e acompanhado por estes ao longo de quase toda sua extensão. Morfologicamente, os derivados mitocondriais são diferentes entre *C. impicticornis*, *E. meditabunda*, *E. collaris* e *T. perditor* onde foi possível notar que os derivados de *C. impicticornis* se apresentaram grandes e arredondados, *E. meditabunda* pequenos e arredondados, *E. collaris* alongados e com extremidades arredondadas e *T. perditor* pequenos com uma extremidade arredondada e a outra angular podendo estas diferenças morfológicas serem características interessantes para futuros estudos filogenéticos ou sistemáticos para o grupo. Portanto, podemos concluir que a maioria das características analisadas é semelhante entre os insetos, com exceção da morfologia dos derivados mitocondriais que são diferentes, até mesmo, entre as espécies da família Pentatomidae.

Palavras-chave: Heteroptera. Ultraestrutura. Acrossomo. Cromatina. Derivados Mitocondriais. Axonema.

ABSTRACT

*Heteroptera is a suborder of the Hemiptera order, which has approximately 40,000 species distributed in eighty families, among them is the Pentatomidae family that stands out for being one of the largest families with approximately 4,100, representing approximately 11% of the total species of Heteroptera. The species of Pentatomidae *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* and *Thyanta perditor* were studied in this work because of their economic importance, given that they are phytophagous species that cause great losses in several crops. Males of the species were collected in the region of São José do Rio Preto, the testes were fixed and then processed for analysis by transmission electron microscopy, the obtained blocks were trimmed, cut, contrasted and analyzed with transmission electron microscope Leo - Zeiss, of the Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP) and the transmission electron microscope Jeol JEM - 100 CXII of Faculdade de Medicina of Ribeirão Preto (FMRP-USP). The species have similar ultrastructural characteristics to those found in many individuals of different orders, among these features is the acrosome formation from a large vesicle secreted by Golgi apparatus and located in the apical/lateral area of the nucleus. The nucleus also undergoes changes similar to those reported for most insects, passing of a great and spherical state with chromatin dispersed to a small and fusiform state and highly condensed chromatin. Another structure was observed the centriolar adjunct that showed electrodense structure in the basal region of the nucleus. We also observe the migration of mitochondria for the cell and its subsequent fusion was observed forming the mitochondrial complex or “Nebenkern”, which later splits to form two symmetrical mitochondrial derivatives, with the presence of paracrystalline structures inside. The pattern of microtubules found on the axonema, for all species was 9+9+2, typical of insects, being formed between the mitochondrial derivatives and accompanied by such over almost its entire length. Morphologically, the mitochondrial derivatives are different between C.*

impicticornis, *E. meditabunda*, *E. collaris* and *T. perditor* where it was possible to note that *C. impicticornis* derivatives showed large and rounded, *E. meditabunda* small and rounded, *E. collaris* elongated and rounded ends and *T. perditor* smaller with one rounded end and the other angled being able these morphological differences are interesting features for future phylogenetic or systematic studies for the group. Therefore, we can conclude that the analyzed characteristics are most similar among the insects, with the exception of the morphology of the mitochondrial derivatives which are different even among the species of the Pentatomidae family.

Keywords: Heteroptera. Ultrastructure. Acrossome. Chromatin. Mitochondrial Derivatives. Axoneme.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
1. Aspectos gerais da subordem Heteroptera	14
1.1. Aspectos Gerais da família Pentatomidae	14
2. Espermatogênese e Estudos Sobre seus Caracteres Ultraestruturais em insetos.....	16
2.1. Acrossomo	17
2.2. Transformações nucleares	18
2.3. Complexo mitocondrial e derivados mitocondriais	18
2.4. Axonema	19
II. OBJETIVOS	21
1. Objetivo geral	21
2. Objetivos específicos	21
III. CAPÍTULOS	22
Artigo I: Características Ultraestruturais da região da cabeça das espermátides de Quatro Espécies de percevejos fitófagos da Família Pentatomidae (Heteroptera).....	24
Artigo II: Análise ultraestrutural da região flagelar das espermátides de quatro espécies de percevejos fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)	43
IV. DISCUSSÃO GERAL	63
V. CONCLUSÕES	69
VI. REFERÊNCIAS	71

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais da Subordem Heteroptera

Heteroptera ou percevejos verdadeiros é uma subordem pertencente à Ordem Hemiptera, possui cerca de 40 mil espécies distribuídas em oitenta famílias e sete infra-ordens, sendo assim o maior e mais diverso grupo de insetos hemimetábolos, ou seja, com metamorfose incompleta (SCHUH; SLATER, 1995). Estes insetos possuem ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todo o globo, com exceção dos polos, e em uma faixa de altitude que varia de 0 a 4.700 m. Possuem hábitos alimentares variados podendo ser hematófagos alimentando-se do sangue de mamíferos e aves, fitófagos alimentando-se de todas as partes das plantas e predadores alimentando-se de outros insetos (SCHUH; SLATER, 1995). Como exemplos de insetos hematófagos temos *Triatoma infestans* e *T. sordida*, de fitófagos *Zicca annulata* e *Chariesterus armatus* e por fim exemplos de insetos predadores os *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* (SCHUH; SLATER, 1995).

1.1. Aspectos Gerais da Família Pentatomidae

A superfamília Pentatomoidea possui 5.907 espécies distribuídas em 1.080 gêneros e 16 famílias, dentre elas Pentatomidae, Cydnidae, Scutelleridae e Tessaratomidae, incluem 94% de todas as espécies dessa superfamília (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI 2000). Os Pentatomidae são de grande destaque por serem uma das maiores famílias com cerca de 4.100 espécies, sendo a maioria fitófagas causando, assim, grande dano às culturas de diversas espécies vegetais. Todas as espécies da família estão distribuídas em 8 subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae) e 760 gêneros. São insetos conhecidos como Marias-fedidas devido ao fato de secretarem uma substância com odor desagradável produzido nas glândulas de cheiro e secretado pelos seus ductos na região da metacoxa (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI 2000).

Assim como todos os Heteroptera descritos, os Pentatomidae apresentam cromossomos holocêntricos. Esses cromossomos não possuem centrômero definido e assim sua atividade cinética é difusa, o que contrasta com os cromossomos monocêntricos (encontrados na maioria dos animais) que possuem centrômero definido e a atividade cinética é restrita a essa região (REBAGLIATI et al. 2005). Em Heteroptera essa atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, mais especificamente, nas regiões teloméricas, sendo denominados cromossomos telocinéticos (MOTZKO; RUTHMAN, 1984; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996). Os Pentatomidae apresentam um número cromossômico que varia de 6 a 27, sendo em aproximadamente 85% das espécies o número, mais comum, de 14 cromossomos (REBAGLIATI et al., 2005), não apresentam micro-cromossomos (m-cromossomos) e o sistema cromossômico do sexo, mais comum, é o XX/XY. Uma característica intrigante em algumas espécies de Pentatomidae é a presença de lobo *harlequin*, um lobo testicular que apresenta meiose atípica (REBAGLIATI et al., 2005).

A meiose do lobo *harlequin* apresenta diversas características atípicas como a associação não específica de autossomos, uma disposição anormal dos cromossomos na placa metafásica e segregação cromossômica, além de fusão celular. Como resultado dessa divisão atípica é comum à produção de espermatozóides com número cromossômico altamente variável, o que afetará a fertilidade do indivíduo (REBAGLIATI et al., 2005).

As espécies fitófagas mais importantes economicamente pertencem às subfamílias Edessinae e Pentatominae, sendo que Pentatominae abriga a maior parte das espécies de importância econômica (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

As espécies do gênero *Edessa* são conhecidas por serem pragas principalmente de plantas da família Fabaceae como soja e ervilha, podendo também se alimentar de espécies da família Solanaceae como o tomate e a batata (PANIZZI, 1997). O gênero *Chinavia* é exclusivamente constituído de espécies fitófagas sendo *Chinavia impicticornis* conhecida por ser praga de várias culturas no Brasil, principalmente soja (PANIZZI et al., 2000). Diferentemente das outras

espécies citadas *Thyanta perditor* não é conhecida por ser praga de plantas da família Fabaceae, apesar de poder se alimentar de soja, ela ataca mais frequentemente plantas da família Poaceae como trigo, arroz e sorgo (PANIZZI, 1997).

2. Espermatogênese e Estudos Sobre seus Caracteres Ultraestruturais em insetos

A maioria dos insetos possui um par de testículos recobertos por um epitélio protetor que pode ou não ser pigmentado, sendo que cada um dos testículos possui em seu interior um número variado de folículos ou lobos separados por seu próprio epitélio que se abrem para um único ducto deferente (PHILLIPS, 1970; DALLAI, 2014). Esses lobos podem se apresentar em diferentes números e formas nos diferentes grupos de insetos, sendo em Pentatomidae mais comuns números de 3 a 7, com morfologia alongada (PHILLIPS, 1970; SOUZA, 2009).

Cada um dos lobos testiculares é dividido em inúmeros cistos que também são separados por um epitélio, nesses cistos estão contidas as células germinativas chamadas de espermatogônias, sendo que todas as espermatogônias de um cisto sofrem divisões mitóticas dando origem aos espermatócitos primários (PHILLIPS, 1970; NAME, 2008). Os espermatócitos primários passam por outras divisões mitóticas dando origem aos espermatócitos secundários que ao sofrerem meiose dão origem as espermátides que são células haploides, sendo que cada cisto possui divisões sincrônicas, ou seja, todas as células de um cisto estão no mesmo estágio de diferenciação (PHILLIPS, 1970; NAME, 2008).

Após sua formação as espermátides sofrem alterações morfofuncionais através de um processo denominado espermiogênese. Durante esse processo a espermátide inicial que é arredondada se torna gradualmente mais alongada e ocorrem transformações importantes como a formação do acrossomo, a compactação da cromatina, além da formação da cauda onde estão presentes os derivados mitocondriais e o axonema (NAME, 2008).

Os primeiros estudos de características estruturais da espermatogênese datam do início do século passado, porém ainda se utilizando de microscopia de luz (BOWEN 1920, 1922a, 1922b), entretanto com o aperfeiçoamento das técnicas para microscopia eletrônica de transmissão a partir da metade do século surgiram trabalhos com maior riqueza de detalhes sobre essas características ultraestruturais (BAWA, 1964; KESSEL, 1966; HOAGE, 1968; PHILLIPS, 1970). Os aspectos ultraestruturais da espermiogênese são particularmente importantes para análises taxonômicas e filogenéticas, trabalhos mais recentes têm como principal foco localizar características que sejam sinapomórficas para os grupos estudados como o número de microtúbulos do axonema, a presença e a quantidade de estruturas cristalinas no interior dos derivados mitocondriais, além da presença de pontes ligando o axonema aos derivados mitocondriais (ARAÚJO, 2011 e 2012; LINO-NETO; DOLDER, 2001, DALLAI et al, 2010; DALLAI, 2014).

2.1. Acrossomo

O acrossomo se origina a partir de vesículas produzidas pelo complexo de Golgi chamadas de vesículas pró-acrossomais e irá determinar o polo anterior da célula (BÁO et al., 1989) e em grande parte das espécies é uma estrutura fundamental para fecundação, pois está relacionado com a capacitação dos espermatozóides com suas enzimas removendo o mecanismo de proteção da superfície deles e, também, na digestão de barreiras que podem haver durante sua migração pelo trato reprodutor da fêmea (FAWCETT; ITO, 1965; PHILLIPS, 1970).

Durante a espermiogênese se observa o aparecimento da vesícula pró-acrossomal, localizada anteriormente ao núcleo, no espermatozoide (BÁO et al., 1989; ARAUJO et al., 2011). As enzimas acrossomais são geralmente armazenadas na forma de pró-enzimas e quando ocorre à reação acrossomal são liberadas e ativadas, participando, assim, do evento da fertilização (BACCETTI et al., 1989; TESARIK et al., 1990; GALLO et al., 1991).

2.2. Transformações nucleares

As transformações ou mudanças nucleares que ocorrem durante a espermiogênese podem ser no geral, separadas em duas etapas uma delas com a compactação da cromatina passando-se de um estado descondensado para um estado extremamente condensado onde é possível notar estágios de cromatina granulosa e posteriormente filamentosa, e também a etapa de alongamento e diminuição do diâmetro do núcleo sendo que ambas ocorrem simultaneamente (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993). Esse processo de condensação da cromatina ocorre pela substituição de histonas ricas em lisina por outras histonas ricas em arginina, sendo que as histonas ricas em arginina são produzidas no citoplasma durante a espermiogênese e posteriormente transportadas para o núcleo (PHILLIPS; 1970; BACCETTI, 1985). Já a transformação na morfologia do núcleo ocorre pela presença de inúmeros microtúbulos ao redor do núcleo podendo também serem denominados de manchete cuja função é a de auxiliar essas transformações morfológicas que ocorrem no núcleo (BACCETTI, 1985; NAME, 2010). Esses padrões de transformações nucleares são encontrados em diversas ordens de insetos como, por exemplo, Diptera, Hemiptera e Coleoptera (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993).

2.3. Complexo Mitocondrial e Derivados Mitocondriais

Uma das organelas mais estudadas são as mitocôndrias, sendo observado que durante a espermatogênese, elas assumem diferentes morfologias conforme as fases em que a célula se encontra (PHILLIPS, 1970). Durante a espermatogênese elas sofrem fusões e metamorfoses onde sua estrutura típica é modificada. Uma estrutura chamada complexo mitocondrial (também denominado de “Nebenkern”) é formada nos estágios iniciais da diferenciação (PHILLIPS, 1970; BACCETTI; AFZELIUS, 1976). Nos estágios seguintes ocorre a divisão do

complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais que no processo de alongamento dos espermatozoides irão se posicionar bilateralmente ao axonema (TOKUYASU, 1974).

Os derivados mitocondriais são preenchidos por uma estrutura de natureza proteica, por toda sua extensão, organizada em um padrão paracristalino, tendo sido observado em muitos insetos (PHILLIPS, 1970; ROSATI et al., 1976). Também chamado de cristalóide, essa estrutura é composta por uma proteína denominada “cristalomitina” (BACCETTI et al., 1977). Várias funções foram sugeridas para os derivados mitocondriais presentes nos espermatozoides, Perotti (1973) supunha que o material armazenado nos derivados mitocondriais estava relacionado na ativação e nutrição do ovócito após a fertilização, posteriormente foram propostas as funções de participação no controle e regulação da forma do movimento flagelar e no processo de estocagem e liberação de energia necessária para a motilidade flagelar, sendo essas últimas mais aceitas (PHILLIPS, 1974; TOKUYASU, 1975).

2.4. Axonema

Estudos do axonema e sua organização estrutural foram muito realizados com flagelos de espermatozóides de *Drosophila* gerando importantes contribuições (PEROTTI, 1969). O axonema se forma devido à atividade centriolar. Em insetos o axonema segue o padrão de microtúbulos de 9+2+2, sendo nove tubos acessórios circundando o padrão usual de nove duplas de microtúbulos e dois microtúbulos centrais (9+2) comum para animais de outras classes (DALLAI, 2014), embora existam algumas exceções como em alguns representantes da subordem Nematocera em que o padrão é 9+9+1 e efemérides onde o padrão encontrado é de 9+9+0 (PHILLIPS, 1970). Algumas espécies apresentam padrões aberrantes como é o caso descrito em dípteros cecidomídeos e sciarídeos que possuem padrão 13+0 (DALLAI et al., 1991). Geralmente o axonema dos insetos se encontra ancorado ao envoltório nuclear por uma estrutura ribonucleoproteica chamada de adjunto do centríolo (DALLAI, 2014), essa

estrutura é eletrodensa e achatada, tem como principal função o ancoramento das estruturas flagelares associadas ao núcleo (PHILLIPS, 1970).

Embora os Heteroptera, em especial Pentatomidae, tenham sido muito estudados citogeneticamente, estudos sobre características ultraestruturais ainda são escassos. Análises ultraestruturais da espermatogênese das espécies *Chinavia impicticornis*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* ainda não foram descritas na literatura e *E. meditabunda* foi descrita parcialmente por Fernandes et al (2001), mostrando assim a importância de caracterizar essas espécies.

II. OBJETIVOS

1. Objetivos gerais

Devido à grande importância do processo de espermatogênese para a reprodução dos animais e ao conhecimento ainda escasso de seus aspectos ultraestruturais em Heteroptera, o objetivo geral do presente trabalho foi o de caracterizar esses aspectos ultraestruturais da espermatogênese de espécies da família Pentatomidae (Heteroptera).

2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a formação do acrossomo e as transformações nucleares durante a espermiogênese de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor*;
- b) Caracterizar o complexo mitocondrial, os derivados mitocondriais e o axonema das espécies;
- c) Comparar as ultraestruturas entre as espécies e verificar diferenças morfológicas que possam ser utilizadas em futuros estudos taxonômicos e/ou filogenéticos.

III. CAPÍTULOS

Características ultraestruturais da região da cabeça das espermátides de quatro espécies de percevejos fitófagos da Família Pentatomidae (Heteroptera)

Silva Junior, FC; Silistino-Souza, ER; Pereira, LLV; Itoyama, MM

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

Fernando Cesar Silva Junior

ju_fcsj@hotmail.com

Resumo

As espécies da família Pentatomidae *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris*, e *Thyanta perditor* foram coletadas e seus testículos fixados, e posteriormente, processados para análise com o objetivo de se verificar ultraestruturalmente a formação da região da cabeça da espermátide, dado maior foco na formação do acrossomo e ao comportamento nuclear durante a espermiogênese utilizando-se de microscopia eletrônica de transmissão convencional como método dessa análise. A formação do acrossomo das espécies foi muito similar ao relatado em outros estudos para grande parte dos insetos, isto é, a partir de uma vesícula secretada pelo complexo de Golgi. O núcleo, também, sofreu transformações semelhantes às relatadas para grande parte dos insetos passando de um estado grande e esférico com a cromatina dispersa para um estado fusiforme e com a cromatina extremamente condensada. Outra estrutura observada foi o adjunto do centríolo que se mostrou uma estrutura eletrondensa na região basal do núcleo. As estruturas analisadas, no presente trabalho, se mostraram extremamente semelhantes entre as espécies analisadas o que mostra que seus estudos morfológicos podem não ser uma boa ferramenta para estudos filogenéticos ou sistemáticos dentro de Heteroptera.

Palavras Chave: Ultraestruturas, acrossomo, cromatina.

Introdução

Os Heteroptera são a maior subordem de insetos hemimetábolos, ou seja, com desenvolvimento indireto, possuindo cerca de 40 mil espécies (SCHUH; SLATER 1995). Dentre os Heteroptera a família Pentatomidae se destaca por ser uma das maiores famílias com cerca de 4.100 espécies, sendo a maioria fitófagas causando, assim, grandes danos às culturas de diversas espécies vegetais (SCHAEFER; PANIZZI 2000), podendo causar sérios riscos econômicos. Segundo Panizzi (1997, 2000) as espécies dos gêneros *Edessa* e *Chinavia* são conhecidas por serem pragas principalmente de plantas da família Fabaceae como soja e ervilha, podendo também se alimentar de espécies da família Solanaceae como o tomate e a batata, já o gênero *Thyanta* se alimenta mais frequentemente de plantas da família Gramineae como trigo, arroz e sorgo.

Após a metade do século XX com a evolução da microscopia eletrônica os estudos relacionados aos aspectos ultraestruturais da espermatogênese de insetos começaram a ser realizados com grande frequência como o trabalho de Phillips (1970) onde ele apresenta uma revisão com cerca de 200 espécies de insetos para elucidar ultraestruturalmente as transformações que ocorrem nas espermátides durante a espermiogênese, e o de Tokuyasu (1974) com estudos dos derivados mitocondriais e do axonema em *Drosophila melanogaster*. A região da cabeça das espermátides e espermatozoides foi muito estudada dando-se ênfase a formação do acrossomo e ao comportamento nuclear durante a espermiogênese devido à grande importância desses processos (FAWCETT; ITO, 1965; PHILLIPS, 1970; BÁO; HAMÚ, 1993). O acrossomo é descrito, na maioria das espécies, como uma organela fundamental para fecundação (PHILLIPS 1970), pois está relacionado com a capacitação dos espermatozoides, pois possuem enzimas que removem o mecanismo de proteção da superfície deles e, também, digerem barreiras que pode haver durante sua migração pelo trato reprodutor da fêmea (FAWCETT; ITO, 1965; PHILLIPS, 1970). Já a compactação do núcleo ocorre passando-se a cromatina de um estado descondensado para um estado extremamente condensado passando por estágios de cromatina granulosa e

posteriormente filamentosa, além do alongamento e diminuição do diâmetro do núcleo (PHILLIPS, 1970; BÁO; HAMÚ, 1993).

Embora os Pentatomidae tenham sido muito estudados citogeneticamente e morfológicamente, as características ultraestruturais, da maioria das espécies, permanecem desconhecidas. Portanto o objetivo do estudo foi o de descrever as ultraestruturas da região da cabeça das espermátides de *Edessa meditabunda*, *E. collaris*, *Chinavia impicticornis* e *Thyanta perditor*.

Material e métodos

Os machos das espécies *Edessa meditabunda*, *E. collaris*, *Chinavia impicticornis* e *Thyanta perditor* pertencentes à família Pentatomidae, foram coletados em São José do Rio Preto – SP (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W). Para a dissecação os indivíduos foram colocados em geladeira por alguns minutos para entrarem em estado de letargia. Com auxílio de microscópio estereoscópico e estiletos o abdome dos espécimes foi cortado longitudinalmente e os testículos, que se localizam na região posterior do abdome, foram extraídos e fixados imediatamente em solução de Karnovsky por aproximadamente 24 horas.

Para o processamento para microscopia eletrônica de transmissão os testículos foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig, em seguida, pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 1%: Millonig (1:3) por 2 horas em geladeira. O material foi lavado rapidamente em água bidestilada e desidratado em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de acetona de 70 à 100%. Após esse procedimento foi feita a pré-infiltração em araldite:acetona (1:1), *overnight*, em temperatura ambiente. Posteriormente foi feita infiltração em araldite por 2 horas a 37°C, em seguida a inclusão do material em araldite por 48 horas a 60°C. Após a realização da trimagem dos blocos e de cortes semifinos, por onde foram localizadas as melhores regiões de cortes do bloco, foram realizados cortes ultrafinos em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT.

Esses cortes 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 M, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão Leo – Zeiss, do Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP) e com o microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM - 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Resultados

As eletromicrografias das células testiculares de *Chinavia impicticornis*, *Edessa collaris*, *Edessa meditabunda* e *Thyanta perditor* não apresentaram diferenças entre si se apresentando em um padrão semelhante ao de outros insetos, portanto, foi possível observar em todas as espécies estudadas que no início da espermiogênese as cisternas do complexo de Golgi muito desenvolvidas (Figura 1a-c), e uma grande vesícula sendo formada na sua face trans através da fusão de inúmeras vesículas menores (Figuras 1d e 2), sendo denominada de granulo ou vesícula pró acrossomal (Figuras 2 e 3a). Essa vesícula se localiza primeiramente na região posterior do núcleo e se mostra eletrólucida. Após contato com o núcleo se desloca para a região anterior do mesmo (Figura 3b,c). É possível observar que essa vesícula começa a sofrer alterações morfológicas se tornando côncava e mais eletrondensa revestindo por completo a região antero-lateral do núcleo (Figuras 3d e 4). Ao final da diferenciação essa vesícula dará origem ao acrossomo localizado na região anterior do núcleo (Figura 4c,d).

Simultaneamente à formação do acrossomo ocorre à compactação da cromatina no núcleo das células durante a espermiogênese. Após a divisão meiótica a cromatina começa a se tornar granulosa (Figura 5a,b). Esses grânulos começam a se concentrar por toda a periferia do núcleo e também é possível observar o achatamento do núcleo durante o processo (Figuras 5c,d e 6a,b), após essa fase de granulação a cromatina começa a se apresentar em forma filamentosa ocupando todo o espaço interno do núcleo, além de ocorrer a diminuição do

diâmetro do núcleo (Figura 6c,d). Também, da periferia para o centro é possível observar outra fase de compactação e alongamento onde as fibras de cromatina começam a se alinhar (Figura 7a,b), até se tornarem uma única estrutura e extremamente eletrondensa preenchendo todo núcleo (Figura 7c,d).

Outra estrutura que é formada durante a espermiogênese que pode ser observada foi o adjunto do centríolo, uma pequena estrutura eletrondensa que se localiza no polo posterior do núcleo (Figura 8a) sendo responsável pelo acoplamento do axonema e dos derivados mitocondriais ao núcleo (Figura 8b). Também foi possível observar que todas as transformações citadas anteriormente, além do surgimento e alongamento da cauda, ocorrem simultaneamente (Figura 8c).

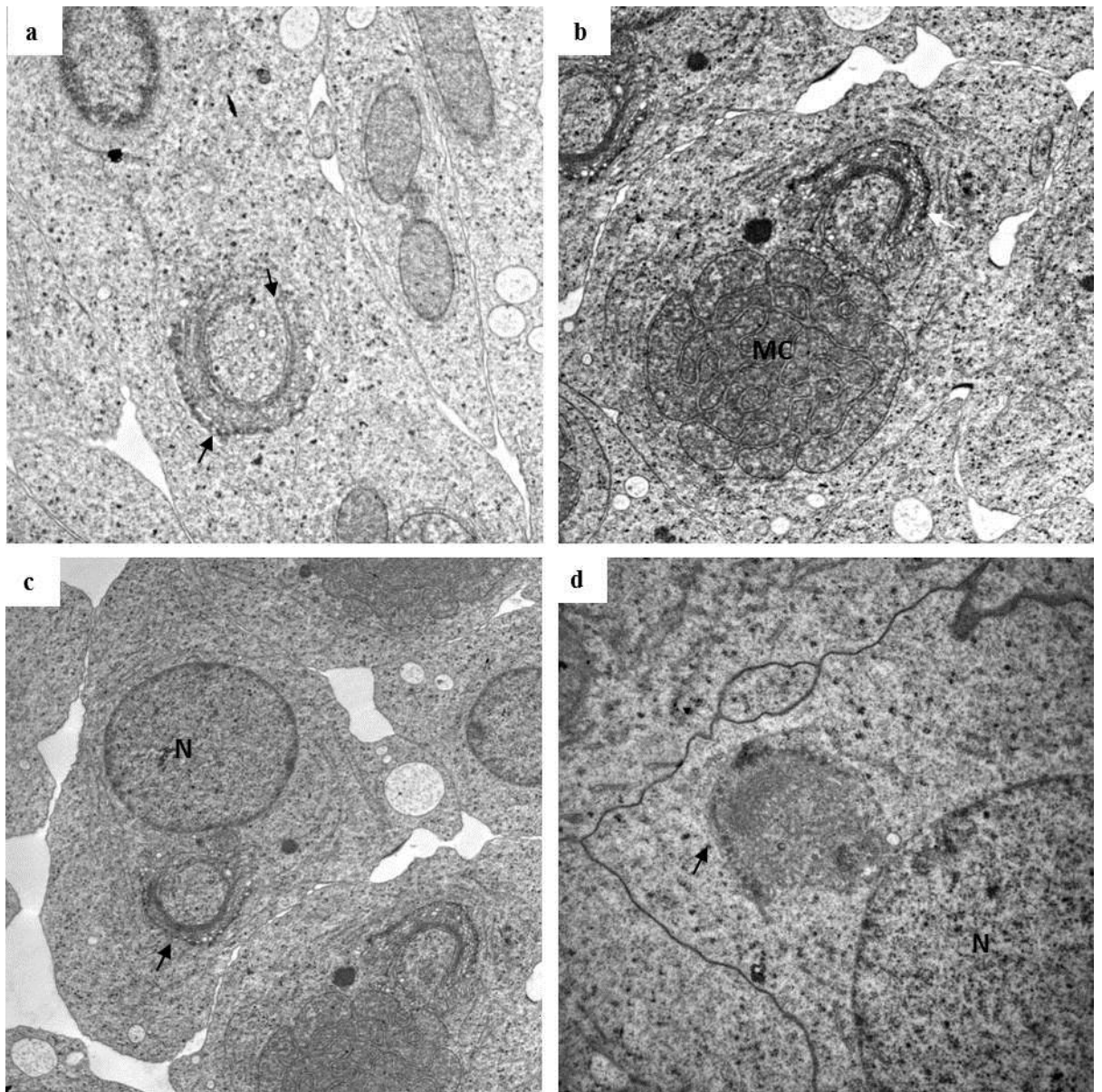


Figura 1. Eletromicrografias das espermatídes de *Chinavia impicticornis* (a-c), *Edessa meditabunda* (d). **a-d)** Grande desenvolvimento do complexo de Golgi com sua face trans (côncava) voltada para o núcleo. Núcleo (N), Complexo mitocondrial (MC) e Cisternas do complexo de Golgi (setas). Aumentos: 10000x (a-c), 27000x (d).

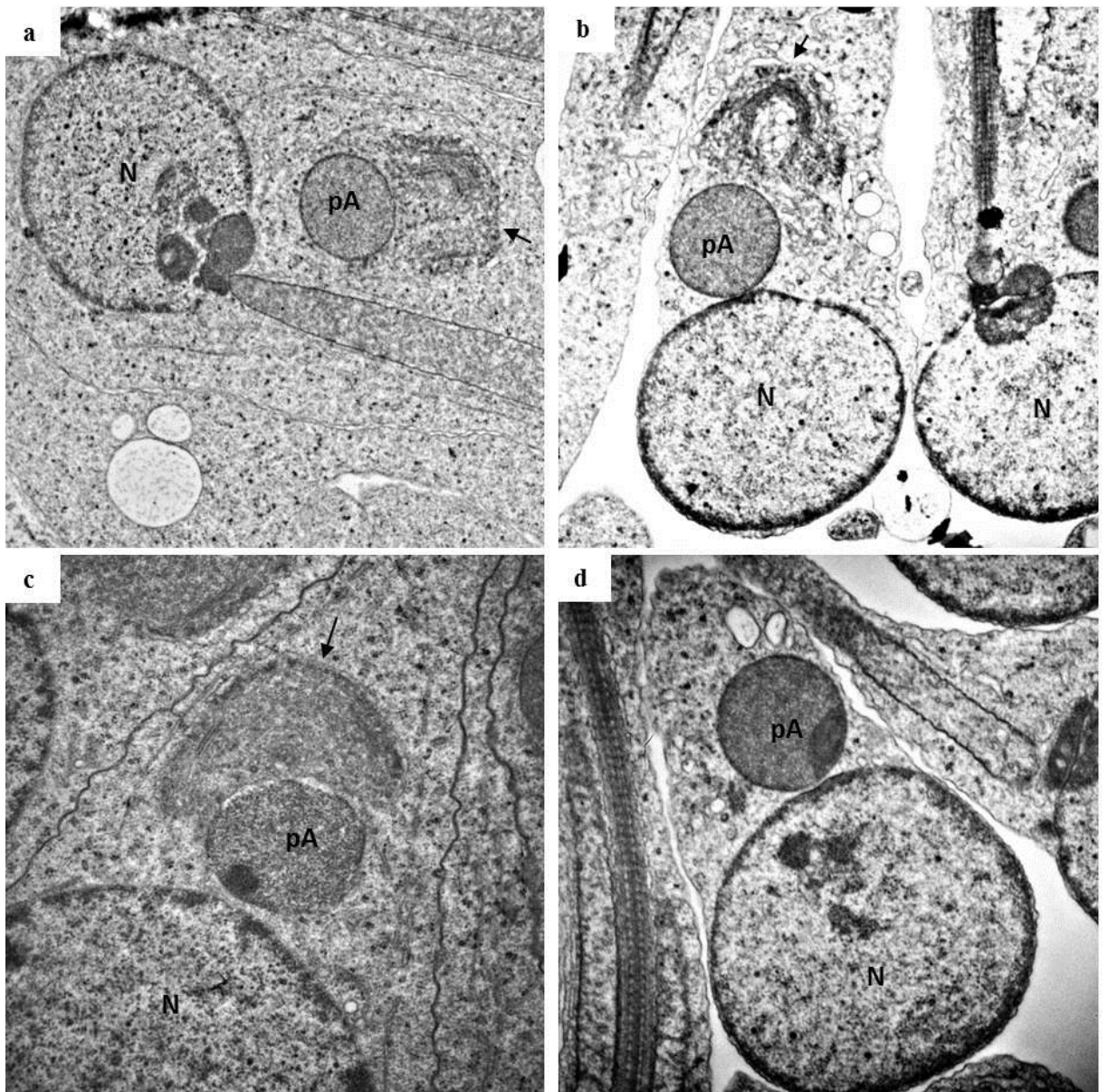


Figura 2. Eletromicrografias das espermátides de *Chinavia impicticornis* (a), *Edessa meditabunda* (c) e *Thyanta perditor* (b, d). **a-d)** Formação da vesícula pró acrossomal e sua aproximação do núcleo. Núcleo (N), Vesícula pró acrossomal (pA) e Complexo de Golgi (setas). Aumentos: 10000x (a,b), 27000x (c), 16700x (d).

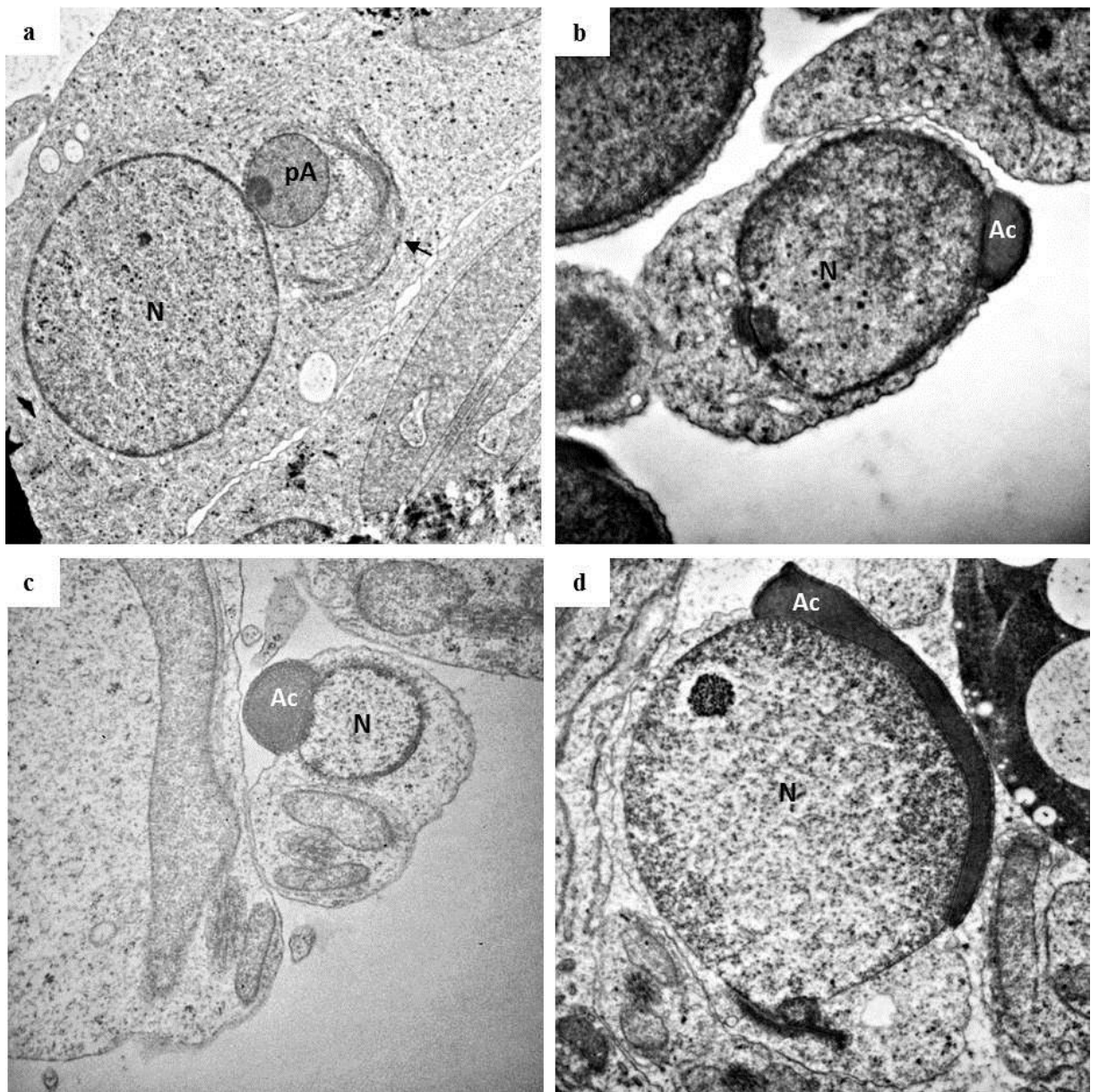


Figura 3. Eletromicrografias das espermátides de *Chinavia impicticornis* (a), *Edessa collaris* (c, d) e *Thyanta perditor* (b). **a)** Vesícula pró acrossomal em contato com a envoltório nuclear; **b-d)** Transformação da vesícula pró acrossomal em acrossomo. Núcleo (N), Vesícula pró acrossomal (pA), Complexo de Golgi (Setas), Acrossomo (Ac). Aumentos: 10000x (a), 16700x (b), 27000x (c), 16700x (d).

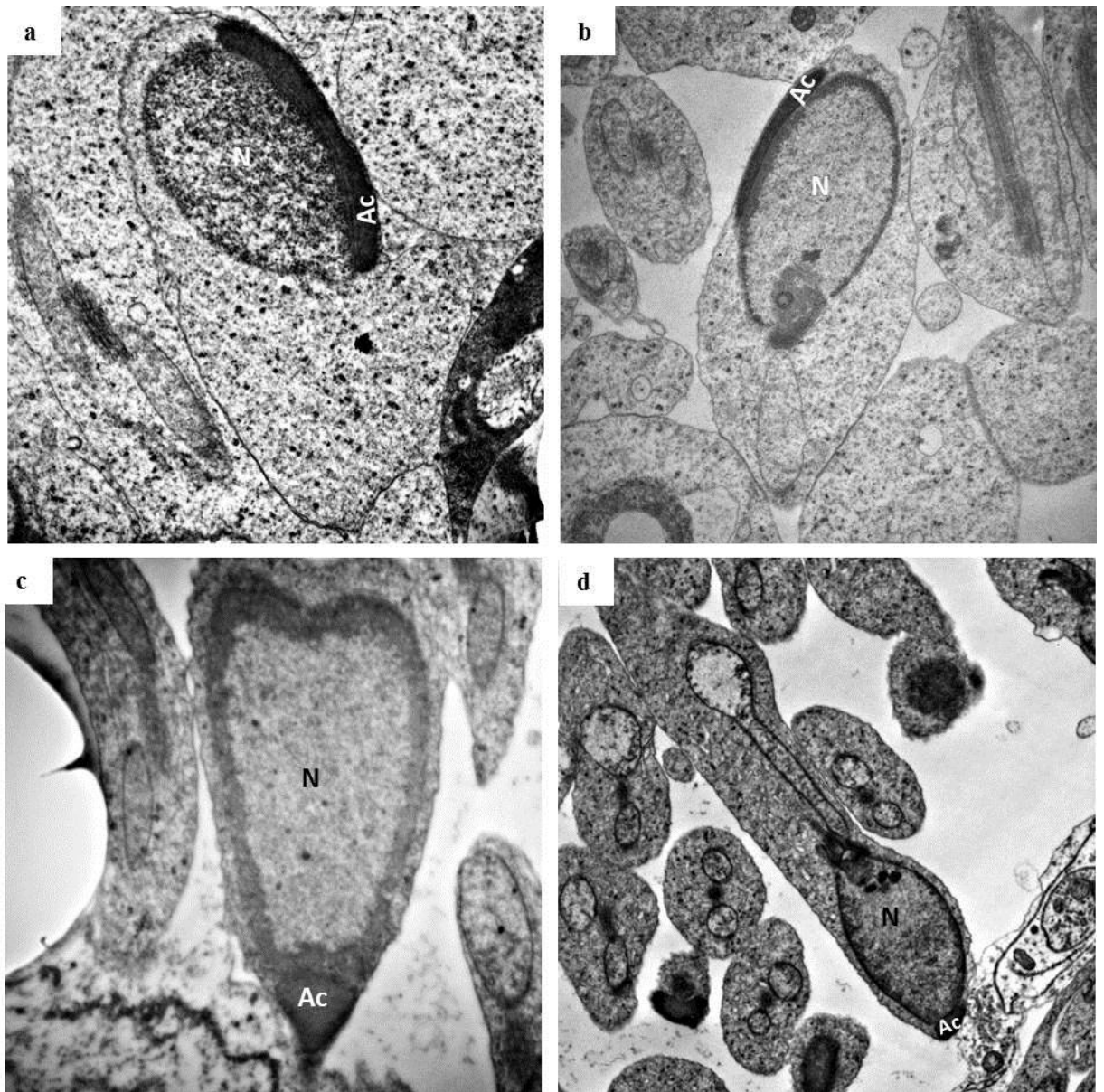


Figura 4. Eletromicrografias das espermatídes de *Chinavia impicticornis* (b, c), *Edessa collaris* (a) e *Thyanta perditor* (d). **a, b)** Acrossomo posicionado na região lateral do núcleo; **c, d)** Acrossomo na região apical do núcleo. Núcleo (N), Acrossomo (Ac). Aumentos: 10000x (a), 14000x (b), 27000x (c), 16700x (d).

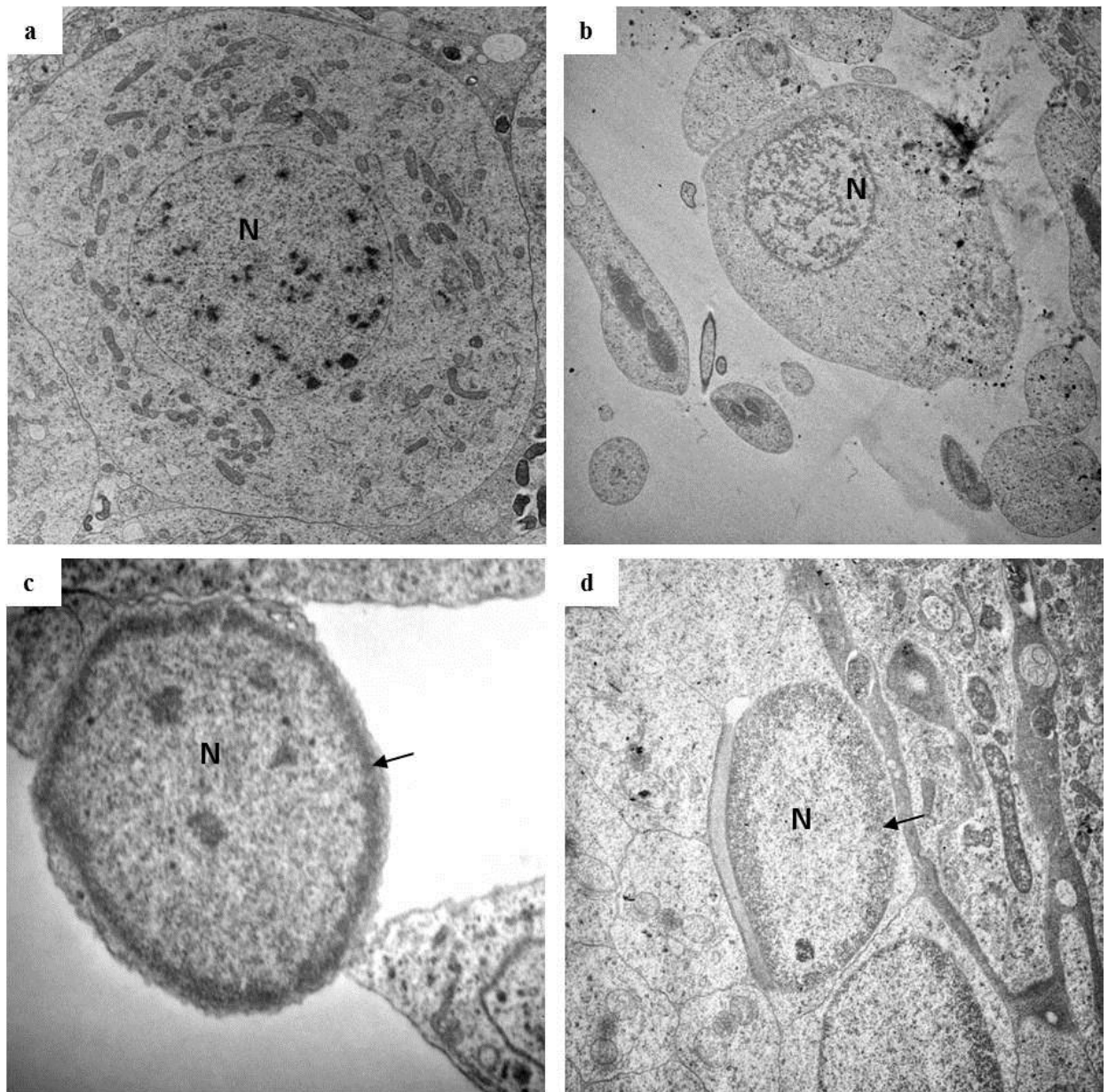


Figura 5. Eletromicrografias das espermatídes de *Chinavia impicticornis* (c), *Edessa collaris* (a, b) e *Edessa mediatubunda* (d). **a, b)** Cromatina se tornando granulosa no interior do núcleo; **c, d)** Cromatina granulosa se acumula na periferia do núcleo (setas). Aumentos: 10000x (a), 6000x (b), 27000x (c), 14000x (d).

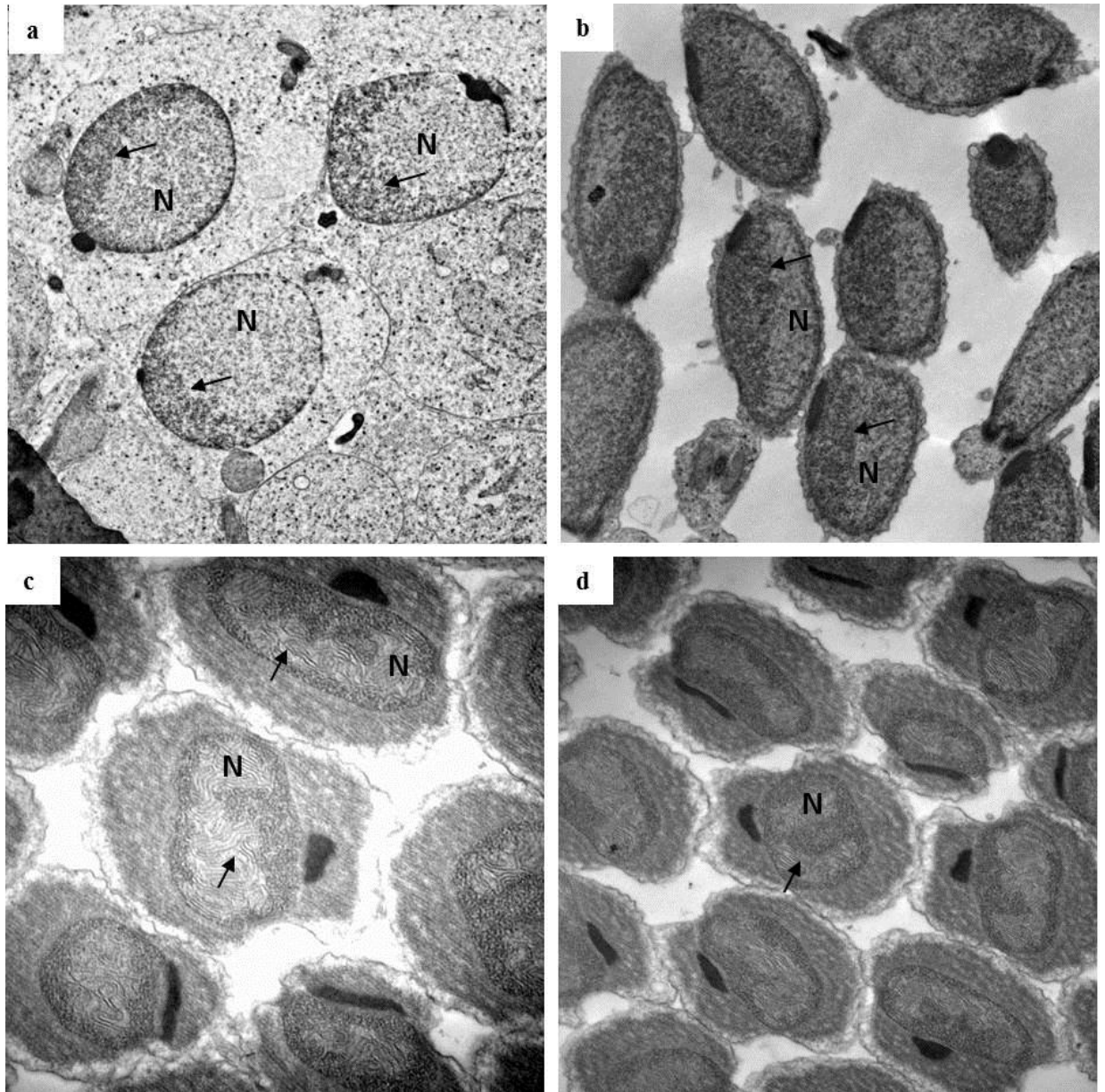


Figura 6. Eletromicrografias das espermatídes de *Edessa collaris*. **a, b)** Cromatina granulosa começa a ocupar grande parte do núcleo; **c, d)** Cromatina se torna fibrilar dando início a segunda etapa da condensação. Núcleo (N), Cromatina (setas). Aumentos: 10000x (a, b e d), 14000x (c).

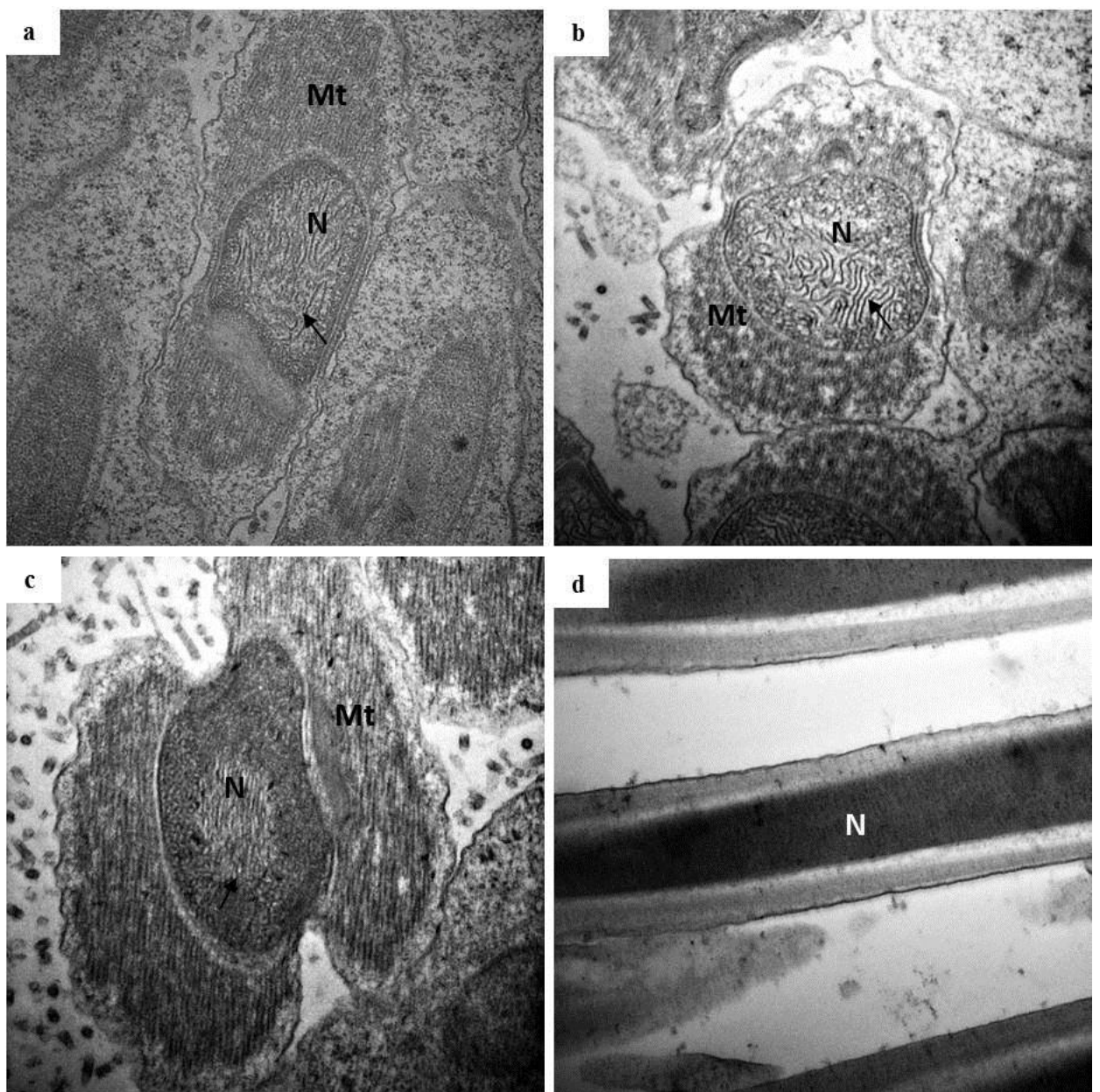


Figura 7. Eletromicrografias das espermátides de *Edessa mediatubunda* (a-c) e *Thyanta perditor* (d). **a-c)** Cromatina se tornando mais condensada; **d)** Núcleo fusiforme com a cromatina completamente condensada. Núcleo (N), Microtúbulos (Mt), Cromatina (setas). Aumentos: 14000x (a), 16700x (b, c), 27000x (d).

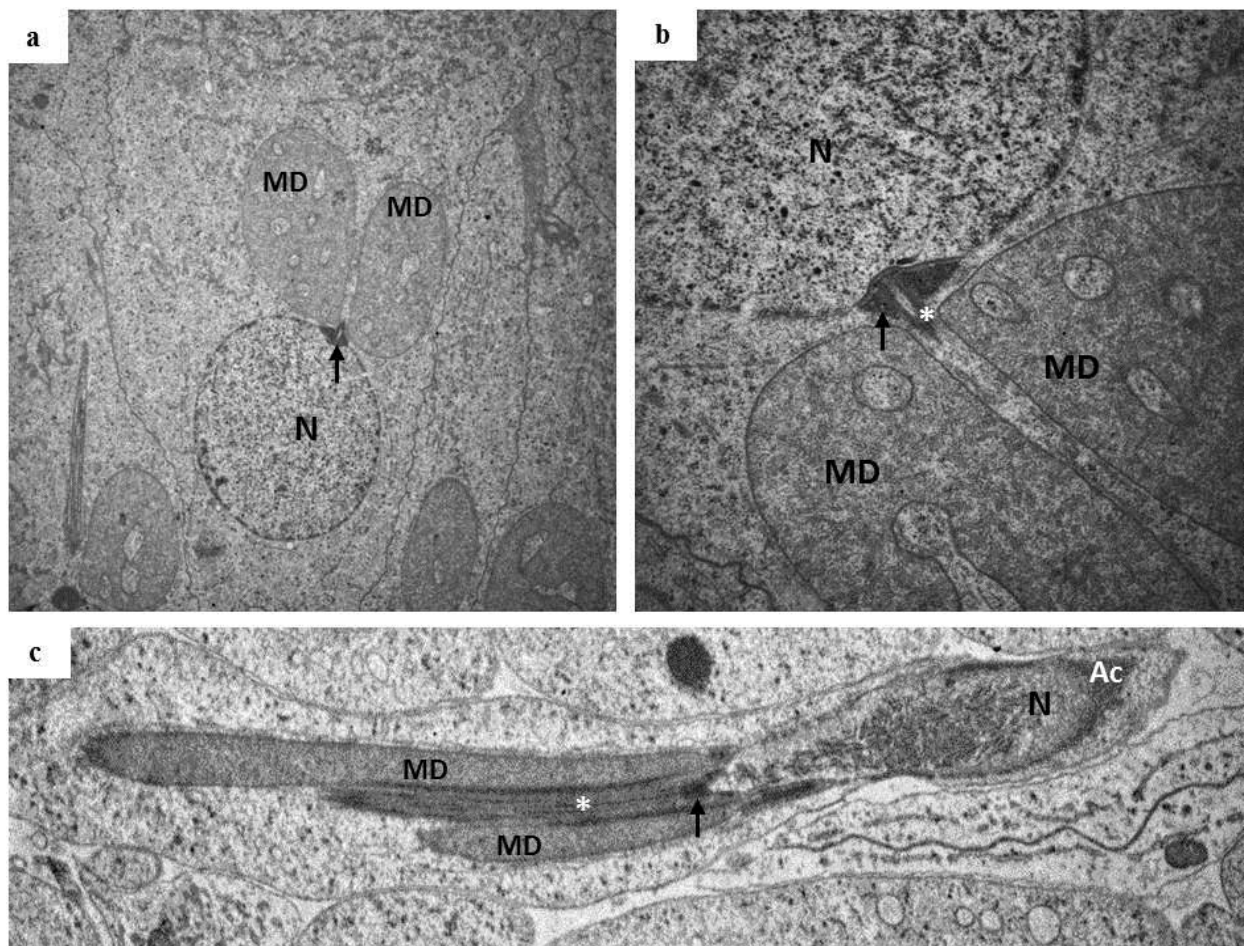


Figura 8. Eletromicrografias das espermatídes de *Edessa mediatubunda* (a, b) e *Thyanta perditor* (c). **a, b)** Adjunto do centríolo se forma na região posterior do núcleo onde o axonema irá se originar; **c)** Visão geral do alongamento da espermatíde mostrando o acrossomo na região apical, o núcleo em processo de condensação, adjunto do centríolo, axonema e derivados mitocondriais. Adjunto do centríolo (setas), Axonema (asterisco), Núcleo (N), Acrossomo (Ac) e Derivados Mitocondriais (MD). Aumentos: 8000x (a), 27000x (b), 8000x (c).

Discussão

A formação do acrossomo de *Chinavia impicticornis*, *Edessa mediatubunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* ocorre de maneira similar a da maioria dos insetos, onde ocorre um grande desenvolvimento do complexo de Golgi que produz pequenas vesículas, na sua face trans, que irão se fundir formando a vesícula pró acrossomal. A vesícula irá se ligar ao núcleo onde sofrerá transformações que darão origem ao acrossomo, como descrito por Hoage e Kessel (1968) em *Apis mellifera*, Phillips (1970) para diversas ordens de insetos, Fernandes et al (2001) para Heteroptera da família Pentatomidae, e por Name et al (2012) em três espécies de Diptera, sendo a sua formação essencial para que ocorra a penetração do espermatozoide no ovócito (HOAGE; KESSEL, 1968; PHILLIPS, 1970; NAME et al, 2012). Phillips (1970) relatou uma exceção para a formação do acrossomo para membros do gênero *Conocephalus* pertencente à ordem Orthoptera em que a vesícula é formada na face cis do complexo de Golgi. Em sua forma final o acrossomo pode se mostrar simples sem nenhuma estrutura auxiliar como encontrado em alguns Diptera por Name (2008) e Name et al (2012) ou o acrossomo pode conter estruturas de inserção como o *perforatorium* como encontrado em alguns Hymenoptera como *Bephratelloides pomorum* por Lino-Neto et al (1999). O acrossomo das espécies estudadas se mostrou de maneira simples e localizado em uma depressão apical/lateral do núcleo se apresentando como uma estrutura uniforme e eletrondensa.

Durante o processo de formação do acrossomo ocorre simultaneamente a compactação da cromatina e a transformação do núcleo onde a cromatina se torna primeiramente granular e, posteriormente, filamentosa até se tornar uma estrutura intensamente eletrondensa, ao mesmo tempo em que o núcleo se torna mais fusiforme e pequeno (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993), processo esse semelhante ao descrito para diversas ordens como Hemiptera e Orthoptera por Phillips (1970), duas espécies de Coleoptera por Bão e Hamú (1993), Diptera por Tokuyasu (1974) e Name (2008) e em Heteroptera por Fernandes et al (2001). O processo de condensação da cromatina

ocorre pela substituição de histonas ricas em lisina por histonas ricas em arginina, sendo essas histonas ricas em arginina produzidas no citoplasma durante a espermiogênese e, posteriormente, transportadas para o núcleo (PHILLIPS; 1970; BACCETTI, 1985). Nas espécies do presente estudo a condensação da cromatina ocorreu de maneira similar a da maioria dos insetos. Também foi possível observar a presença de inúmeros microtúbulos ao redor do núcleo que também são chamados de manchete cuja função é a de auxiliar as transformações morfológicas do núcleo, sendo esses microtúbulos encontrados em diversas espécies (BACCETTI, 1985; NAME, 2008).

Outra estrutura que foi possível observar na região da cabeça da espermátide das espécies analisadas no presente trabalho foi o adjunto do centríolo, uma estrutura eletrondensa, que se localiza na região posterior do núcleo sendo encontrado em diversas espécies de insetos (PHILLIPS, 1970). O adjunto do centríolo é composto por ribonucleoproteínas oriundas do núcleo ou da degradação de ribossomos presentes no citoplasma (PHILLIPS, 1970, BACCETTI, 1972; NAME, 2008) cuja função sugerida pode ser a ancoragem do flagelo como sugerido por Baccetti (1972) ou a nutrição para o processo de formação do axonema como mostrado em Orthoptera por Yasuzumi et al (1970).

As espécies de *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* estudadas neste trabalho apresentaram diversas semelhanças com a maioria dos insetos estudados até o momento em relação à formação e morfologia das ultraestruturas citadas anteriormente. Porém nenhuma das estruturas estudadas apresentou diferenças inter ou intraespecíficas o que mostra que o estudo morfológico dessas estruturas não são eficientes para uso taxonômico ou filogenético. Ainda assim para uma compreensão mais ampla dos aspectos ultraestruturais de Heteroptera e para elucidar esses aspectos em grande parte dessa subordem novos estudos deverão ser realizados.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo nº 2013/19864-5), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelos apoios financeiros.

Referências Bibliográficas

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. **Adv. Insect. Physiol.**, 9: 315-397, 1972.

BACCETTI, BACCIO. **Evolution of the sperm cell**. 1985.

BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P.; RENIERI, T.; SENSINI, C. Localization of acrosomal enzymes in Arthropoda, Echinodermata and Vertebrata. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 21 p. 385-389, 1989.

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

BÁO, S. N.; HAMÚ, C. Nuclear changes during spermiogenesis in two chrysomelid beetles. **Tissue and Cell**, v. 25, n. 3, p. 439-445, 1993.

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. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue & Cell**, v. 33 n. 3 p. 286-293, 2001.

GALLO, J.; ESCALIER, D.; GRELLIER, P.; PRECIGOUT, E.; ALBERT, M.; DAVID, G.; SCHREVEL, J. Characterization of a monoclonal antibody to human proacrosin and its use in acrosomal status evaluation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39 p. 273-282, 1991.

HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 1, p. 6-32, 1968.

LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 28, n. 4, p. 253-259, 1999.

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.

NAME, K. P. O. Análise morfológica das espermátides e espermatozoides de *Crhysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Brasília. 2008.

PANIZZI, A. R. WILD HOSTS OF PENTATOMIDS: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops. **Annu. Rev. Entomol.** v. 42 p. 99–122, 1997.

PANIZZI, A. R.; J. E. McPHERSON; D. G. JAMES; M. JAVAHERY & R. M. McPHERSON. 2000. Stink bugs (Pentatomidae), p. 421–474. In: C. W. Schaefer & A. R. Panizzi (eds.), **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton. CRC Press. p. 828

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

SCHAEFER, W. C.; PANIZZI, A. R. Heteroptera of Economic importance. Boca Raton, FL: **CRC Press**, LLC, 824p. 2000.

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

TESARIK, J.; DRAHORAD, J.; TESTART, J.; MENDONZA, C. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. **Development**, v. 110 p. 391-400, 1990.

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*: IV. Nuclear transformation. **Journal of ultrastructure research**, v. 48, n. 2, p. 284-303, 1974.

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

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

YASUZUMI, G., SUGIOKA, T., TSUBO, I., MATANO, Y. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 109, n. 4, p. 450-464, 1970.

Análise ultraestrutural da região flagelar das espermatídes de quatro espécies de percevejos fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)

Silva Junior, FC; Silistino-Souza, ER; Pereira, LLV; Itoyama, MM

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

Fernando Cesar Silva Junior

ju_fcsj@hotmail.com

Resumo

Heteroptera é uma Subordem da Ordem Hemiptera, que possui cerca de 40 mil espécies distribuídas em oitenta famílias, dentre elas está a família Pentatomidae que se destaca por ser uma das maiores famílias com cerca de 4.110 espécies, representando, aproximadamente, 11% do total de espécies de Heteroptera. As espécies de Pentatomidae *Edessa mediatubunda*, *E. collaris*, *Chinavia impicticornis* e *Thyanta perditor* foram estudadas nesse trabalho devido ao sua importância econômica, tendo em vista que são espécies fitófagas que causam grandes perdas em diversas culturas. As espécies estudadas foram coletadas na região de São José do Rio Preto e os espécimes machos tiveram seus testículos extraídos e fixados, além de posteriormente serem processados para análise em microscopia eletrônica de transmissão convencional. Os indivíduos apresentaram características ultraestruturais semelhantes as encontradas para diversos indivíduos de diferentes ordens, dentre essas características estão a presença de dois derivados mitocondriais simétricos, presença de estruturas paracristalinas em seu interior, além de axonema no padrão de microtúbulos de 9+9+2 típico de insetos. Morfologicamente, os derivados mitocondriais são diferentes entre *E. mediatubunda*, *E. collaris*, *C. impicticornis* e *T. perditor* podendo esta ser uma característica interessante para futuros estudos filogenéticos ou sistemáticos para o grupo.

Palavras Chave: Ultraestruturas, derivados mitocondriais, axonema.

Introdução

Heteroptera ou percevejos verdadeiros é uma subordem da Ordem Hemiptera, que possui cerca de 40 mil espécies distribuídas em oitenta famílias e sete infra-ordens, sendo assim o maior e mais diverso grupo de insetos com metamorfose incompleta (SCHUH e SLATER, 1995). Dentre os Heteroptera a família Pentatomidae se destaca por ser uma das maiores famílias com cerca de 4.112, representando, aproximadamente, 11% do total de espécies de Heteroptera (SCHUH e SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI 2000). A maioria desses indivíduos são fitófagos causando, assim, grandes danos às culturas de diversas espécies vegetais (SCHAEFER; PANIZZI 2000), podendo causar sérios riscos econômicos. Segundo Panizzi (1997, 2000) as espécies dos gêneros *Edessa* e *Chinavia* são conhecidas por serem pragas, principalmente, de plantas da família Fabaceae, como soja e ervilha, podendo também se alimentar de espécies da família Solanaceae, como o tomate e a batata. Já o gênero *Thyanta* se alimenta mais frequentemente de plantas da família Gramineae como trigo, arroz e sorgo.

Apesar da enorme importância da subordem Heteroptera, os trabalhos sobre sua ultraestrutura das células espermatogoniais ainda são escassos e restritos a poucas espécies como as descritas por Bao e De Souza (1994) e Araújo et al (2011 e 2012), respectivamente, famílias Reduviidae, Pentatomidae e Largidae. Os primeiros estudos das características estruturais datam do início do século passado, porém ainda utilizando-se de microscopia de luz (BOWEN 1920, 1922a, 1922b), entretanto com o aperfeiçoamento das técnicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) surgiram trabalhos com maior riqueza de detalhes sobre essas características ultraestruturais (BAWA, 1964; KESSEL, 1966; HOAGE, 1968; PHILLIPS, 1970). Trabalhos mais recentes têm como foco localizar características que sejam sinapomórficas para os grupos estudados como o número de microtúbulos do axonema, a presença de pontes entre o axonema e

os derivados mitocondriais, a presença e a quantidade de estruturas cristalinas no interior dos derivados mitocondriais (ARAÚJO, 2011; ARAÚJO, 2012; LINO-NETO; DOLDER, 2001; DALLAI et al, 2010; DALLAI, 2014).

Neste estudo foi analisada e descrita ultraestruturalmente a formação região flagelar durante a espermatogênese de *Edessa meditabunda*, *E. collaris*, *Chinavia impicticornis* e *Thyanta perditor* pertencentes a família Pentatomidae, mostrando características que possam ser usadas em futuros estudos filogenéticos para a subordem Heteroptera.

Material e métodos

Os machos das espécies *Edessa meditabunda*, *E. collaris*, *Chinavia impicticornis* e *Thyanta perditor* pertencentes à família Pentatomidae, foram coletados em São José do Rio Preto – SP (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W). Para a dissecação os indivíduos foram colocados em geladeira por alguns minutos para entrarem em estado de letargia. Com auxílio de microscópio estereoscópico e estiletos o abdome dos espécimes foi cortado longitudinalmente e os testículos, que se localizam na região posterior do abdome, foram extraídos e fixados imediatamente em solução de Karnovsky por cerca de 24 horas.

Para o processamento para microscopia eletrônica de transmissão os testículos foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig, em seguida, pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 1%: Millonig (1:3) por 2 horas em geladeira. O material foi lavado rapidamente em água bidestilada e desidratado em uma sequência de soluções com concentrações crescentes de acetona de 70 a 100% de concentração. Após esse procedimento foi feita a pré-infiltração em araldite:acetona (1:1), *overnight*, em temperatura ambiente. Posteriormente foi feita infiltração em araldite por 2 horas a 37°C, em seguida a inclusão do material em araldite por 72 horas a 60°C. Após a verificação da melhor região a ser cortada foram realizados cortes ultrafinos, em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT.

Esses cortes 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 1M, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas com o microscópio eletrônico de transmissão Leo – Zeiss, do Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP) e no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM- 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Resultados

A análise das células de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor*, permitiu visualizar que no início da espermatogênese as espermátides possuem formas arredondadas e grande quantidade de mitocôndrias de tamanhos e formas variadas e que estão distribuídas por todo o citoplasma (Figura 1a,b). Posteriormente, essas mitocôndrias, começam a se deslocar para um dos polos da célula (Figura 1c).

Após o deslocamento das mitocôndrias para um dos polos, elas começam a sofrer inúmeras fusões (Figura 1d) até formar uma única estrutura denominada de complexo mitocondrial ou “Nebenkern” com várias membranas internas (Figuras 1d e 2a,b). Posteriormente, o complexo mitocondrial começa a perder essas membranas internas, tornando-se uma estrutura uniforme. Durante esse processo algumas porções do citoplasma podem ficar presas no interior do complexo mitocondrial (Figura 2b-d).

Durante o alongamento das espermátides, esse complexo mitocondrial começa a se dividir formando dois derivados mitocondriais esféricos, que são observados próximos e paralelos entre si (Figura 2c). Ao final da divisão observam-se os derivados mitocondriais ao redor do axonema, ainda com a presença de vesículas com material citoplasmático (Figura 2d). Após a divisão do complexo mitocondrial em derivados mitocondriais, o citoplasma que estava retido dentro da estrutura é condensado em uma vesícula localizada no centro de cada derivado (Figura 3a,b). Essa vesícula é, posteriormente, expelida.

Com o desenvolvimento, os derivados mitocondriais vão diminuindo de tamanho, perdendo sua conformação esférica e se tornando mais eletrondensos (Figuras 3b-d e 4a-d). Nesta fase é possível observar microtúbulos posicionados ao redor dos derivados mitocondriais (Figura 4a-d) e uma membrana que envolve os derivados mitocondriais e o axonema (Figura 5a-d). Nas etapas finais da diferenciação das espermátides essa membrana regride formando duas pontes que parecem conectar o axonema aos derivados mitocondriais (Figura 7b). No interior dos derivados mitocondriais ocorre a formação de uma estrutura mais elétrondensa que o restante da ultraestrutura chamada de estrutura paracristalina ou cristalóide (Figura 5d).

Todos os derivados mitocondriais, da mesma espécie, apresentaram morfologias semelhantes entre si, porém entre as espécies estudadas houve diferenças morfológicas (Figura 4a-d) como os derivados de *C. impicticornis* (Figura 4a) que se mostram grandes e arredondados, *E. meditabunda* (Figura 4b) que são pequenos e arredondados, *E. collaris* (Figura 4c) que possui os derivados alongados e com extremidades arredondadas e *T. perditor* (Figura 4d) onde seus derivados se mostram mais curtos e com uma extremidade arredondada e a outra angular.

Na Figura 6 podemos observar cortes transversais da região flagelar, mediana e final da espermátide na qual podemos observar que os derivados mitocondriais estão por toda a extensão da cauda, acompanhando o axonema que está entre os derivados. Próximos à região flagelar os derivados são maiores, podendo ser observados que os dois estão próximos (Figura 6a), na região mediana os derivados já são menores e deslocados uns dos outros (Figura 6b,c) e no final da cauda os derivados são bem menores do que os observados nas regiões anteriores (Figura 6d), portanto diminuindo progressivamente até a região da cauda.

Simultaneamente à formação dos derivados mitocondriais, ocorre o início da formação do axonema (Figuras 2d e 3a-d), e em uma etapa posterior ocorre a formação de uma membrana que o envolve por completo (Figura 5b-d). Com relação ao padrão de organização do axonema as quatro espécies de

Pentatomidae estudadas apresentaram o padrão 9+9+2 sendo um par de microtúbulos centrais, nove pares de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (Figura 7a,b).

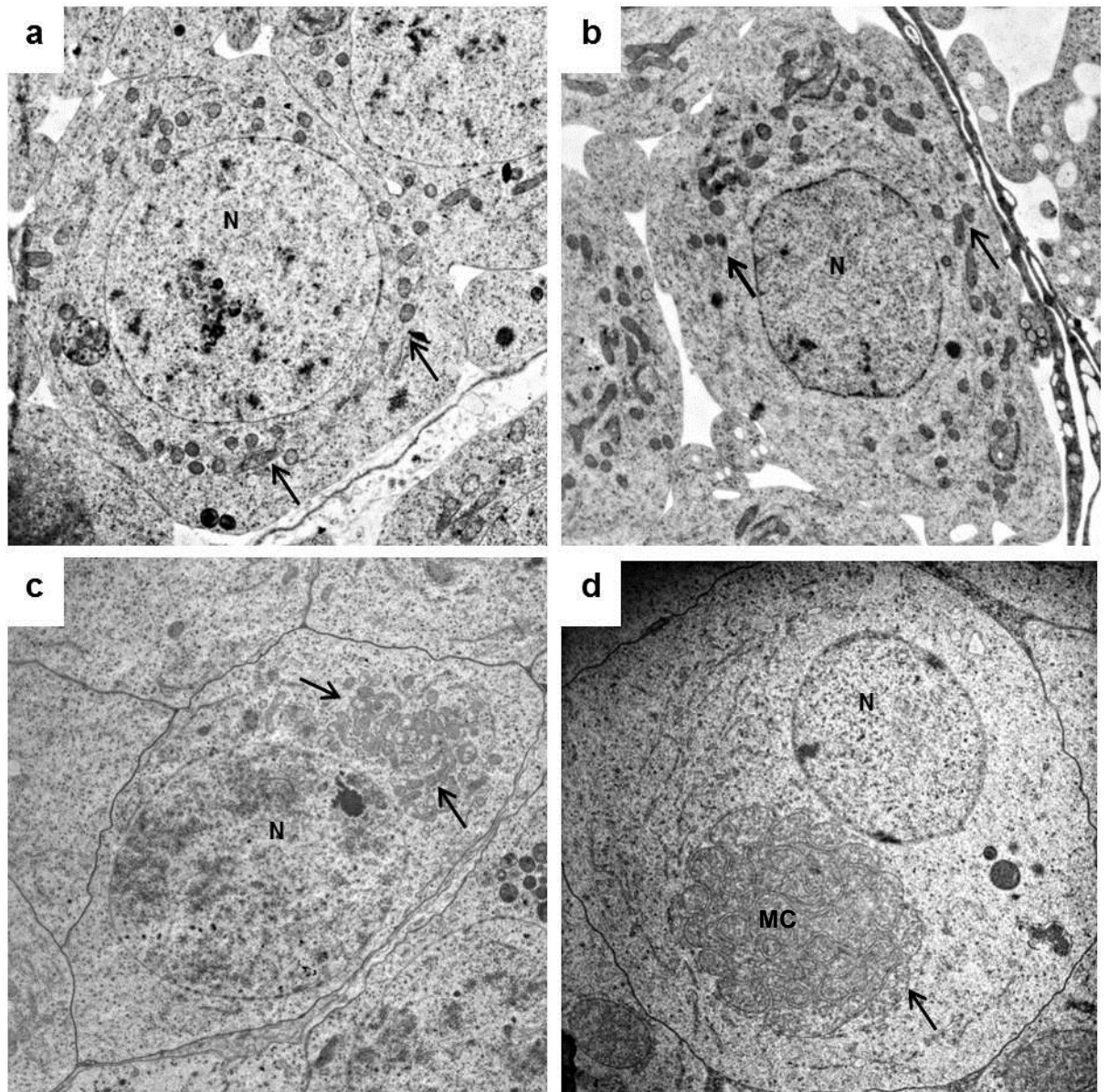


Figura 1. Eletromicrografias de espermátides em estágio inicial de diferenciação de *Chinavia impicticornis* (a) *Edessa mediatubunda* (b, d) e *E. collaris* (c). **a-b)** Migração das mitocôndrias para um polo da espermátide; **c-d)** Fusão das mitocôndrias originando o complexo mitocondrial. Mitocôndrias (setas), núcleo (N) e complexo mitocondrial (MC). Aumento: 10000x.

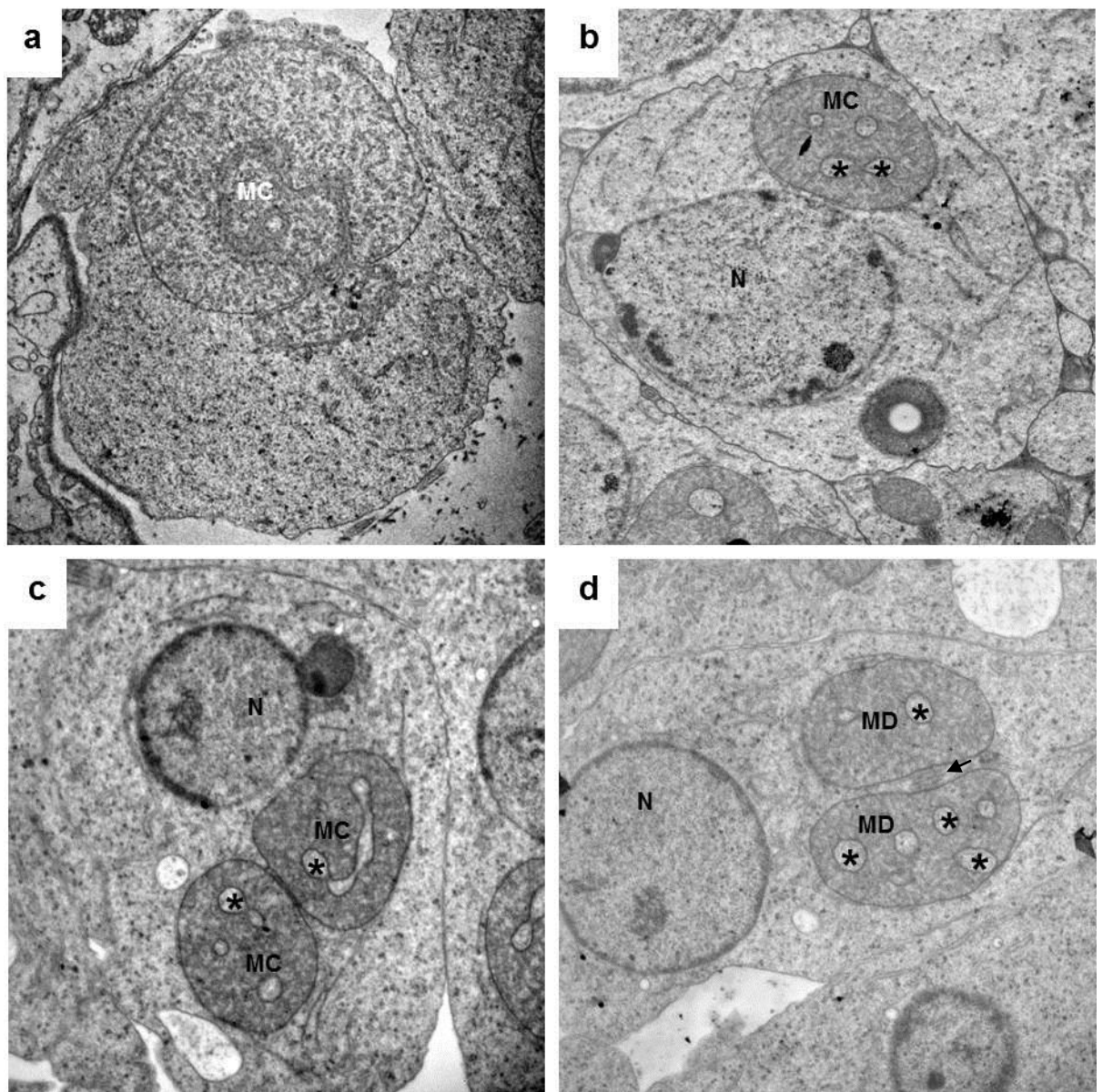


Figura 2. Eletromicrografias de espermátides em estágio intermediário de diferenciação de *Edessa mediatubunda* (a) e *E. collaris* (b). e *Thyanta perditor* (c-d). **a-b)** Fim da formação do complexo mitocondrial e vesículas de citoplasma presas no complexo **c)** Início da divisão do complexo mitocondrial; **d)** Formação dos derivados mitocondriais e surgimento do axonema. Nucléo (N), complexo mitocondrial (MC), derivados mitocondriais (MD), vesículas de citoplasma, axonema (seta). Aumento: 16700x.

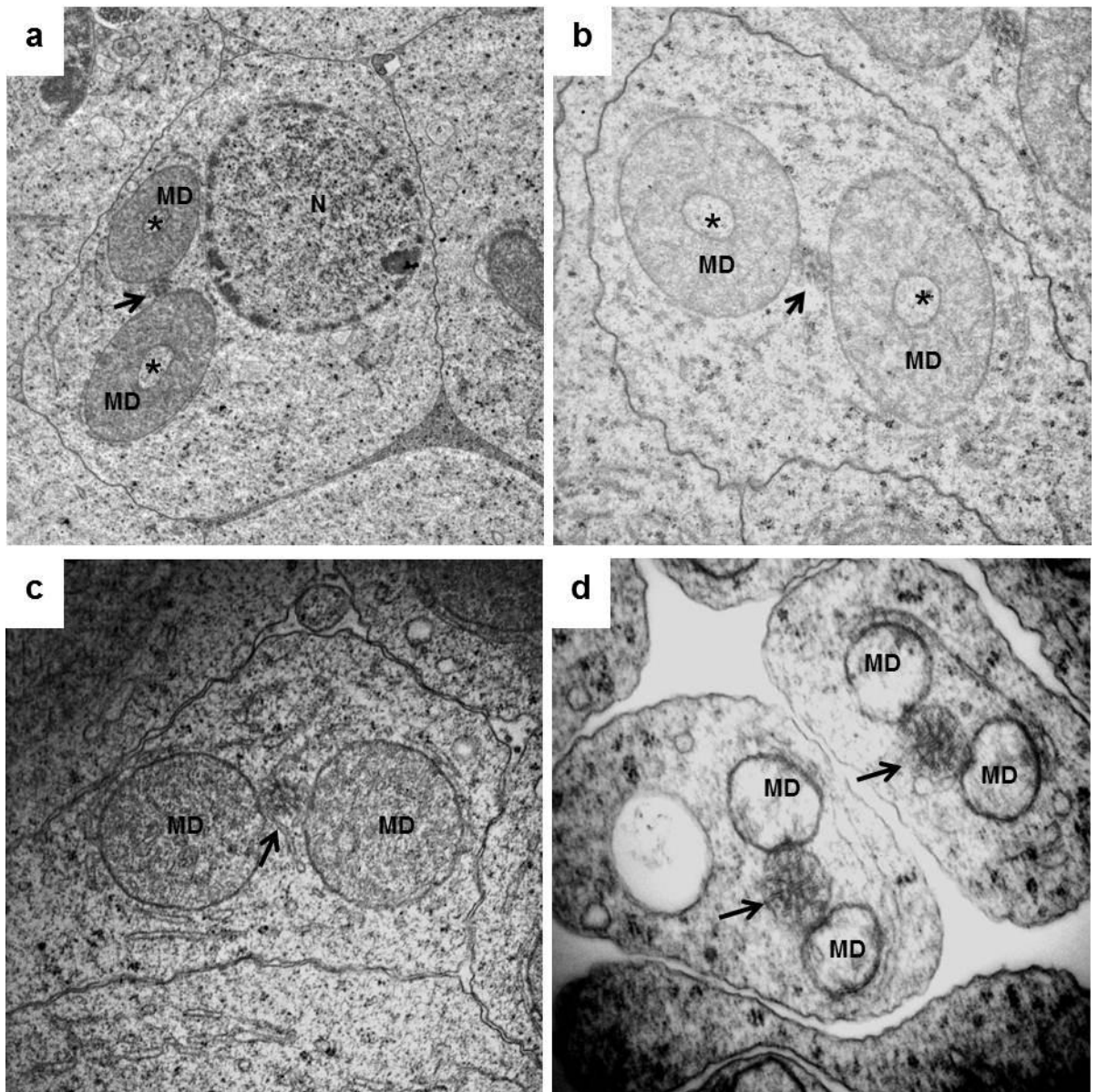


Figura 3. Eletromicrografias de espermátides em estágio intermediário de diferenciação de *Edessa mediatubunda* (c), *E. collaris* (a-b) e *Thyanta perditor* (d). **a-c)** Formação dos derivados mitocondriais e surgimento do axonema; **d)** Formação dos túbulos acessórios ao redor do axonema. Nucléo (N), complexo mitocondrial (MC), derivados mitocondriais (MD) e axonema (seta) e citoplasma no interior dos derivados mitocondriais (asterisco). Aumentos: a) 20000x, b-d) 27500x.

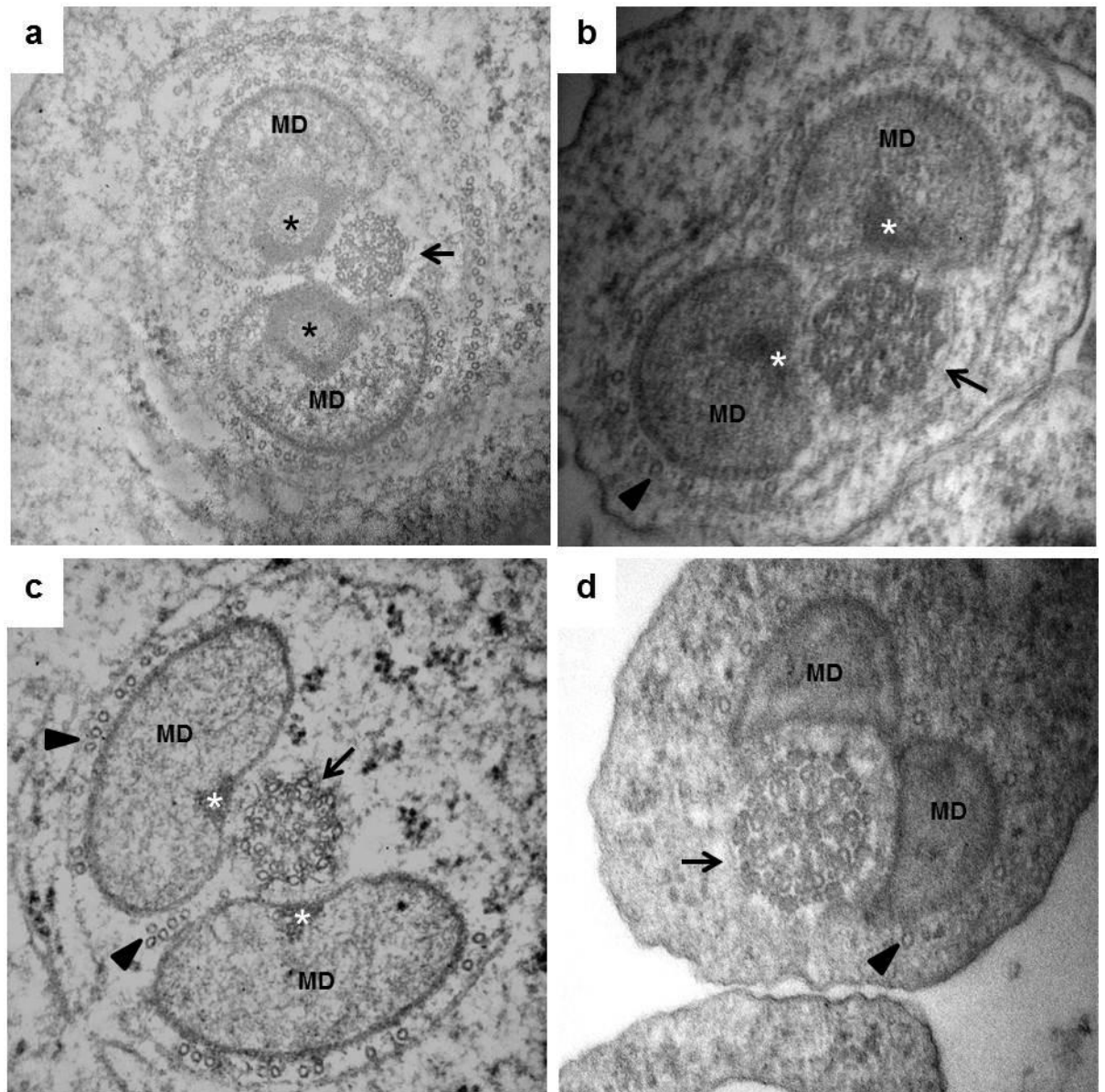


Figura 4. Eletromicrografias da região flagelar das espermátides de **a)** *Chinavia impicticornis*; **b)** *Edessa mediatubunda*; **c)** *E. colaris* e **d)** *Thyanta perditor* evidenciando a morfologia diferente dos derivados mitocondriais para as espécies e as estruturas paracrystalinas em seu interior, além do padrão de disposição dos microtubulos do axonema (9 + 9 + 2) e os microtúbulos ao redor dos derivados. Derivados mitocondriais (MD), estrutura paracrystalina (asterisco), axonema (setas) e microtúbulos (ponta de seta). Aumentos: a) 67000x, b) 80000x, c) 67000x, d) 60000x.

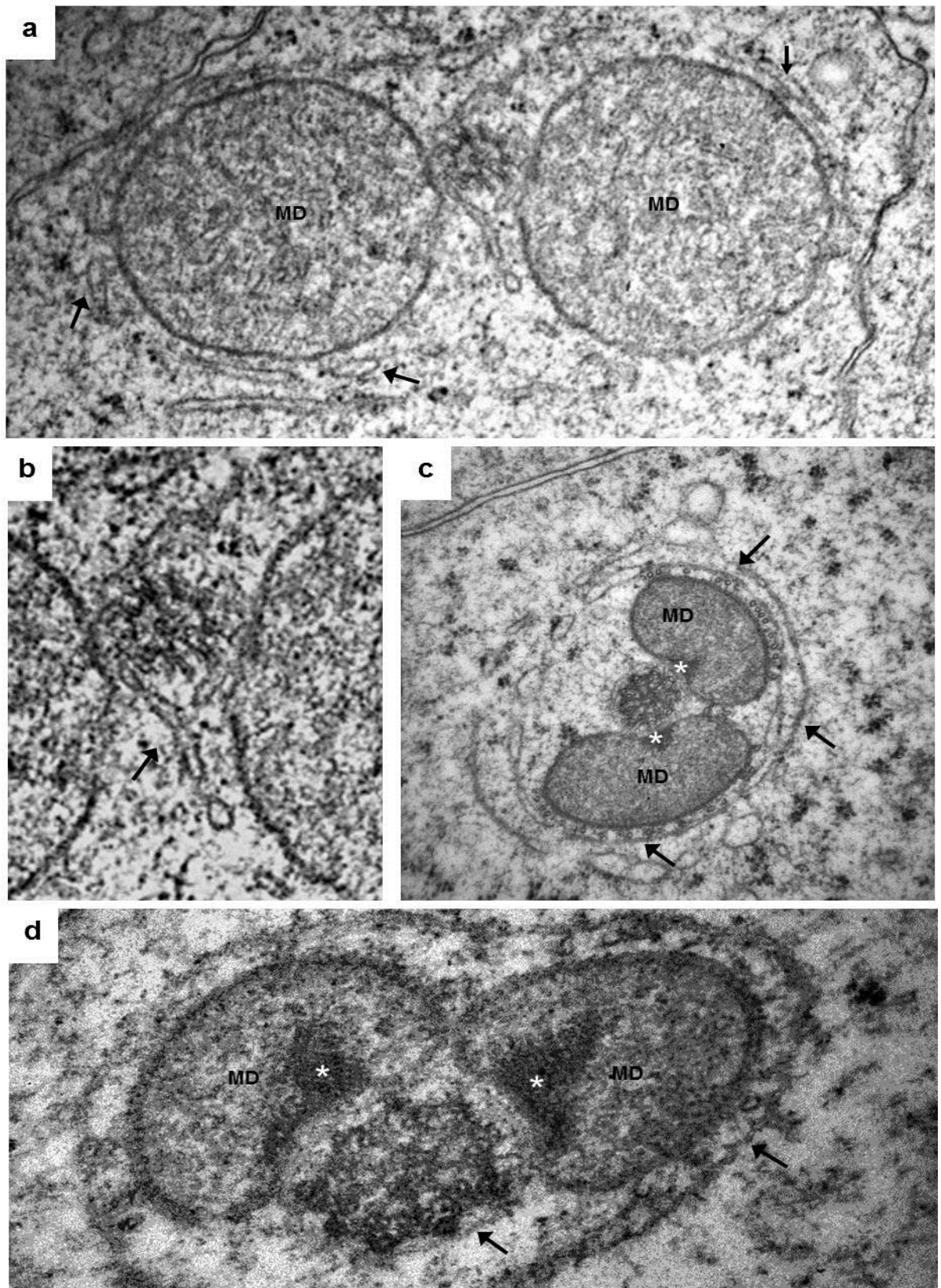


Figura 5. Eletromicrografias da região flagelar das espermátides de *Chinavia impicticornis* (a,b), *Edessa mediatubunda* (c,d). **a)** Formação das membranas que envolvem os derivados e o axonema; **b)** Detalhe da formação da membrana que circunda o axonema; **c)** Membrana começando a envolver os derivados mitocondriais; **d)** Membranas envolvendo os derivados e o axonema. Membranas (setas), derivados (MD) e estrutura paracristalina (asterisco). Aumentos: a) 40000x, b) 80000x, c) 40000x, d) 60000x.

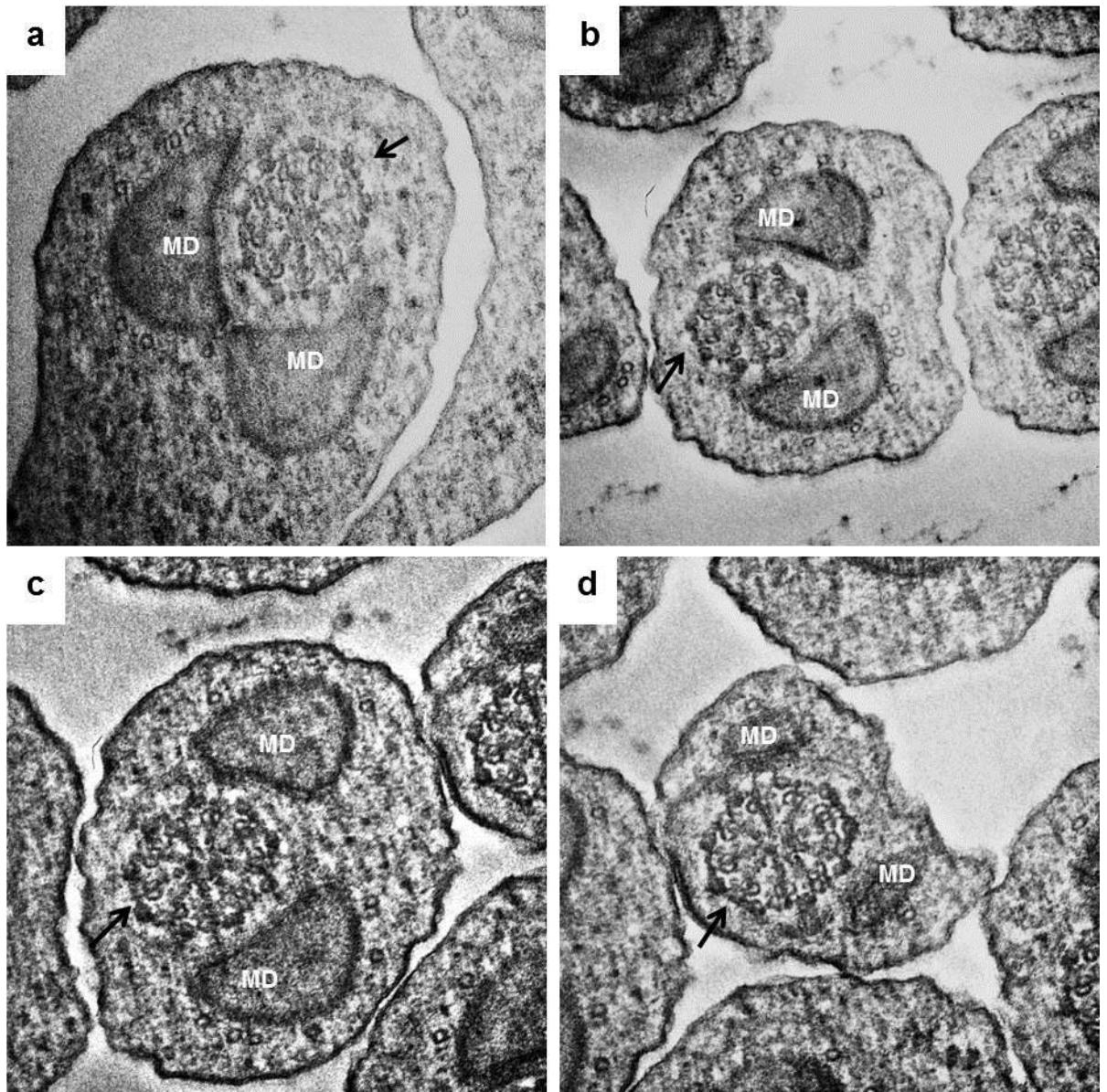


Figura 6. Cortes transversais da região do flagelo, evidenciando a posição dos derivados mitocondriais em relação ao axonema ao longo do flagelo de *T. perditor*. **a)** Derivados mitocondriais grandes e ocupando grande espaço do citoplasma; **b-c)** Cortes transversais da região intermediária do flagelo mostrando os derivados menores e mais afastados em relação ao axonema; **d)** Cortes transversais da região final do flagelo mostrando o desaparecimento quase completo dos derivados mitocondriais. Derivados mitocondriais (MD), axonema (setas). Aumentos: a) 40000x, b) 35000x, c,d) 40000x.

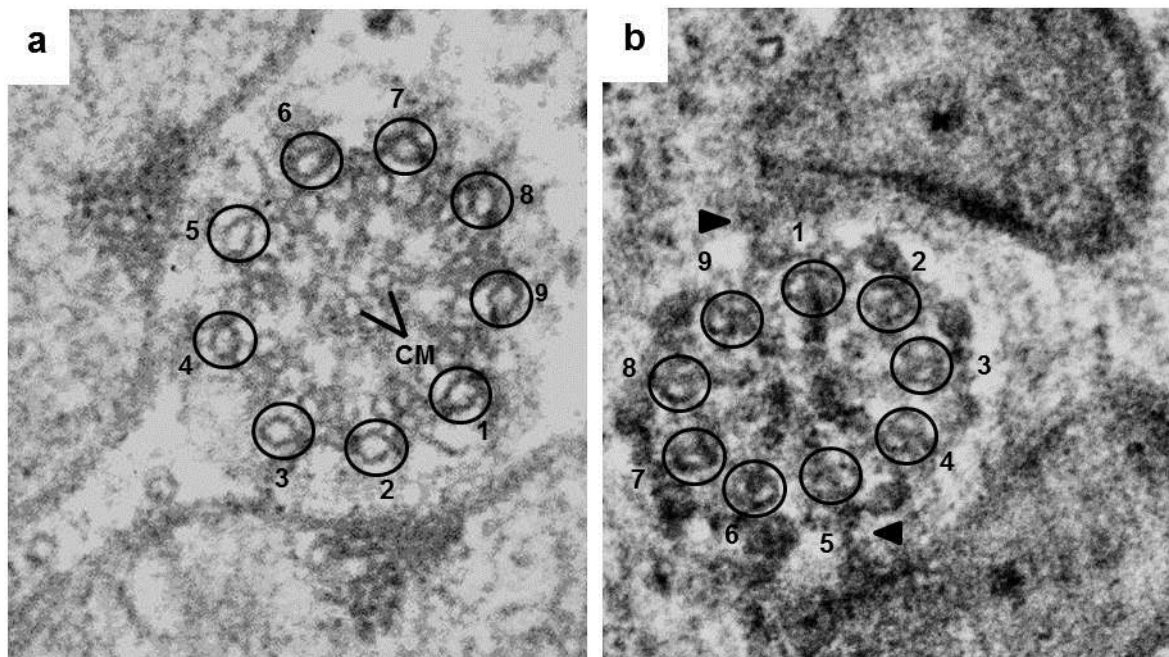


Figura 7. Eletromicrografias da região flagelar das espermátides de **a) *E. colaris*** e **b) *Thyanta perditor*** evidenciando o padrão de disposição dos microtubulos do axonema (9 + 9 +2). **a)** Dois microtúbulos centrais (CM) e nove microtúbulos acessórios (círculos numerados); **b)** Nove duplas de microtúbulos intermediários (círculos numerados) e cisterna que liga o axonema aos derivados mitocondriais. Aumento: 100000x

Discussão

As características ultraestruturais da espermatogênese da subordem Heteroptera já foram descritas em alguns membros das famílias Reduviidae (BÁO e DE SOUZA, 1994), Largidae (ARAÚJO et al, 2012) e Pentatomidae (PHILLIPS, 1970; FERNANDES et al, 1998; FERNANDES e BÁO 1999; FERNANDES et al, 2001a; FERNANDES et al, 2001b; ARAÚJO 2011; DALLAI 2014), além de indivíduos aquáticos da infra-ordem Gerromorpha e terrestres das infra-ordens terrestres Cimicomorpha e Pentatomorpha (DALLAI e AFZELIUS 1980).

A formação do complexo mitocondrial ou “nebenkern” consiste na migração das mitocôndrias para um polo celular e uma posterior sequência de fusões. O complexo mitocondrial começa a se formar e varias membranas ou segmentos podem ser observadas no interior da estrutura, que posteriormente com o decorrer do processo diminuem de número (BOWEN 1922; PRATT 1970;

PHILLIPS 1970; DALLAI, 2014). Durante esse processo pode ocorrer à formação de vesículas no interior do complexo mitocondrial denominado de regiões refrativas por Bowen (1922) e, posteriormente, identificadas como citoplasma por Phillips (1970). Os estudos sobre o complexo mitocondrial foram realizados, por esses autores, utilizando as espécies *Euschistus euchistoides*, *Brochyniena quadripustulata* e *Murgantia histrionica* (BOWEN 1922), *Murgantia histrionica* (PRATT 1970), bem como espécies do gênero *Euschistus* (PHILLIPS 1970) todas pertencentes à família Pentatomidae. Dallai (2014a) mostrou que a formação do complexo mitocondrial é semelhante para a maioria das ordens de insetos sendo esse processo semelhante ao descrito em Heteroptera (BOWEN 1922; PRATT 1970; PHILLIPS 1970). A formação dos complexos mitocondriais, nas espécies, por nós analisadas, *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* foram semelhantes entre as espécies e com as descritas por outros autores, demonstrando que esses processos são muito conservados.

A origem dos derivados mitocondriais segue um padrão similar para grande parte dos insetos estudados. Após a sua formação eles se alongam acompanhado o axonema (PRATT 1970; PHILLIPS 1970; GRASSNER III et al 1972 e MERCATI et al 2009), como as espécies por nós estudadas.

Os derivados mitocondriais quando observados em cortes transversais podem se apresentar simétricos entre si como os observados em *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera) por Lino-Neto e Dolder (2001), *Chrysomya megacephala* (Diptera) por Name et al (2010), *Podisus nigrispinus*, *Podisus distinctus*, *Brontocoris tabidus*, *Thynacanta marginata* e *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) por Araújo et al (2011), *Largus rufipennis* (Heteroptera: Largidae) por Araújo et al (2012) ou assimétricos como encontrados para as espécies do gênero *Chrysopa* (Neuroptera) por Phillips (1970) e *Hypanthidium foveolatum* (Hymenoptera) por Gracielle et al (2009), sendo o modelo simétrico em corte transversal o encontrado para *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* neste estudo.

Phillips (1970) em seu estudo avalia que a morfologia dos derivados mitocondriais pode ser espécie-específica. Isto foi confirmado em nosso

trabalho analisando a morfologia dos derivados das espécies, onde os derivados de *C. impicticornis* se apresentaram grandes e arredondados, *E. meditabunda* pequenos e arredondados, *E. collaris* alongados e com extremidades arredondadas e *T. perditor* pequenos com uma extremidade arredondada e a outra angular. Os derivados mitocondriais contem em seu interior uma estrutura paracristalina que é formada por uma proteína insolúvel e rica em prolina a qual foi dada o nome de cristalomitina (BACCETTI et al 1977) sendo essa proteína presente nas espermátides e espermatozoides de insetos (PHILLIPS, 1970; BACCETTI et al, 1977; ITAYA et al, 1980 e BÁO et al, 1992), nas espécies deste estudo essa estrutura paracristalina está presente de maneira mais eletrondensa no interior dos derivados mitocondriais. Em Heteroptera foi verificada a presença de duas até três estruturas paracristalinas, sendo essa característica considerada sinapomórfica para o grupo (ARAÚJO et al, 2011; ARAÚJO, 2012; DALLAI, 2014a; ALEVI et al, 2015), nas espécies do presente estudo as estruturas paracristalinas encontradas estão em início de desenvolvimento não sendo possível identificar duas ou três estruturas, resultado semelhante ao encontrado em Alevi et al (2015).

Circundando os derivados mitocondriais e o axonema é possível se observar membranas que são originadas durante a transformação das mitocôndrias em derivados mitocondriais (BACCETTI, 1976), acredita-se que a origem acontece através do retículo endoplasmático e as cisternas do complexo de Golgi (ITO, 1960; BACCETTI, 1976), essas organelas se associam para, provavelmente, auxiliar as transformações celulares durante a espermiogênese como visto por Werner e Werner (1993) em *Gerris najas* (Heteroptera: Gerridae), sendo essas membranas observadas nas espécies do presente estudo. Outra estrutura observada são microtúbulos ao redor dos derivados, que segundo Phillips (1970), assim como as membranas, devem auxiliar nas transformações e no processo de alongamento das espermátides. Posteriormente ao fim da diferenciação das espermátides essas membranas regridem e formam uma ponte que liga o axonema aos derivados mitocondriais, sendo essa considerada uma característica sinapomórfica para o grupo Heteroptera (DALLAI, 2014) e encontrada nas espécies desse estudo, essa ponte pode ter a função de coordenar a motilidade do

flagelo, auxiliando assim a movimentação do espermatozoide (BÁO e DE SOUZA, 1994).

Com relação ao padrão de organização do axonema de *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* elas apresentaram a conformação de microtúbulos de 9+9+2, sendo nove microtúbulos acessórios, nove duplas de microtúbulos intermediários e dois microtúbulos centrais, com os microtúbulos acessórios surgindo no fim da formação do axonema, semelhantes aos resultados descritos por Phillips (1970). Esse padrão é tido como sinapomórfico para a classe Insecta (DALLAI, 2014), sendo encontrado em diversos estudos com indivíduos dessa classe como Bawa (1964) com *Thermobia domestica* (Diptera), Gassner III et al (1972) com *Musca domestica* (Diptera), Tokuyasu (1974) com *Drosophila melanogaster* (Diptera), Itaya (1980) com *Leptocoris trivittatus* (Heteroptera: Corixidae), Bão e de Souza (1994) com *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae), Araújo et al (2005) com *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera), Araújo et al (2011) com cinco espécies de Heteroptera da família Pentatomidae e Dallai (2014b) com três espécies de Zoraptera. Pode se encontrar algumas conformações fora do padrão para insetos como o padrão 9+0 encontrados nos gêneros *Contarinia* e *Lestodiplosis* (BACCETTI e DALLAI 1976), e para alguns mosquitos o padrão 9+9+1, enquanto em efeméridas predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970), sendo que as espécies estudadas neste trabalho apresentam a conformação padrão para insetos de 9+9+2.

As espécies de *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* estudadas neste trabalho apresentaram diversas semelhanças com outros Heteroptera da família Pentatomidae e de outras famílias, como a presença de estruturas paracristalinas nos derivados mitocondriais, axonema com padrão 9+9+2 e presença de cisternas envolvendo o axonema e os derivados. A única característica que se mostrou diferente entre as espécies foi a morfologia dos derivados o que pode corroborar a hipótese de Phillips (1970) de que a morfologia dos derivados mitocondriais é espécie específica. Essas características podem se mostrar importantes em futuros estudos filogenéticos e

para uma compreensão mais ampla dos aspectos ultraestruturais de Heteroptera e suas sinapomorfias novos estudos deverão ser realizados.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo nº 2013/19864-5), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelos apoios financeiros.

Referências Bibliográficas

ALEVI, K. C. C., PEREIRA, L. L. V., MOREIRA, F. F. F., BARBOSA, J. F., TABOGA, S. R.. Histological and Ultrastructural Analysis of Spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomol Ornithol Herpetol**, v. 4, n. 157, p. 2161-0983.10001, 2015.

ARAÚJO, V. A., ZAMA, U., DOLDER, H., & LINO-NETO, J.. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 22, n. 3, p. 137-141, 2005.

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.

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

BACCETTI, B., AFZELIUS, B. A. The biology of the sperm cell. **Monographs in developmental biology**, n. 10, p. 1, 1976.

BACCETTI, B.; DALLAI, R. The spermatozoon of Arthropoda. XXVII. Uncommon axoneme patterns in different species of the Cecidomyid flies. **Journal of ultrastructure research**, v. 55, n. 1, p. 50-69, 1976.

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 p. 594-600, 1977.

BÁO, S. N., LINS, U., FARINA, M., & 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, n. 1, p. 46-51, 1992.

BÁO, S. N.; DE SOUZA, W. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). **Tissue and Cell**, v. 26, n. 3, p. 299-308, 1994.

BAWA, S. R. Electron microscope study of spermiogenesis in a fire-brat insect, *Thermobia domestica* pack I. Mature spermatozoon. **The Journal of cell biology**, v. 23, n. 3, p. 431-446, 1964.

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]-1, 1920.

BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. IV. The phenomenon of polymegaly in the sperm cells of the family Pentatomidae. In: **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**. American Academy of Arts and Sciences, 1922. p. 391-422.

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]-1, 1922.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B., A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). **Journal of Morphology**, v. 164, n. 3, p. 301-309, 1980.

DALLAI, R., MERCATI, D., CARAPELLI, A., NARDI, F., MACHIDA, R., SEKIYA, K., FRATI, F. Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta ss. **Arthropod structure & development**, v. 40, n. 1, p. 77-92, 2011.

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.

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). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 27, n. 3, p. 235-240, 1998.

FERNANDES, A. P. Ultrastructural localization of enzymatic activity during spermiogenesis in two phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue and Cell**, v. 31, n. 3, p. 349-356, 1999.

FERNANDES, A. P.; PEIXOTO, F. L.; BÁO, S. N.. Ultrastructural and cytochemical studies on diapause spermiogenesis in phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Braz. J. morphol. Sci**, v. 18, n. 2, p. 91-94, 2001a.

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

GASSNER III, G.; KLEMETSON, D. J.; RICHARD, R. D. Spermiogenesis in house fly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae): A transmission electron microscope study. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 1, n. 2, p. 105-120, 1972.

GRACIELLE, I. M. S., FIORILLO, B. S., LINO-NETO, J., BÁO, S. N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**, v. 40, n. 4, p. 419-425, 2009.

HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 1, p. 6-32, 1968.

ITAYA, P. W.; THOMPSON, S. A.; HEIDGER, P. M. Fine structure of late stages of spermiogenesis in *Leptocoris trivittatus* Say (Hemiptera: Coreidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 9, n. 2, p. 135-145, 1980.

ITO, S.. The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of *Drosophila virilis*. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 7, n. 3, p. 433-441, 1960.

KESSEL, R. G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. **Journal of ultrastructure research**, v. 16, n. 3, p. 293-304, 1966.

LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. **Zoologica Scripta**, v. 30, n. 2, p. 89-96, 2001.

MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R.. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). **Journal of morphology**, v. 270, n. 7, p. 825-833, 2009.

NAME, K. P. O.; PUJOL-LUZ, J. R.; BÁO, S. N. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Micron**, v. 41, n. 7, p. 853-860, 2010.

PANIZZI, A. R. WILD HOSTS OF PENTATOMIDS: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops. *Annu. Rev. Entomol.* v. 42 p. 99–122, 1997.

PANIZZI, A. R.; J. E. McPHERSON; D. G. JAMES; M. JAVAHERY & R. M. McPHERSON. 2000. Stink bugs (Pentatomidae), p. 421–474. In: C. W. Schaefer & A. R. Panizzi (eds.), **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton. CRC Press. p. 828

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

PRATT, S. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of an hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. **Comparative Spermatology**, p. 301-311, 1970.

SCHAEFER, W. C.; PANIZZI, A. R. Heteroptera of Economic importance. **Boca Raton, FL: CRC Press, LLC**, 824p, 2000.

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

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

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, n. 5, p. 521-534, 1993.

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

IV. DISCUSSÃO GERAL

As características ultraestruturais da espermatogênese da subordem Heteroptera já foram descritas em alguns membros das famílias Reduviidae (BAO e DE SOUZA, 1994), Largidae (ARAÚJO, 2012) e Pentatomidae (PHILLIPS, 1970; FERNANDES et al, 1998; FERNANDES e BÃO 1999; FERNANDES et al, 2001a; FERNANDES et al, 2001b; ARAÚJO 2011; DALLAI 2014), além de indivíduos aquáticos da infra-ordem Gerromorpha e terrestres das infra-ordens terrestres Cimicomorpha e Pentatomorpha (DALLAI e AFZELIUS 1980).

A formação do acrossomo de *Chinavia impicticornis*, *Edessa collaris*, *Edessa mediatunda* e *Thyanta perditor* ocorre de maneira similar a da maioria dos insetos, onde ocorre um grande desenvolvimento do complexo de Golgi que produz pequenas vesículas na sua face trans que irão se fundir formando a vesícula pró acrossomal. Essa vesícula irá se ligar ao núcleo onde sofre transformações que darão origem ao acrossomo, como descrito por Hoage e Kessel (1968) em *Apis melífera*, Phillips (1970) para diversas ordens de insetos, Fernandes et al (2001) para Heteroptera da família Pentatomidae, e por Name et al (2012) em três espécies de Diptera, sendo a sua formação essencial para que ocorra a penetração do espermatozoide no ovócito (HOAGE; KESSEL, 1968; PHILLIPS, 1970; NAME, 2012). Phillips (1970) relatou uma exceção para a formação do acrossomo para membros do gênero *Conocephalus* pertencente a ordem Orthoptera em que a vesícula é formada na face cis do complexo de Golgi. Em sua forma final o acrossomo pode se mostrar simples sem nenhuma estrutura auxiliar como encontrado em alguns Diptera por Name (2008) e Name et al (2012) ou o acrossomo pode conter estruturas de inserção como o *perforatorium* como encontrado em alguns Hymenoptera como *Bephratelloides pomorum* por Lino-Neto et al (1999). O acrossomo das espécies estudadas se mostrou de maneira simples e localizado em uma depressão apical/lateral do núcleo se apresentando como uma estrutura uniforme e elétron-densa.

Durante o processo de formação do acrossomo ocorre simultaneamente a compactação da cromatina e a transformação do núcleo onde a cromatina se torna

primeiramente granular e posteriormente filamentosa até se tornar uma estrutura intensamente eletrondensa, ao mesmo tempo em que o núcleo se torna mais fusiforme e pequeno (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993), processo esse semelhante ao descrito para diversas ordens como Hemiptera e Orthoptera por Phillips (1970), duas espécies de Coleoptera por Bão e Hamú (1993), Diptera por Tokuyasu (1974) e Name (2008) e em Heteroptera por Fernandes et al (2001b). O processo de condensação da cromatina ocorre pela substituição de histonas ricas em lisina por histonas ricas em arginina, sendo essas histonas ricas em arginina produzidas no citoplasma durante a espermiogênese e, posteriormente, transportadas para o núcleo (PHILLIPS; 1970; BACCETTI, 1985). Nas espécies do presente estudo a condensação da cromatina ocorre de maneira similar a da maioria dos insetos. Também foi possível observar a presença de inúmeros microtúbulos ao redor do núcleo que também são chamados de manchete cuja função é a de auxiliar as transformações morfológicas do núcleo, sendo esses microtúbulos encontrados em diversas espécies (BACCETTI, 1985; NAME, 2008).

Outra estrutura que é possível se observar na região da cabeça da espermátide é o adjunto do centríolo uma estrutura elétrondensa que se localiza na região posterior do núcleo sendo encontrado em diversas espécies de insetos (PHILLIPS, 1970), estrutura essa também encontrada nos indivíduos deste estudo. O adjunto do centríolo é composto por ribonucleoproteínas oriundas do núcleo ou da degradação de ribossomos presentes no citoplasma (PHILLIPS, 1970, BACCETTI, 1972; NAME, 2008) cuja função sugerida pode ser a ancoragem do flagelo como sugerido por Baccetti (1972) ou a nutrição para o processo de formação do axonema como mostrado em Orthoptera por Yasuzumi et al (1970).

A formação do complexo mitocondrial ou “nebenkern” consiste na migração das mitocôndrias para um polo celular e uma posterior sequência de fusões. O complexo mitocondrial começa a se formar e varias membranas ou segmentos podem ser observadas no interior da estrutura, que posteriormente com o decorrer do processo diminuem de número (BOWEN 1922; PRATT 1970; PHILLIPS 1970; DALLAI, 2014). Durante esse processo pode ocorrer à formação

de vesículas no interior do complexo mitocondrial denominado de regiões refrativas por Bowen (1922) e, posteriormente, identificadas como citoplasma por Phillips (1970). Os estudos sobre o complexo mitocondrial foram realizados, por esses autores, utilizando as espécies *Euschistus euchistoides*, *Brochyniena quadripustulata* e *Murgantia histrionica* (BOWEN 1922), *Murgantia histrionica* (PRATT 1970), bem como espécies do gênero *Euschistus* (PHILLIPS 1970) todas pertencentes à família Pentatomidae. Dallai (2014a) mostrou que a formação do complexo mitocondrial é semelhante para a maioria das ordens de insetos sendo esse processo semelhante ao descrito em Heteroptera (BOWEN 1922; PRATT 1970; PHILLIPS 1970). A formação dos complexos mitocondriais, nas espécies, por nós analisadas, *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* foram semelhantes entre as espécies e com as descritas por outros autores, demonstrando que esses processos são muito conservados.

A origem dos derivados mitocondriais segue um padrão similar para grande parte dos insetos estudados. Após a sua formação eles se alongam acompanhado o axonema (PRATT 1970; PHILLIPS 1970; GRASSNER III et al 1972 e MERCATI et al 2009), como as espécies por nós estudadas.

Os derivados mitocondriais quando observados em cortes transversais podem se apresentar simétricos entre si como os observados em *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera) por Lino-Neto e Dolder (2001), *Chrysomya megacephala* (Diptera) por Name et al (2010), *Podisus nigrispinus*, *Podisus distinctus*, *Brontocoris tabidus*, *Thynacanta marginata* e *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) por Araújo et al (2011), *Largus rufipennis* (Heteroptera: Largidae) por Araújo et al (2012) ou assimétricos como encontrados para as espécies do gênero *Chrysopa* (Neuroptera) por Phillips (1970) e *Hypanthidium foveolatum* (Hymenoptera) por Gracielle et al (2009), sendo o modelo simétrico em corte transversal o encontrado para *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* neste estudo.

Phillips (1970) em seu estudo avalia que a morfologia dos derivados mitocondriais pode ser espécie-específica. Isto foi confirmado em nosso trabalho analisando a morfologia dos derivados das espécies, onde os derivados de

C. impicticornis se apresentaram grandes e arredondados, *E. meditabunda* pequenos e arredondados, *E. collaris* alongados e com extremidades arredondadas e *T. perditor* pequenos com uma extremidade arredondada e a outra angular. Os derivados mitocondriais contem em seu interior uma estrutura paracristalina que é formada por uma proteína insolúvel e rica em prolina a qual foi dada o nome de cristalomitina (BACCETTI et al 1977) sendo essa proteína presente nas espermátides e espermatozoides de insetos (PHILLIPS, 1970; BACCETTI et al, 1977; ITAYA et al, 1980 e BÁO et al, 1992), nas espécies deste estudo essa estrutura paracristalina estava presente de maneira mais elétrondensa no interior dos derivados mitocondriais. Em Heteroptera é verificada a presença de duas até três estruturas paracristalinas, sendo essa característica considerada sinapomórfica para o grupo (ARAÚJO et al, 2011; ARAÚJO, 2012; DALLAI, 2014a; ALEVI et al, 2015), nas espécies do presente estudo as estruturas paracristalinas encontradas estão em início de desenvolvimento não sendo possível identificar duas ou três estruturas, resultado semelhante ao encontrado em Alevi et al (2015).

Circundando os derivados mitocondriais e o axonema é possível se observar membranas que são originadas durante a transformação das mitocôndrias em derivados mitocondriais (BACCETTI, 1976), acredita-se que a origem acontece através do retículo endoplasmático e as cisternas do complexo de Golgi (ITO, 1960; BACCETTI, 1976), essas organelas se associam para, provavelmente, auxiliar as transformações celulares durante a espermiogênese como visto por Werner e Werner (1993) em *Gerris najas* (Heteroptera: Gerridae), sendo essas membranas observadas nas espécies do presente estudo. Outra estrutura observada são microtúbulos ao redor dos derivados, que segundo Phillips (1970), assim como as membranas, devem auxiliar nas transformações e no processo de alongamento das espermátides. Posteriormente ao fim da diferenciação das espermátides essas membranas regridem e formam uma ponte que liga o axonema aos derivados mitocondriais, sendo essa considerada uma característica sinapomórfica para o grupo Heteroptera (DALLAI, 2014) e encontrada nas espécies desse estudo, essa ponte pode ter a função de coordenar a motilidade do

flagelo, auxiliando assim a movimentação do espermatozoide (BAO e DE SOUZA, 1994).

Com relação ao padrão de organização do axonema de *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* elas apresentaram a conformação de microtúbulos de 9+9+2, sendo nove microtúbulos acessórios, nove duplas de microtúbulos intermediários e dois microtúbulos centrais, com os microtúbulos acessórios surgindo no fim da formação do axonema, semelhantes aos resultados descritos por Phillips (1970). Esse padrão é tido como sinapomórfico para a classe Insecta (DALLAI, 2014), sendo encontrado em diversos estudos com indivíduos dessa classe como Bawa (1964) com *Thermobia domestica* (Diptera), Gassner III et al (1972) com *Musca domestica* (Diptera), Tokuyasu (1974) com *Drosophila melanogaster* (Diptera), Itaya (1980) com *Leptocoris trivittatus* (Heteroptera: Corixidae), Bão e de Souza (1994) com *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae), Araújo et al (2005) com *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera), Araújo et al (2011) com cinco espécies de Heteroptera da família Pentatomidae e Dallai (2014b) com três espécies de Zoraptera. Pode se encontrar algumas conformações fora do padrão para insetos como o padrão 9+0 encontrados nos gêneros *Contarinia* e *Lestodiplosis* (BACCETTI e DALLAI 1976), e para alguns mosquitos o padrão 9+9+1, enquanto em efeméridas predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970), sendo que as espécies estudadas neste trabalho apresentam a conformação padrão para insetos de 9+9+2.

As espécies de *Chinavia impcticornis*, *Edessa Meditabunda*, *E. Colaris* e *Thyanta perditor* estudadas neste trabalho apresentaram diversas semelhanças com outros Heteroptera da família Pentatomidae e de outras famílias, como a formação do acrossomo, as transformações do núcleo, a presença de estruturas paracristalinas nos derivados mitocondriais, axonema com padrão 9+9+2 e presença de cisternas envolvendo o axonema e os derivados. A única característica que se mostrou diferente entre as espécies foi a morfologia dos derivados o que pode corroborar a hipótese de Phillips (1970) de que a morfologia dos derivados mitocondriais é espécie específica. Essas características podem se

mostrar importantes em futuros estudos filogenéticos e para uma compreensão mais ampla dos aspectos ultraestruturais de Heteroptera e suas sinapomorfias novos estudos deverão ser realizados.

V. CONCLUSÕES

As análises ultraestruturais da espermatogênese de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* permitiram concluir que:

- O acrossomo é formado através da fusão de diversas vesículas oriundas do complexo de Golgi se posicionando na região apical/lateral do núcleo;
- O núcleo sofre diversas transformações durante a espermiogênese passando de uma morfologia esférica com a cromatina dispersa para uma morfologia fusiforme com a cromatina extremamente condensada;
- Também foi possível detectar a presença do adjunto do centríolo como uma estrutura eletrondensa na região basal do núcleo;
- As mitocôndrias se agrupam formando um complexo mitocondrial ou “Nebenkern”, que posteriormente se divide em dois derivados mitocondriais que se dispõem bilateralmente ao axonema;
- Os derivados mitocondriais possuem morfologia simétrica entre si;
- Quando comparado entre os indivíduos de *Chinavia impicticornis*, *Edessa meditabunda*, *E. collaris* e *Thyanta perditor* os derivados apresentaram diferentes morfologias onde os derivados de *C. impicticornis* se apresentaram grandes e arredondados, *E. meditabunda* pequenos e arredondados, *E. collaris* alongados e com extremidades arredondadas e *T. perditor* pequenos com uma extremidade arredondada e a outra angular, sendo essa uma característica muito interessante para futuros estudos taxonômicos e/ou filogenéticos;
- Os derivados mitocondriais das espécies estudadas apresentaram estruturas paracristalinas em seu interior;
- O padrão flagelar encontrado é de 9+9+2, sendo esse o padrão típico de insetos.

Portanto, podemos concluir que a maioria das características analisadas é semelhante entre os insetos, com exceção da morfologia dos derivados mitocondriais que são diferentes, até mesmo, entre as espécies de Heteroptera da família Pentatomidae.

VI. REFERÊNCIAS

- ALEVI, K. C. C., PEREIRA, L. L. V., MOREIRA, F. F. F., BARBOSA, J. F., TABOGA, S. R.. Histological and Ultrastructural Analysis of Spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomol Ornithol Herpetol**, v. 4, n. 157, p. 2161-0983.10001, 2015.
- ARAÚJO, V. A., ZAMA, U., DOLDER, H., & LINO-NETO, J.. Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 22, n. 3, p. 137-141, 2005.
- 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.
- ARAÚJO, V.A., BÁO, S.N., SERRÃO, J.E., LINO-NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica** (Stockholm) 93: 239–244, 2012.
- 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. **Monographs in developmental biology**, n. 10, p. 1, 1976
- BACCETTI, B.; DALLAI, R. The spermatozoon of Arthropoda. XXVII. Uncommon axoneme patterns in different species of the Cecidomyid flies. **Journal of ultrastructure research**, v. 55, n. 1, p. 50-69, 1976.
- 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 p. 594-600, 1977.
- BACCETTI, BACCIO. **Evolution of the sperm cell**. 1985.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P.; RENIERI, T.; SENSINI, C. Localization of acrosomal enzymes in Arthropoda, Echinodermata and Vertebrata. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 21 p. 385-389, 1989.
- BÁO, S.N.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DOLDER, H. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Cytobios**, v. 58 p. 93-100, 1989.
- BÁO, S. N.; HAMÚ, C. Nuclear changes during spermiogenesis in two chrysomelid beetles. **Tissue and Cell**, v. 25, n. 3, p. 439-445, 1993.

BÁO, S. N., LINS, U., FARINA, M., & 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, n. 1, p. 46-51, 1992.

BÁO, S. N.; DE SOUZA, W. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). **Tissue and Cell**, v. 26, n. 3, p. 299-308, 1994.

BAWA, S. R. Electron microscope study of spermiogenesis in a fire-brat insect, *Thermobia domestica* pack I. Mature spermatozoon. **The Journal of cell biology**, v. 23, n. 3, p. 431-446, 1964.

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]-1, 1920.

BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. IV. The phenomenon of polymegaly in the sperm cells of the family Pentatomidae. In: **Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences**. American Academy of Arts and Sciences, 1922. p. 391-422.

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]-1, 1922.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). **Journal of Morphology**, v. 164, n. 3, p. 301-309, 1980.

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., MERCATI, D., CARAPPELLI, A., NARDI, F., MACHIDA, R., SEKIYA, K., FRATI, F. Sperm accessory microtubules suggest the placement of Diplura as the sister-group of Insecta ss. **Arthropod structure & development**, v. 40, n. 1, p. 77-92, 2011.

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.

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). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 27, n. 3, p. 235-240, 1998.

FERNANDES, A. P. Ultrastructural localization of enzymatic activity during spermiogenesis in two phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Tissue and Cell**, v. 31, n. 3, p. 349-356, 1999.

FERNANDES, A. P.; PEIXOTO, F. L.; BÁO, S. N.. Ultrastructural and cytochemical studies on diapause spermiogenesis in phytophagous bugs (Hemiptera: Pentatomidae). **Braz. J. morphol. Sci**, v. 18, n. 2, p. 91-94, 2001a.

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

GALLO, J.; ESCALIER, D.; GRELLIER, P.; PRECIGOUT, E.; ALBERT, M.; DAVID, G.; SCHREVEL, J. Characterization of a monoclonal antibody to human proacrosin and its use in acrosomal status evaluation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39 p. 273-282, 1991.

GASSNER III, G.; KLEMETSON, D. J.; RICHARD, R. D. Spermiogenesis in house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): A transmission electron microscope study. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 1, n. 2, p. 105-120, 1972.

GONZÁLEZ-GARCIA, J.M.; ANTONIO, C.; SUJA, J.A.; RUFAS, J.S. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 4, p. 124-132, 1996.

GRACIELLE, I. M. S., FIORILLO, B. S., LINO-NETO, J., BÁO, S. N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930)(Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**, v. 40, n. 4, p. 419-425, 2009.

HOAGE, T. R.; KESSEL, R. G. An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.)

with special reference to centriole replication and elimination. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 1, p. 6-32, 1968.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The Kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 327-350, 1961.

ITAYA, P. W.; THOMPSON, S. A.; HEIDGER, P. M. Fine structure of late stages of spermiogenesis in *Leptocoris trivittatus* Say (Hemiptera: Corizidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 9, n. 2, p. 135-145, 1980.

ITO, S.. The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of *Drosophila virilis*. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 7, n. 3, p. 433-441, 1960.

KESSEL, R. G. The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. **Journal of ultrastructure research**, v. 16, n. 3, p. 293-304, 1966.

LINO-NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Eurytomidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 28, n. 4, p. 253-259, 1999.

LINO-NETO, J.; DOLDER, H. Ultrastructural characteristics of the spermatozoa of Scelionidae (Hymenoptera, Platygastroidea) with phylogenetic considerations. **Zoologica Scripta**, v. 30, n. 2, p. 89-96, 2001.

MERCATI, D.; GIUSTI, F.; DALLAI, R.. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). **Journal of morphology**, v. 270, n. 7, p. 825-833, 2009.

MOTZKO, D.; RUTHMAN, A. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 33, p. 205-216, 1984.

NAME, K. P. O. Análise morfológica das espermatídes e espermatozoides de *Crhysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Brasília. 2008.

NAME, K. P. O.; PUJOL-LUZ, J. R.; BÁO, S. N. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Micron**, v. 41, n. 7, p. 853-860, 2010.

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.

PANIZZI, A. R. WILD HOSTS OF PENTATOMIDS: Ecological Significance and Role in Their Pest Status on Crops. **Annu. Rev. Entomol.** v. 42 p. 99–122, 1997.

PANIZZI, A. R.; J. E. McPHERSON; D. G. JAMES; M. JAVAHERY & R. M. McPHERSON. 2000. Stink bugs (Pentatomidae), p. 421–474. In: C. W. Schaefer & A. R. Panizzi (eds.), **Heteroptera of economic importance**. Boca Raton. CRC Press. p. 828

PEROTTI, M.E. Ultrastructure of the mature sperm of *Drosophila melanogaster* Meig. **Journal of submicroscopic cytology**, v.1 p. 171-196, 1969.

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.

PRATT, S. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of an hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. **Comparative Spermatology**, p. 301-311, 1970.

REBAGLIATI, P. J. et al. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. **Journal of zoological systematics and evolutionary research**, v. 43, n. 3, p. 199-213, 2005.

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.

SCHAEFER, W. C.; PANIZZI, A. R., 2000: Heteroptera of Economic importance. **Boca Raton, FL: CRC Press, LLC**, 824p.

SCHUH, T. T.; SLATER, J.A. True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera) Classification and natural history, **Cornell UNIVERSITY press**, Ithaca, New York, xii, 338 pp., 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*: IV. Nuclear transformation. **Journal of ultrastructure research**, v. 48, n. 2, p. 284-303, 1974.

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

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

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, n. 5, p. 521-534, 1993.

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

YASUZUMI, G., SUGIOKA, T., TSUBO, I., MATANO, Y. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 109, n. 4, p. 450-464, 1970.