

Emi Rosane Silistino de Souza

**Investigação comparativa de espermátides de quatro infraordens de
Heteroptera, com ênfase nos aspectos ultraestruturais**

São José do Rio Preto
2020

Emi Rosane Silistino de Souza

**Investigação comparativa de espermátides de quatro infraordens de
Heteroptera, com ênfase nos aspectos ultraestruturais**

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

Financiadora: CAPES e CNPq Proc.
141682/2016-7

Orientadora Profª. Dra. Maria Tercília Vilela de
Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto
2020

S729i

Souza, Emi Rosane Silistino de

Investigação comparativa de espermátides de quatro infraordens de Heteroptera, com ênfase nos aspectos ultraestruturais / Emi Rosane Silistino de Souza. -- São José do Rio Preto, 2020

45 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

1. Ciências da vida. 2. Espermatogenese. 3. Inseto. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Emi Rosane Silistino de Souza

Investigação comparativa de espermátides de quatro infraordens de Heteroptera, com ênfase nos aspectos ultraestruturais

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

Financiadora: CAPES e CNPq Proc. 141682/2016-7

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
IBB/UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Luis Lenin Vicente Pereira
UNIJALES – Jales, SP

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

Prof.^ª Dr.^ª Rita Luiza Peruquetti
UNISAGRADO – Bauru, SP

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2020

Agradecimento

Agradeço à minha mãe Rosana Silistino Souza e ao meu pai Joaquim Célio de Souza, ambos exemplos e referências na minha vida. Apoiaram-me durante todas as dificuldades e comemoraram todas as conquistas comigo.

Em especial à minha mãe por ter me ensinado as técnicas que utilizei desde o Bacharelado até a Pós-graduação, sem ela tudo teria sido um milhão de vezes mais difícil!

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

À minha filha Mila Rosani Silistino, que com sua alegria ilumina todos os meus dias e que foi base pra tudo que construí.

Ao meu companheiro Rauan Beijo Liberato que foi suporte e consolo nos momentos difíceis e motivação em todas as etapas! Sua empatia, amor e carinho foram essenciais!

Ao meu melhor amigo e companheiro Fernando Cesar Silva Junior, que apesar de nossos caminhos terem divergido na reta final, continuamos seguindo juntos e shallow now. Onze anos com você ainda é pouco! Gratidão por tudo!

Aos amigos Tatiani Seni de Souza Firmino e Luís Lenin Vicente Pereira por todo apoio e incentivo durante todos esses anos, em especial nessa reta final, e pela amizade e risadas. Com certeza me ajudaram a seguir em frente!

Agradeço em especial ao Jose Augusto Maulim (Zé) e Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca), técnicos do laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ambos acolheram a mim e minha filha com muito carinho quando iniciei o mestrado e ao pesquisar a semana toda, levava a minha filha comigo. Foram empáticos, carinhosos, simpáticos e essenciais para essa pesquisa. Deixo aqui um agradecimento saudoso desses bons momentos!

À minha orientadora profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azer Oliveira, por ter me acolhido com tanto carinho e respeito. Tornou todo esse processo mais leve, sou muitíssimo grata!

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, ao qual agradeço.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir (1958, p. 243)

RESUMO

A subordem Heteroptera possui uma enorme diversidade de insetos distribuída em sete infraordens, dentre as quais utilizamos Gerromorpha, Nepomorpha, Cimicomorpha e Pentatomomorpha. As espécies que foram estudadas da primeira infraordem, representando os insetos semi-aquáticos, são *Limnogonus aduncus* e *Mesovelia mulsanti*, da segunda infraordem, representando os aquáticos, são *Belostoma anurum*, *Martarega* sp. e *Buenoa unguis*, da terceira infraordem *Zelus* sp. e *Teleonemia* sp. e da última infraordem, representando juntas os terrestres, são *Largus* sp., *Stenocoris* sp., *Zicca pulchra* e *Dysdercus* sp. para descrever as ultraestruturas de suas espermátides e posterior comparação. Durante o processo de espermiogênese em geral, ocorre uma série de modificações nas espermátides antes dessas serem transformadas em espermatozoide, inclusive nos insetos. Neste trabalho verificamos por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão, as modificações ocorridas nas espermátides das infraordens anteriormente mencionadas. Na maioria dos insetos com hábitat aquático foi identificada uma maior variação morfológica com relação aos derivados mitocondriais, apresentando-se tanto com simetria reniforme, com simetria e padrão diferente, quanto com assimetria. Com relação aos terrestres, foi identificado predominantemente um padrão morfológico reniforme com uma área de cada derivado mitocondrial menor que a do axonema. Somente a espécie *B. unguis*, de hábitat aquático, evidenciou um padrão atípico, assimétrico, de derivados mitocondriais, com relação ao comumente observado na subordem Heteroptera. Ao longo da espermiogênese foi verificada a presença de manchete ao redor do núcleo e do acrossomo nas espécies *M. mulsanti*, *L. aduncus*, *Teleonemia* sp. e *Z. pulchra*, com padrão de distribuição dos microtúbulos diferente entre os insetos de hábitat aquático e terrestre. Outra característica observada foi a presença de um forame no interior do acrossomo de *M. mulsanti*, *L. aduncus*. As variações para as características analisadas no presente trabalho podem ser utilizadas como ferramentas importantes para auxiliar em análises sistemáticas.

Palavras-chave: ultraestrutura, derivado mitocondrial, manchete, acrossomo,
Hemiptera

ABSTRACT

The suborder Heteroptera has an enormous diversity of insects distributed in seven infraorders, among which Nepomorpha, Gerromorpha, Pentatomomorpha e Cimicomorpha, The species that have been studied from the first infraorder, representing semi-aquatic insects, are *Limnogonus aduncus* and *Mesovelgia mulsanti*, from the second order, representing the aquatic ones, *Belostoma anurum*, *Martarega* sp. and *Buenoa unguis*, from the third infraorder *Zelus* sp. and *Teleonemia* sp. and the last infraorder, representing terrestrials together, are *Largus* sp., *Stenocoris* sp., *Zicca pulchra* and *Dysdercus* sp. to describe the ultrastructures of their spermatides and further comparison. During the spermiogenesis process in general, a series of changes in spermatids occur before they are transformed into sperm, including in insects In this work we verified through Transmission Electron Microscopy, the changes occurred in the spermatids of the abovementioned infraorders. In the majority of insects with aquatic habitat, a greater morphological variation was identified in relation to mitochondrial derivatives, presenting both with reniform symmetry, with different symmetry and pattern, and with asymmetry. With respect to terrestrials, a predominantly reniform morphological pattern was identified with an area of each mitochondrial derivative smaller than the axoneme. Only the species *B. unguis*, of aquatic habitat, showed an atypical, asymmetric pattern of mitochondrial derivatives, in relation to that commonly observed in the suborder Heteroptera. Throughout spermiogenesis it was verified the manchette around the nucleus and the acrosome in the species *M. mulsanti*, *L. aduncus*, *Teleonemia* sp. and *Z. pulchra*, with different microtubule distribution pattern between aquatic and terrestrial habitat insects. Another characteristic observed was the presence of a foramen within the acrosome of *M. mulsant* and *L. aduncus*. The variations for the characteristics analyzed in the present work can be used as important tools to assist in systematic analyzes.

Keywords: ultrastructure, mitochondrial derivative, manchette, acrosome,
Hemiptera

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Aspectos Gerais da ordem Hemiptera e da subordem Heteroptera.....	11
1.2 Estudo da Espermiogênese de Insetos.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Coleta dos Insetos.....	18
3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	18
4 CAPÍTULO I. Espermiotaxonomia de quatro infraordens de Heteroptera, com ênfase nos derivados mitocondriais das espermátides.....	20
5 CAPÍTULO II. Distribution pattern of the microtubules of the manchete in the spermiogenesis of aquatic and terrestrial heteropterans (Hemiptera, Heteroptera)...	30
6 DISCUSSÃO GERAL.....	37
7 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Para a compreensão do presente trabalho, apresentamos a seguir uma explanação sobre a subordem Heteroptera, na qual pertencem todas as infraordens aqui estudadas, uma breve descrição das infraordens utilizadas e sobre a Microscopia Eletrônica de Transmissão, sua importância e objeto de estudo.

1.1 Aspectos Gerais da ordem Hemiptera e da subordem Heteroptera

A ordem Hemiptera possui uma monofilia evidenciada por dados morfológicos e moleculares (MISOF et al., 2014) e é composta por uma variedade de insetos com relação ao tamanho, morfologia e hábitos alimentares (MAIA, 2009). Esse grupo é caracterizado pela presença de peças bucais adaptadas à perfuração e sucção, localizadas em uma tromba ou bico, em adultos e ninfas (SCHUH; SLATER, 1995). Foram descritas mais de 100.000 espécies pertencentes a essa ordem ao redor do mundo (DALLAI et al., 2016) e se encontram distribuídas em quatro subordens: Heteroptera Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha (BOURGOIN et al., 1997).

Com relação aos grupos de insetos com metamorfose incompleta (ovo, ninfa e adulto), a subordem Heteroptera é uma das maiores e mais diversas, além de se encontrar amplamente dispersa no planeta, com exceção apenas dos polos e locais de alta altitude (SCHUH; SLATER, 1995). Os insetos dessa subordem são encontrados em ambientes terrestres, semi-aquáticos e aquáticos e podem possuir hábitos alimentares diversificados, como hematofagia, fitofagia ou predação de outros insetos (SCHUH; SLATER, 1995; VIANNA et al., 2003). A grande maioria dos insetos pertencentes a essa categoria, possui grande importância econômica, pois têm capacidade de afetar diretamente os humanos por meio de grandes danos às produções, como de frutos e grãos que são utilizados para consumo ou para produção de medicamentos; podem também

causar impactos na cadeia alimentar ou mesmo transmitir algumas doenças às plantas ou ainda serem vetores de agentes infecciosos. Algumas espécies são ectoparasitas de humanos e animais domésticos e poucas provocam sérias doenças aos humanos. Entretanto, muitas espécies podem ser benéficas ao homem, devido ao hábito predatório, atuando no controle biológico (SCHUH; SLATER, 1995).

A subordem é composta por sete infraordens: Cimicomorpha, Pentatomomorpha, Dipsocoromorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha, Nepomorpha e Enicocephalomorpha (WEIRAUCH; SCHUH, 2011), dentre as quais foram utilizadas quatro para representar os heterópteros aquáticos (Nepomorpha), semi-aquáticos (Gerromorpha) e terrestres (Pentatomomorpha e Cimicomorpha).

A infraordem Nepomorpha, a qual contém 11 famílias (SCHAEFER; PANIZZI, 2000) está representando os insetos aquáticos. A família Belostomatidae, conhecida popularmente como Barata-d'água, engloba predadores que podem atingir um tamanho enorme (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). As famílias Notonectidae e Corixidae apresentam importância econômica, pois atuam como agentes de controle biológico de mosquitos, larvas e pupas de insetos hematófagos vetores da ordem Diptera, além de servirem como alimento para alguns peixes, anfíbios, aves e morcegos (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Representando os insetos semi-aquáticos, a infraordem Gerromorpha se divide em oito famílias, contendo cerca de 150 gêneros e 1670 espécies (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Velidae (720) e Gerridae (620) são as famílias pertencentes a essa infraordem que possuem uma maior riqueza de espécies (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Os espécimes deste grupo são principalmente predadores e detritívoros e estão adaptados à vida na superfície da água, cujas adaptações são pernas alongadas, musculatura possibilitando uma locomoção especializada e estrutura torácica modificada (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Esses insetos parecem ser vulneráveis a certos tipos de poluições, cujo tamanho populacional flutua de acordo com o ambiente, podendo, assim, refletir mudanças na área e na qualidade das zonas úmidas. Além disso, algumas espécies

são importantes economicamente, pois são pragas de plantações de arroz (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

Com relação à infraordem Pentatomomorpha, representando os insetos terrestres, por englobar a maioria das espécies fitófagas, divididas entre quarenta e duas famílias (WEIRAUCH; SCHUH, 2011) é principalmente conhecida por ser praga de plantas, incluindo as de importância econômica (SCHUH; SLATER, 1995). A maioria dos indivíduos deste grupo se alimenta da parte reprodutiva da planta, como flores, óvulos, ovários e sementes (SCHAEFER; PANIZZI, 2000), entretanto, alguns indivíduos se alimentam de fungo ou do sistema vascular da planta (SCHUH; SLATER, 1995). Algumas espécies da pequena família fitófaga Alydidae causam danos a cultivos nos Trópicos e parte da Ásia (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). A família Lygaeidae, com espécimes de cores aposemáticas, não constitui um grupo monofilético e seus espécimes se alimentam especialmente de sementes (SCHAEFER; PANIZZI, 2000). A família Coreidae comporta indivíduos primariamente, mas não exclusivamente fitófagos, e se encontram concentrados nos trópicos diminuindo gradualmente sua presença em áreas temperadas sementes (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

A infraordem Cimicomorpha, também representando os insetos de habitat terrestre, inclui as maiores famílias de percevejos verdadeiros (SCHUH; SLATER, 1995): Miridae e Reduviidae, além de outras 14 famílias (SCHUH; SLATER, 1995). Os insetos pertencentes a esse grupo possuem uma ampla variedade de adaptações a diversos habitats e hábitos alimentares, como predação, hematofagia e fitofagia (SCHUH; SLATER, 1995; WEIRAUCH; SCHUH, 2011). As famílias Miridae e Tingidae, ao contrário de diversos insetos da infraordem Pentatomomorpha, causam danos principalmente às partes não reprodutivas da planta, fazendo com que seja necessária a utilização de técnicas para a realização de reparos (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000). Já a família Reduviidae é considerada o maior grupo de predadores dentro da subordem Heteroptera (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

1.2 Estudo da Espermiogênese de Insetos

Os testículos de insetos são constituídos por um ou vários folículos (lobos) contendo vários cistos, dentro dos quais ocorre a espermatogênese (PHILLIPS, 1970; SOUZA et al, 2007). Durante este evento o número de cromossomos é reduzido à metade por meio de divisões meióticas, formando ao final os espermatozoides (LINO-NETO, 1993; JAMIESON et al, 1999). A espermatogênese pode ser dividida nas fases meióticas (meioses I e II), onde as espermatogônias originam um conjunto de espermátides interconectadas e na fase da espermiogênese, na qual as espermátides jovens, que inicialmente apresentam núcleo centralizado, esférico e com cromatina dispersa homoganeamente (LANDIM, 2009), passam por várias transformações morfológicas sincronicamente, originando desta forma os espermatozoides (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; QUAGIO-GRASSIOTO; LELLO, 1996; JAMIESON et al, 1999).

Os espermatozoides são finos, alongados e compostos pela região da cabeça e cauda (QUICKE, 1997). são altamente especializados e diversificados (JAMIESON, 1987; JAMIESON et al., 1999) e os dos insetos, segundo Dallai et al. (2006), possuem uma maior variabilidade em sua estrutura, podendo diversificar quanto à presença de flagelo e tamanho, quanto ao tamanho de poucos micrômetros até seis cm de comprimento. Segundo Phillips (1970), podem variar também quanto à forma e organização ultraestrutural.

A pesquisa acerca do desenvolvimento dos espermatozoides – espermiogênese - de insetos em nível ultraestrutural iniciou-se em 1970, com o aperfeiçoamento dos métodos de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para material biológico (PHILLIPS, 1970; BACCETTI, 1972; MESSIAS JR., 1990). Os METs foram desenvolvidos devido à resolução limitada da imagem em microscópios de luz (WILLIAMS; CARTER, 1996).

Os trabalhos realizados com foco no estudo da espermiogênese e da estrutura do espermatozoide de vertebrados e invertebrados têm aumentado ao longo dos anos e muitos trabalhos foram publicados sobre o assunto, como os de

Baccetti et al. (1979), no qual estudaram o axonema de vertebrados e invertebrados; de Jamieson (1983), que estudou o espermatozoide de anelídeo ultraestruturalmente; de Fernandes et al. (1998), em que foi estudado o papel do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático na espermiogênese de inseto; de Aires et al. (2000), onde as etapas da espermiogênese de peixe Piracanjuba foram estudadas; de Al-Dokhi (2009), que analisou a vesícula acrossomal durante a espermiogênese de réptil; de Foata et al. (2012), cujo trabalho é em relação à espermiogênese de um parasita de peixe; de Santos et al. (2013), onde estudaram a morfologia do espermatozoide de insetos e Dallai (2014), no qual analisou a espermatogênese e a estrutura do espermatozoide de insetos.

Os trabalhos desenvolvidos nessa área têm investigado a formação do acrossomo por meio da vesícula pró-acrossomal; o axonema e o padrão de conformação dos microtúbulos; o desenvolvimento das mitocôndrias em complexo mitocondrial (ultraestrutura também conhecida pelo termo *Nebenkern*) e, posteriormente, em derivados mitocondriais em algumas espécies de Heteroptera, como *Gerris najas* (Gerridae) (WERNER; WERNER, 1993), *Notonecta glauca* (Notonectidae) (WERNER et al., 1988), *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001), em espécies da família Pentatomidae (ARAUJO et al., 2011; TRANDABURU, 1973; FERNANDES et al., 1998), Reduviidae (DOLDER, 1988; BÁO et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2019), em Heteroptera aquáticos (AFZELIUS et al., 1976; LEE, 1991; LEE; LEE, 1992, PEREIRA et al., 2015), e em insetos pertencentes às infraordens Leptopodomorpha (AFZELIUS et al., 1985), Cimicomorpha, Gerromorpha e Pentatomomorpha (DALLAI; AFZELIUS, 1980; ARAUJO et al., 2011), além de diversas outras.

Além da descrição do desenvolvimento do espermatozoide, as pesquisas relacionadas ao estudo da espermiogênese de insetos, buscam também características sinapomórficas dos grupos, dentre as quais podemos citar a quantidade e morfologia dos derivados mitocondriais – cuja variação pode ocorrer entre as espécies, a quantidade de estruturas paracristalinas no interior dos derivados mitocondriais, a morfologia e posição do acrossomo e o padrão dos microtúbulos do axonema 9+9+2, sendo um par de microtúbulos centrais e ao

redor destes, nove duplas periféricas e nove microtúbulos acessórios mais externos a esses (FAWCETT et al, 1970; LINO-NETO; DOLDER, 2001; ARAÚJO, 2011 e 2012; DALLAI, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

No presente trabalho o objetivo foi descrever as características ultraestruturais da espermiogênese e do espermatozoide de espécimes das famílias Belostomatidae, Notonectidae (Nepomorpha) com hábitat aquático, Gerridae, Mesoveliidae (Gerromorpha) com hábitat semi-aquático e Reduviidae, Tingidae (Cimicomorpha), Lygaeidae, Alydidae e Coreidae (Pentatomomorpha) com hábitat terrestre, além de comparar os dados obtidos entre as famílias e infraordens.

2.2 Objetivos específicos

Analisar e comparar ultraestruturalmente a porção anterior e posterior das espermátides durante a espermiogênese de diferentes famílias, infraordens e hábitats;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos insetos

Foram coletados espécimes de cada uma das seguintes espécies: *Belostoma anurum* (Belostomatidae: Nepomorpha), *Martarega* sp., *Buenoa unguis* (Notonectidae: Nepomorpha), *Limnogonus aduncus* (Gerridae: Gerromorpha), *Mesovelia mulsanti* (Mesoveliidae: Gerromorpha), *Zelus* sp. (Reduviidae: Cimicomorpha), *Teleonemia* sp. (Tingidae: Cimicomorpha), *Largus* sp. (Lygaeidae: Pentatomomorpha), *Stenocoris* sp. (Alydidae: Pentatomomorpha), *Zicca pulchra* (Coreidae: Pentatomomorpha) e *Dysdercus* sp. (Pyrrhocoridae: Pentatomomorpha), até atingir a quantidade de cinco exemplares machos por espécie.

As coletas dos espécimes foram realizadas em São José do Rio Preto – SP (20° 49' 12" S, 49° 22' 44" O), Bálsamo (20° 44' 06" S 49° 35' 02" O), e Olímpia (20° 44' 13" S 48° 54' 54" O) e região. As fêmeas foram separadas e devolvidas ao habitat, enquanto que os machos foram levados ao microscópio estereoscópico para extração dos testículos.

3.2 Preparo do Material para Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os testículos dos indivíduos adultos foram extraídos, fixados com Karnovsky por 24 horas, para então serem lavados duas vezes em tampão Millonig. A pós-fixação foi realizada com Tetróxido de Ósmio a 1%: Millonig (1:3), durante 2 horas na geladeira. No período seguinte, o material foi lavado em água bidestilada, em seguida, desidratado em uma sequência de soluções com concentrações de acetona crescendo progressivamente até atingir 100%. Posteriormente, seguiu-se a pré-infiltração em araldite:acetona (1:1) *overnight* em temperatura ambiente, logo após, a infiltração em araldite por 2 horas a 37°C. A inclusão ocorreu em araldite e o material permaneceu por dois dias completos a

60°C. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e, depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1 N (VENABLE; COGGESHALL, 1965). As imagens foram obtidas no MET Jeol JEM – 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

4 CAPITULO I

Espermiotaxonomia de quatro infraordens de Heteroptera, com ênfase nos derivados mitocondriais das espermátides

Emi Rosane Silistino-Souza¹, Mary Massumi Itoyama¹, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira¹

¹Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas- UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus São José do Rio Preto, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética de Insetos.

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Bairro: Jardim Nazareth,
15054-000 - São José do Rio Preto, SP

Resumo

A subordem Heteroptera é um grupo bastante numeroso e diverso tanto morfológicamente quanto em relação ao hábitat. Assim, foram utilizadas onze espécies pertencentes a dez famílias diferentes de Heteroptera para representar quatro infraordens, sendo elas Nepomorpha, de hábitat aquático, Gerromorpha, semi-aquático e as terrestres Pentatomomorpha e Cimicomorpha, com a finalidade de observar a morfologia dos derivados mitocondriais das respectivas espermátides. Análises ultraestruturais de espermátides, durante a espermiogênese *Mesovelgia mulsanti* (Mesoveliidae), *Martarega* sp. (Notonectidae), *Limnogonus aduncus* (Gerridae), *Dysdercus* sp. (Pyrrhocoridae), *Largus* sp. (Lygaeidae), *Belostoma anurum* (Belostomatidae), *Zelus* sp. (Reduviidae), *Stenocoris* sp. (Alydidae), *Teleonemia* sp. (Tingidae) e *Zicca pulchra* (Coreidae) mostraram na região caudal dois derivados mitocondriais circundando bilateralmente um axonema de modo simétrico e ao traçar uma reta em cima do par central de microtúbulos do axonema, verificamos que os derivados se posicionam simetricamente a partir dessa reta envolvendo até a região do terceiro par de microtúbulos periféricos. Dentre as espécies com derivados mitocondriais simétricos, *B. anurum* – a única de hábitat aquático, *Zelus* sp., *Stenocoris* sp., *Teleonemia* sp. e *Z. pulchra*, essas apresentam também os derivados com formato padrão reniforme. Já as outras espécies com simetria, *M. mulsanti*, *Martarega* sp., *L. aduncus*, *Dysdercus* sp. e *Largus* sp. – sendo somente as duas últimas de hábitat terrestre, apresentaram seus derivados mitocondriais com tamanhos e formatos atípicos, diferentes do reniforme anteriormente mencionado. *B. unguis*, de hábitat aquático, evidenciou um padrão atípico de derivados mitocondriais, com relação ao comumente observado na subordem Heteroptera, de formato exclusivamente assimétrico. Essas variações morfológicas específicas nas espermátides fornecem dados particularmente importantes para análises taxonômicas e filogenéticas futuras em Heteroptera.

Palavras-chave: ultraestrutura, Hemiptera, espermiogênese.

Introdução

A subordem Heteroptera é de rica diversidade, além de se encontrar dispersa em todo o planeta, com exceção dos polos (SCHUH; SLATER, 1995). Esse grupo é dividido em sete infraordens (WEIRAUCH; SCHUH, 2011), dentre as quais Nepomorpha, Gerromorpha, Cimicomorpha e Pentatomomorpha.

Dados morfológicos, em especial do espermatozoide devido a sua grande variação, podem auxiliar na investigação filogenética e taxonômica (OLIVEIRA et al., 2019). As investigações ultraestruturais, como um fator comparativo entre espécies, vêm sendo utilizadas em diversas pesquisas como as de Araujo et al. (2010, 2011) com Heteroptera e Auchenorrhyncha, Dallai et. al (2016) com diversos grupos de insetos, Santos e Lino-Neto (2018) com Heteroptera, dentre outros.

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

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

Assim, devido à importância dos derivados mitocondriais para os espermatozoides, comparamos a morfologia dessas ultraestruturas em diferentes espécies, com a finalidade de aumentar o conhecimento da biologia reprodutiva de heteropteras de diferentes habitats e de diferenciar as infraordens e seus subgrupos.

Material e métodos

As espécies espécies *Mesovelia mulsanti* (Mesoveliidae), *Martarega* sp. e *Buenoa unguis* (Notonectidae), *Limnogonus aduncus* (Gerridae), *Dysdercus* sp. (Pyrrhocoridae), *Largus* sp. (Lygaeidae), *Belostoma anurum* (Belostomatidae), *Zelus* sp. (Reduviidae), *Stenocoris* sp. (Alydidae), *Teleonemia* sp. (Tingidae) e *Zicca pulchra* (Coreidae) tiveram o testículo de seus cinco exemplares cada

extraídos e fixados em Karnovsky por 24h. Após, duas lavagens em tampão Millonig e pós-fixação em Tetróxido de Ósmio à 1%: Millonig (1:3), por 2 h. Então, foram lavados em água bidestilada e desidratados em concentrações crescentes de acetona. O material foi pré-infiltrado em araldite:acetona (1:1), durante 24h, em temperatura ambiente, infiltrado em araldite, por 2 h a 37°C, e incluído em araldite por 48 h a 60°C. Os cortes ultrafinos foram coletados em *grids* e, contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos e depois em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1 N, por 6 minutos. As imagens foram obtidas por meio do Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM – 100 CXII da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Resultados

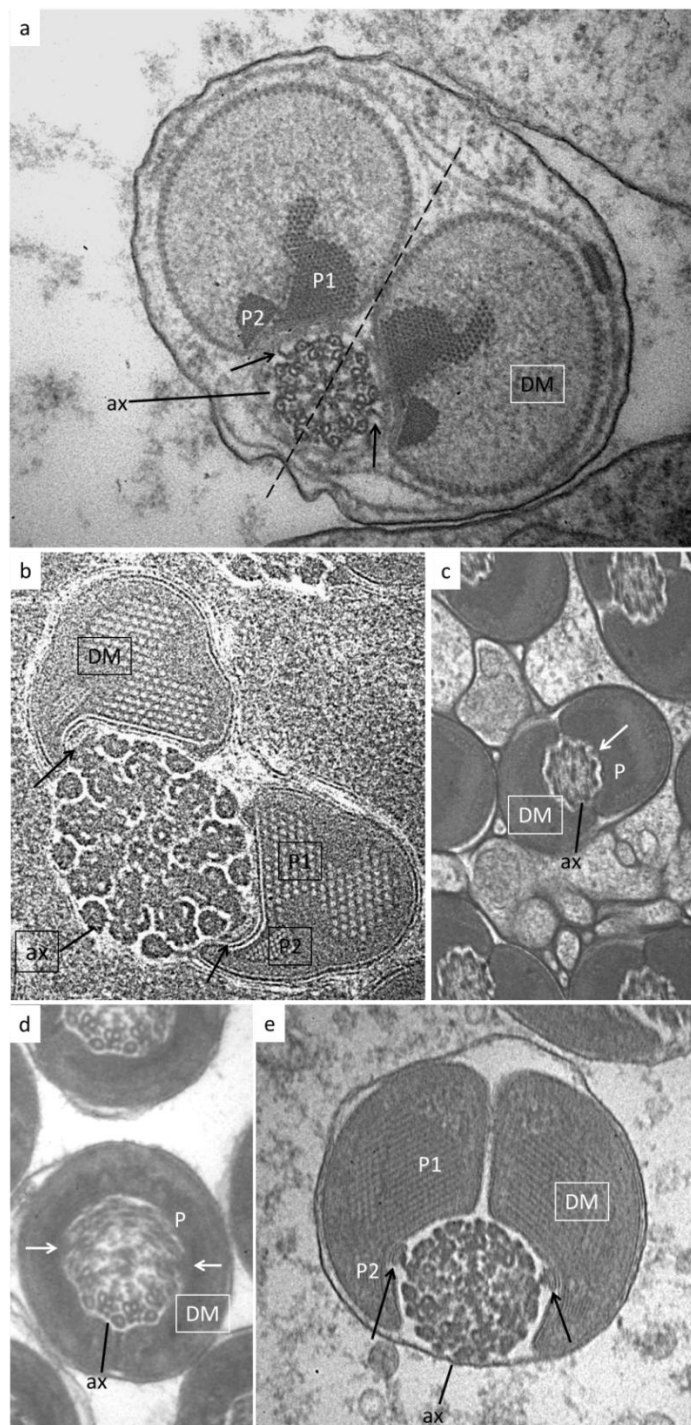
Todos os cortes transversais do flagelo das espermatídes analisadas (Figuras 1, 2 e 3) apresentaram dois derivados mitocondriais dispostos bilateralmente ao axonema, enquanto que os corpos acessórios estavam ausentes, além de duas pontes opostas conectando os derivados mitocondriais aos microtúbulos do axonema. Outra característica observada foi a presença de uma ou mais estruturas paracristalinas no interior dos derivados mitocondriais.

Nas onze espécies observadas no presente estudo, foi identificado um padrão em que ao traçar uma reta em cima do par central de microtúbulos do axonema, verificamos que os derivados mitocondriais se posicionam simetricamente a partir dessa linha envolvendo até a região do terceiro par de microtúbulos periféricos seguintes a essa linha traçada (Figura 1a,b,e e Figura 2a-e), com exceção de *Martarega* sp. e *M. mulsanti* (Figura 1c,d), cujos derivados envolvem completamente o axonema.

Em cinco espécies foram identificados derivados mitocondriais simétricos, porém com formas e tamanhos diversos, como em *M. mulsanti*, cujos derivados achatados envolvem completamente o axonema (Figura 1d); *Martarega* sp., cujos derivados também envolvem completamente o axonema, porém apresentam-se mais arredondados na outra face (Figura 1c); *L. aduncus*, com derivados mitocondriais, cujas regiões que ficam próximas à reta sobre o par central são mais volumosas que a região oposta que envolve o axonema (Figura 1e); *Dysdercus* sp., com derivados mitocondriais arredondados e quatro vezes maiores que a área do axonema (Figura 1a) e em *Largus* sp., cujos derivados mitocondriais encontram-se mais afastados um do outro e a porção voltada para o axonema é maior, se afunilando repentinamente, conforme se afasta do axonema e aumentando novamente (Figura 1b). Nos casos citados acima, apenas dois possuem hábitat terrestre (*Dysdercus* sp. e *Largus* sp.).

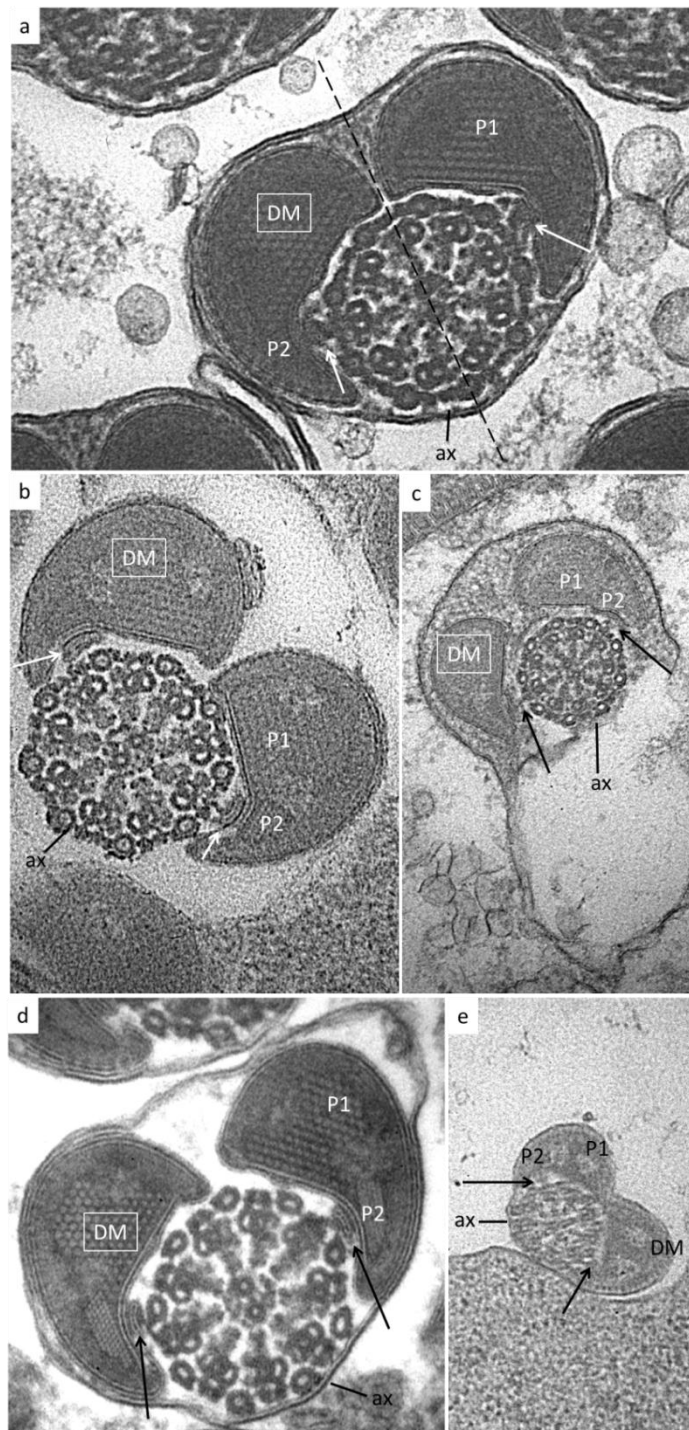
Nas outras cinco espécies, dentre as quais, somente uma possui hábitat aquático (*B. anurum*), as restantes hábitat terrestre (*Zelus* sp., *Stenocoris* sp., *Teleonemia* sp. e *Z. pulchra*), foram verificados derivados mitocondriais simétricos, reniformes e com uma área menor que a do axonema (Figura 2a-e).

Figura 1 - Cortes transversais de região caudal de espermátide de Pyrrhocoridae (a), Lygaeidae (b), Notonectidae (c), Mesoveliidae (d), Gerridae (e). a-e) derivados mitocondriais (DM) simétricos, entretanto com formatos e tamanhos atípicos conectados aos microtúbulos do axonema (ax) por duas pontes opostas (setas). P1, P2 e P: estruturas paracristalinas. Linha tracejada: reta passando sobre o par de microtúbulos central. Aumentos: 80.000x, 140.000x, 40.000x, 80.000x, 100.000x, respectivamente.



Fonte: produzida pela própria autora (2018).

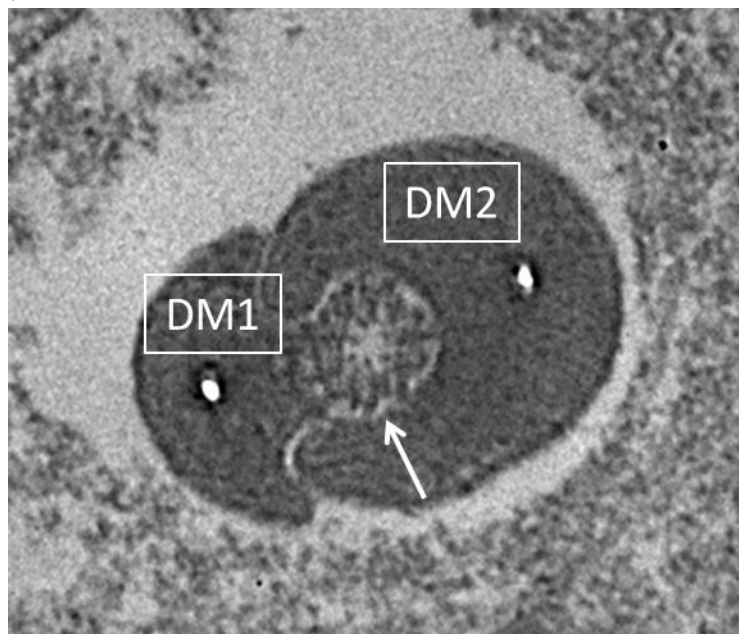
Figura 2 - Cortes transversais de região caudal de espermátide de Belostomatidae (a), Reduviidae (b), Tingidae (c), Alydidae (d), e Coreidae (e). a-e) Derivados mitocondriais (DM) simétricos e reniformes conectados aos microtúbulos do axonema (ax) por duas pontes opostas (setas). P1, P2 e P: estruturas paracristalinas. Linha tracejada: reta passando sobre o par de microtúbulos central. Aumentos: 140.000x, 140.000x, 67.000x, 140.000x, e 100.000x, respectivamente.



Fonte: produzida pela própria autora (2018).

Apenas em *B. unguis*, espécie aquática, foi identificado um padrão atípico com relação ao verificado em Heteroptera (Figura 3). Os derivados mitocondriais observados para essa espécie são notadamente assimétricos e possuem uma região circular no interior, assemelhando a uma perfuração. Um derivado mitocondrial é fungiforme e quase a metade do outro derivado, enquanto que o derivado maior aparenta estar englobando o axonema (Figura 3).

Figura 3 - Corte transversal de região caudal de espermátide de Notonectidae com derivados mitocondriais (DM1 e DM2) assimétricos circundando completamente o axonema (seta). Aumento: 27.000x.



Fonte: produzida pela própria autora (2018).

Na tabela 1 foi realizada uma análise comparativa com relação à morfologia dos derivados mitocondriais em diferentes famílias. Para a infraordem Gerromorpha foi verificado somente o padrão morfológico simétrico com formas e tamanhos diversos ($S \neq$), enquanto que para a infraordem Nepomorpha, a maioria das espécies analisadas (sete de onze) apresentou o padrão simétrico reniforme (SR) para os derivados mitocondriais, seguido de três espécies assimétricas (AS) e somente duas simétricas diferentes ($S \neq$). Com relação às infraordens contendo indivíduos terrestres, a Cimicomorpha apresentou cinco de oito espécies com padrão simétrico reniforme (SR), duas assimétricas (AS) e somente uma simétrica diferente ($S \neq$); já a infraordem Pentatomomorpha demonstrou valores iguais para o padrão simétrico reniforme (SR) e simétrico diferente ($S \neq$), sendo quatro espécies para cada e nenhum assimétrico foi encontrado até o momento.

Tabela 1 – Análise comparativa da morfologia de derivados mitocondriais de diferentes famílias de Heteroptera

Hábitat	Infraordem	Família	Gênero/espécie	SR	S≠	AS	Referência
Semi- Aquático	Gerromorpha	Gerridae	<i>Limnogonus aduncus</i>		X		Presente trabalho
		Hydrometridae	<i>Hydrometra</i> sp.		X		Dallai & Afzelius (1980)
		Mesovellidae	<i>Mesovelia mulsanti</i>		X		Presente trabalho
Aquático	Nepomorpha	Aphelocheiridae	<i>Aphelocheirus aestivalis</i>	X			Papáček & Soldán (2008)
		Belostomatidae	<i>Belostoma anurum</i>	X			Presente trabalho
		Belostomatidae	<i>Muljarus japonicus</i>	X			Lee (1992)
		Belostomatidae	<i>Diplonychus esakii</i>	X			Lee (1992)
		Corixidae	<i>Corixa</i> sp.			X	Dallai & Afzelius (1980)
		Gelastocoridae	<i>Gelastocoris flavus flavus</i>		X		Pereira et al. (2015)
		Nepidae	<i>Nepa cinerea</i>	X			Dallai & Afzelius (1980)
		Nepidae	<i>Ranatra unicolor</i>	X			Lee (1992)
		Nepidae	<i>Ranatra chinensis</i>	X			Lee (1992)
		Nepidae	<i>Laccotrephes japonensis</i>	X			Lee (1992)
		Notonectidae	<i>Martarega bentoii</i>			X	Novais et. al (2017)
		Notonectidae	<i>Martarega</i> sp.			X	Presente trabalho
		Notonectidae	<i>Buenoa unguis</i>			X	Presente trabalho
		Terrestre	Cimicomorpha	Anthocoridae	<i>Amphiareus constrictus</i>		
Anthocoridae	<i>Blaptostethus pallescens</i>					X	Santos (2018)
Cimicidae	<i>Cimex lecticularius</i>				X		Dallai & Afzelius (1980)
Tingidae	<i>Teleonemia</i> sp.			X			Presente trabalho
Reduviidae	<i>Zelus</i> sp.			X			Presente trabalho
Reduviidae	<i>Triatoma carcavalloii</i>			X			Oliveira et. al (2019)
Reduviidae	<i>Triatoma rubrovaria</i>			X			Oliveira et. al (2019)
Reduviidae	<i>Triatoma</i> sp.			X			Dallai & Afzelius (1980)
Terrestre	Pentatomomorpha	Alydidae	<i>Stenocoris</i> sp.	X			Presente trabalho
		Coreidae	<i>Zicca pulchra</i>	X			Presente trabalho
		Coreidae	<i>Gonocerus insidiator</i>	X			Dallai & Afzelius (1980)
		Lygaeidae	<i>Largus</i> sp.		X		Presente trabalho

Lygaeidae	<i>Lygaeus equestris</i>	X	Dallai & Afzelius (1980)
Pentatomidae	<i>Largus rufipenis</i>	X	Araújo (2012)
Plataspidae	<i>Coptosoma scutellatum</i>	X	Dias (2016)
Pyrrhocoridae	<i>Dysdercus</i> sp.	X	Presente trabalho

SR: Simétrico reniforme; S≠: Simétrico diferente; AS: Assimétrico. Fonte: produzida pela própria autora (2018).

Discussão

A ausência de corpos acessórios e presença de duas pontes opostas conectando os derivados mitocondriais aos microtúbulos do axonema identificadas em todos os heteropteras deste estudo podem representar possíveis sinapomorfias dessa ordem, segundo Dallai et al (2016). Outra característica observada que corrobora ao descrito anteriormente em Heteroptera, também segundo Dallai et. al (2016), é a presença de duas ou mais estruturas paracrystalinas no interior dos derivados mitocondriais.

Segundo Phillips (1970), os derivados mitocondriais assumem formas espécie-específicas. Entretanto, foi observado no presente trabalho que a maior variação morfológica dos derivados foi encontrada majoritariamente em insetos com hábitat aquático, enquanto que nos terrestres, foi possível identificar um padrão morfológico reniforme com uma área de cada derivado mitocondrial menor que a do axonema. Esse padrão reniforme corrobora ao encontrado por Oliveira et al. (2019) em Reduviidae (*T. carcavallo* e *T. rubrovaria*).

Entretanto, Dias et al. (2016) registraram um padrão morfológico dos derivados mitocondriais do inseto terrestre *C. scutellatum* (Plataspidae) semelhante ao identificado nesta pesquisa em *L. aduncus* (Gerridae), indicando não ter uma associação com o hábitat, necessariamente. Novais et al. (2017) registraram também derivados mitocondriais notadamente assimétricos em área e formato em *M. bentoi* (Notonectidae), sendo essa espécie pertencente à mesma família Notonectidae e infraordem Nepomorpha, assim como *B. unguis*. O padrão simétrico diferente identificado em *M. mulsanti* cujos derivados mitocondriais envolvem completamente o axonema, também foi verificado em *G. f. flavus* pertencente à outra infraordem de insetos aquáticos, Nepomorpha (Pereira et al., 2015).

Quando analisamos as informações agrupadas na tabela, identificamos apenas uma conformidade para a infraordem Gerromorpha, cujo padrão morfológico encontrado foi apenas simétrico com formas e tamanhos diversos, enquanto que para as outras infraordens, houve uma variação. Em Nepomorpha, tanto a família Belostomatidae quanto Nepidae apresentaram somente padrões simétricos reniformes, enquanto que Corixidae e Notonectidae apresentaram assimetria e simetria com forma e tamanho diversos. Em Cimicomorpha, as famílias Reduviidae e Tingidae apresentaram padrão simétrico reniforme, enquanto que a família Anthocoridae apresentou somente assimetria e a Cimicidae simetria com forma e tamanho diferentes. Na infraordem Pentatomomorpha não foi identificado nenhum indivíduo com derivados mitocondriais assimétricos.

Dentre todas as famílias analisadas para as diferentes infraordens, a única que apresentou uma variação interna foi Notonectidae, enquanto todos os outros indivíduos estiveram em conformidade com as outras espécies estudadas da mesma família. Assim, identificamos um padrão morfológico para as famílias, com exceção de Gerromorpha, cujas famílias apresentaram o mesmo padrão simétrico com formas e tamanhos variados.

Assim, os resultados possibilitaram a identificação de um padrão morfológico dos derivados mitocondriais específico para as famílias, independentemente do hábitat, com exceção da família Notonectidae, a qual apresentou variação interna. As famílias da infraordem Gerromorpha apresentaram o mesmo padrão morfológico, sendo uma possível característica da infraordem. Esses dados comparativos possibilitam a compreensão de aspectos morfológicos ultraestruturais em espermátides, contribuindo com análises taxonômicas e filogenéticas em Heteroptera.

Referências

ARAÚJO, V. A. et al. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). **Micron**, n. 42, v. 6, p. 560-567, 2011.

ARAÚJO, V. A.; BÃO, S. N.; LINO NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* L aporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, n. 2, v. 93, p. 239-244, 2012.

BÃO, S. N. et al. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon: Some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. **Journal of Structural Biology**, v. 109, p. 46-51, 1992.

DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. **Annual review of entomology**, v. 61, p. 1-23, 2016.

DIAS, G. et al. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. **Micron**, v. 82, p. 33-40, 2016.

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

NOVAIS, A. M.; DIAS, G.; LINO-NETO, J. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae). **Arthropod Structure & Development**, p. 1-9, 2017.

OLIVEIRA, M. L. R. D. et al. Spermatological Morphology of *Triatoma* Species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 20, p. 1-8, 2019.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Structure and development of the reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). **Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae**, n. 2, v. 48, p. 299 – 318, 2008.

PEREIRA, L. L. V. et al. Histological and ultrastructural analysis of spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, n. 4, v. 3, p. 1-6, 2015.

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

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

RUSSELL, L. K. et al. The sperm ultrastructure of *Caurinus dectes* Russell (Mecoptera: Boreidae) and its phylogenetic implications. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 6, p. 397-401, 2013.

SANTOS, A. B. R.; LINO-NETO, J.. Sperm morphology of predatory pirate bugs *Amphiareus constrictus* and *Blaptostethus pallescens* (Heteroptera: Anthocoridae) with phylogenetic inferences. **Micron**, v. 105, p. 18-23, 2018.

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

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

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 487-510, 2011.

WERNER, M. et al. Ultrastructure and motility pattern of the spermatozoa of *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). **Arthropod, Structure & Development**, v. 31, p. 243-254, 2002.

5 CAPITULO II

Distribution pattern of the microtubules of the manchete in the spermiogenesis of aquatic and terrestrial heteropterans (Hemiptera, Heteroptera)

Emi Rosane Silistino de Souza¹, Fernando Cesar Silva Junior¹, Mary Massumi Itoyama¹, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira¹

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Abstract

Several microtubules, called manchete, were identified by ultrastructural analysis of cross-sections of the anterior region of the sperm of the *Mesovelgia mulsanti*, *Limnogonus aduncus*, *Teleonemia* sp. and *Zicca pulchra*, surrounding the nucleus and acrosome at different stages of development. In the aquatic species *M. mulsanti*, *L. aduncus*, microtubules were observed around the nuclei, when the chromatin was filamentous; on the other hand, in the acrosomes a foramen was found inside each, in addition to possible tubules, giving a granular aspect to the content. Regarding terrestrial species *Teleonemia* sp. and *Z. pulchra*, this foramen was not found and only the filamentous aspect of chromatin was observed. A different pattern was observed in the arrangement of microtubules of the manchete for aquatic and terrestrial insects, which may be a specific morphological variation of clusters, in addition to being a new tool to be used in future taxonomic and phylogenetic analyzes in Heteroptera.

Keywords: nucleus, spermatid, spermatogenesis.

Short communication

The suborder Heteroptera presents an enormous numerical richness, in addition to a high diversity distributed throughout the planet, except only in the poles (SCHUH; SLATER, 1995). The variety goes beyond morphology, also covering the habitats and eating habits of these insects (SCHUH; SLATER, 1995; VIANNA et al., 2003).

Several events, which occur during sperm formation and microtubules accumulation, known as manchete, around the nucleus and acrosome, have been the target of study in multiple organisms, both vertebrates (SIMÓN et al., 2017) and invertebrates (SU et al., 2017).

Rattner and Brinkley (1972) suggested that the manchette, along with the chromatin condensation, causes changes in the morphology of the nucleus and that the variation in the quantity of these microtubules would be delimited by the number of available subunits and "connection points" in the nucleus. The manchette interactions with proteins have also been studied, such as CLIP-170, by Akhmanova et al. (2005), and Arp1, by Fouquet et al. (2000).

Due to the importance of the manchette for the formation of sperm and, consequently, the success in reproduction, we portray in this work the presence of the manchette and other morphological characteristics during spermatogenesis in heteropterans belonging to different infraorders.

The testicles of five individuals of each species were extracted (*Mesovelgia mulsanti* - Mesoveliidae, *Limnogonus aduncus* - Gerridae, *Teleonemia* sp. - Tingidae e *Zicca pulchra* - Coreidae), which were then fixed at Karnovsky for 48 hours. Afterwards, two washes in Millonig buffer and post-fixation in 1% Osmium Tetroxide: Millonig (1: 3), for 2 hours were made. Then, they were washed in double distilled water and dehydrated in increasing concentrations of acetone. The material was pre-infiltrated in araldite:acetone (1:1), overnight, at room temperature, infiltrated in araldite, for 2 hours at 37°C, and included in araldite for 48 hours at 60°C. The ultrafine cuts were collected in grids and contrasted with 2% uranyl acetate, for 20 min and then in 2% lead citrate, in 1 N sodium hydroxide solution, for 6 min. The images were obtained using the Jeol JEM - 100 CXII Transmission Electron Microscope, from Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Cross cuts of the anterior portion of *M. mulsanti*, *L. aduncus*, representing the semi-aquatics insects and *Teleonemia* sp. and *Z. pulchra*, representing the terrestrial ones, analyzed (Figure 1) presented several microtubules surrounding the nucleus and the acrosome. At first, in spermiogenesis, the chromatin has a filamentous aspect, as evidenced in *M. mulsanti* (Figure 1a), *Teleonemia* sp. (Figure 1e) and *Z. pulchra* (Figure 1f), which gradually compacts itself until it acquires a more homogeneous appearance. This filamentous aspect of the chromatin was also observed in the grasshopper *Melanoplus* sp. (Fawcett et al., 1971) and in the bug *Euchistus heros* (Fernandes et al., 2001).

At this stage, we can already observe a series of microtubules surrounding the nucleus, which was next to the acrosome in *Teleonemia* sp. (Figure 1e) and *Z. pulchra* (Figure 1f). The presence of manchette identified in *M. mulsanti*, *L. aduncus*, *Teleonemia* sp. and *Z. pulchra* was previously identified in other insects, such as *Gerris remigis* (Heteroptera) (TANDLER; MORIBER, 1965), *Toxorhynchites brevialpis*, *Culex quinquefasciatus*, *C. thalassius*, *Aedes aegypti*, *Anopheles ganbiae arabiensis* (Diptera) (NDIAYE et al., 1997) and *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera) (SU et al., 2017).

Ndiaye et al. (1997) found four variations of the arrangement of manchette microtubules in diptera, which, according to the researchers, seemed to be specific to each genus analyzed. From the patterns identified, none are similar to those observed in the species of this work, which were not related to genus.

However, we observed a variation between aquatic insects, which presented a single row of individual microtubules completely surrounding the

nucleus and the acrosome with a membrane trapping them in a delimited space. In terrestrial species, we observed more than one row of individual microtubules and regions around the acrosome and nucleus without microtubules and without the membrane analyzed in other species. The pattern observed in aquatic individuals corroborates with the identified in *Gerris remigis* by Tandler and Moriber (1965).

According to Cole et al. (1988), it is possible that the manchette acts as a gradual constriction mold and, according to Su et al. (2017), the role of the manchette could be related to the change in the shape of the nucleus and the construction of the acrosome morphology.

We observed that the acrosome, besides having a row of microtubules around it, had a granular aspect in its content in *M. mulsanti* (Figure 1b) and *L. aduncus* (Figure 1c, d) and a more homogeneous and compact in *Teleonemia* sp. and *Z. pulchra* (Figure 1e, f, respectively). In Figure 1d, we identified on the internal margin of the acrosome a series of microtubules that are much smaller than the microtubules that were surrounding it externally, while the content, although granular, was more homogeneous.

Only in the aquatic species *M. mulsanti* and *L. aduncus* we identified a foramen in the acrosome (Figure 1b-d) of small dimension in Figures 1b,c and much larger in Figure 1d.

The granular appearance inside the acrosome and the foramen observed in *M. mulsanti* and *L. aduncus* were also identified in *Gerris remigis* by Tandler and Moriber (1966) and in *Hydrometra* sp. (Heteroptera) by Dallai and Afzelius (1980) – these insects also share the aquatic habitat. According to the researchers of both works, the granulation observed are tubules inside the acrosome, positioned longitudinally. According to Tandler and Moriber (1965), this arrangement of tubules may be related to the rigidity of the acrosome. While cytoplasmic microtubules, in addition to mechanical support, could act as an intracellular transport system. Also according to these researchers, the tubules found inside the acrosome would be transitory and would later be replaced by fibrous elements that would differentiate into a relatively homogeneous material.

In Figure 1b, we see a region (inside the ellipse) of the membrane that surrounds the microtubules and the acrosome, invaginating in a peculiar way, with a small portion of content similar to the acrosome between it and the membrane. In Figure 1c, we also see a differentiated region, in which the acrosome membrane is connected to the membrane that surrounds the microtubules, leaving no space for them. Only in this region the membrane cease to be curved to appear straight, making Figure 1c appear to be a continuation of the process initiated in Figure 1b.

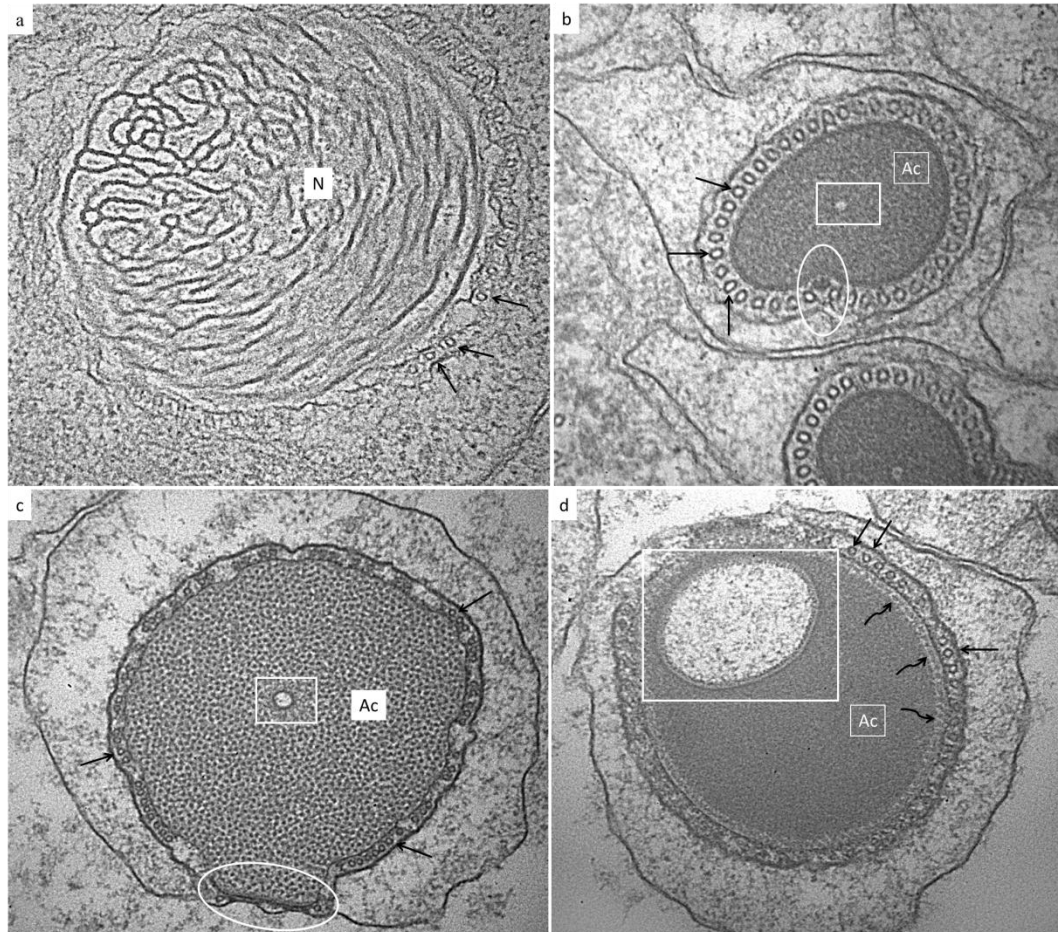
Tandler and Moriber (1966) called “weld spots” the place where the plasma membrane is in juxtaposition to the acrosomal membrane, a phenomenon that we clearly observed in *L. aduncus* and what could be the beginning of this event in *M. mulsanti*. The function of this “weld spots” has not yet been elucidated.

In the aquatic species *M. mulsanti* (Figure 1a,b) and *L. aduncus* (Figure 1c,d), the manchette has only one row of microtubules with space between them, without connection, but with a membrane that keeps them, while in the terrestrial species *Teleonemia* sp. (Figure 1e) and *Z. pulchra* (Figure 1f), the microtubules,

although also individual, are grouped in more than one line and do not completely surround the nucleus and the acrosome, presenting regions free of microtubules and without a membrane that holds them in a limited space.

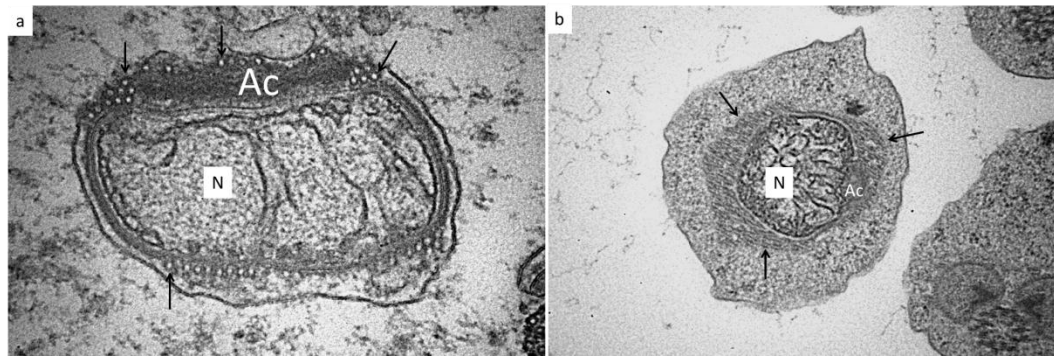
The results allowed us to identify a specific variation in the manchete of aquatic insects in relation to the terrestrial. These comparative data make it possible to understand morphological ultrastructural aspects in spermatids, contributing to taxonomic and phylogenetic analyzes in Heteroptera.

Figure 1 - Cross cuts of the sperm nucleus of semi-aquatics insects *M. mulsanti* (a,b) and *L. aduncus* (c,d). a) Nucleus (N) containing filamentous chromatin and surrounded by microtubules (arrows); b) Acrosome (Ac) containing content with granular aspect and surrounded by microtubules; c) Acrosome with the interior containing a very granular appearance and surrounded by microtubules; d) Acrosome with the interior apparently more homogeneous and surrounded by microtubules. Rectangle: foramen; Ellipse: differentiated region; Curved arrows: microtubules. Increases: 80,000x, 100,000x, 50,000x and 67,000x, respectively.



Source: produced by the author (2018).

Figure 2 - Cross cuts of the sperm nucleus of terrestrial insects *Teleonemia* sp. (a) e *Z. pulchra* (b). a-b) Nucleus (N) with filamentous chromatin, surrounded by microtubules (arrows) and located next to the acrosome (Ac). Increases: 67,000x and 40,000x, respectively.



Source: produced by the author (2018).

References

AKHMANOVA, A. et al. The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis. **Genes & Development**, v. 19, p. 2501–2515, 2005.

CHAWANJI, A. S.; HODGSON, A. N.; VILLET, M. H. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). **Tissue and Cell**, n. 37, v. 4, p. 257-267, 2005.

COLE, A. et al. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biology of reproduction*, n. 2, v. 38, p. 385-401, 1988.

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

DIAS, G. et al. The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteran *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. **Micron**, v. 82, p. 33-40, 2016.

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

FOUQUET, J. et al. ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis. **Journal of Cell Science**, n. 5, v. 113, p. 877-886, 2000.

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

NDIAYE, M.; MATTEI, X.; THIAW, O. T. Ultrastructural diversity of the manchette in spermatids of mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Acta Zoologica**, n. 1, v. 78, p. 47-49, 1997.

OLIVEIRA, M. L. R. D. et al. Spermatological Morphology of Triatoma Species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 20, p. 1-8, 2019.

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.

RATTNER, J. B.; BRINKLEY, B. R. Ultrastructure of mammalian spermiogenesis: III. The organization and morphogenesis of the manchette during rodent spermiogenesis. **Journal of ultrastructure research**, n. 3-4, v. 41, p. 209-218, 1972.

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

RUSSELL, L. K. et al. The sperm ultrastructure of *Caurinus dectes* Russell (Mecoptera: Boreidae) and its phylogenetic implications. **Tissue and Cell**, v. 45, n. 6, p. 397-401, 2013.

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

SIMÓN, L. et al. Manchette-acrosome disorders during spermiogenesis and low efficiency of seminiferous tubules in hypercholesterolemic rabbit model. **PLoS one**, n. 2, v. 12, 2017.

SU, C. X. et al. Formation of the acrosome complex in the bush cricket *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). **Arthropod Structure & Development**, n. 46, p. 579-587, 2017.

TANDLER, B.; MORIBER, L. G. Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis* (Say). **Journal of ultrastructure research**, n. 3-4, v. 14, p. 391-404, 1966.

VIANNA, G. J. C.; MELO A.L. Distribution patterns of aquatic and semiaquatic Heteroptera in Retiro das Pedras, Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. **Lundiana**, v.4, n.2, p.125-128, 2003.

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

6 DISCUSSÃO GERAL

A porção posterior das espermátides foi analisada nas espécies *Mesovelia mulsanti* (Mesoveliidae), *Martarega* sp. e *Buenoa unguis* (Notonectidae), *Limnogonus aduncus* (Gerridae), *Belostoma anurum* (Belostomatidae), *Dysdercus* sp. (Pyrrhocoridae), *Largus* sp. (Lygaeidae), *Zelus* sp. (Reduviidae), *Stenocoris* sp. (Alydidae), *Teleonemia* sp. (Tingidae) e *Zicca pulchra* (Coreidae). Foram verificadas a ausência de corpos acessórios, a presença de duas pontes opostas conectando os derivados mitocondriais aos microtúbulos do axonema e a presença de uma ou mais estruturas paracristalinas no interior dos derivados mitocondriais, sendo as duas primeiras consideradas sinapomorfias de Heteroptera e todas as características corroborando o trabalho de Dallai et. al (2016).

Ao fazermos uma análise global da morfologia dos derivados mitocondriais para os diferentes grupos analisados, pudemos verificar uma conformidade para a infraordem Gerromorpha, cujo padrão morfológico encontrado foi apenas simétrico com formas e tamanhos diversos, enquanto que para as outras infraordens, houve uma variação. Entretanto, a única família que apresentou variação interna foi a Notonectidae.

A porção anterior das espermátides foram analisadas nas espécies *M. mulsanti* (Mesoveliidae), *L. aduncus* (Gerridae), *Teleonemia* sp. (Tingidae) e *Z. pulchra* (Coreidae). Com relação à presença de microtúbulos, denominada manchete, verificamos uma variação entre os insetos aquáticos e terrestres. Os primeiros, corroborando o trabalho de Tandler e Moriber (1965) com *Gerris remigis*, apresentaram uma membrana encerrando uma fileira única de microtúbulos individuais circundando completamente o núcleo e o acrossomo. Já as espécies terrestres não apresentaram essa membrana, porém observamos mais de uma fileira de microtúbulos individuais e regiões ao redor do acrossomo e núcleo sem microtúbulos.

Nas espécies aquáticas também pudemos observar uma granulação no interior do acrossomo, sendo identificadas como túbulos por Tandler e Moriber (1966) e por Dallai e Afzelius (1980), além de um “ponto de solda”, termo cunhado por Tandler e Moriber (1966) para identificar o local onde a membrana plasmática encontra-se em justaposição à membrana acrossomal e de um forame no interior do acrossomo, cujas funções permanecem desconhecidas.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se:

- Um padrão morfológico específico dos derivados mitocondriais para as famílias de Heteroptera, independentemente do hábitat, com exceção da família Notonectidae, a qual apresentou variação interna e da infraordem Gerromorpha, cujas famílias apresentaram o mesmo padrão morfológico;
- Uma diferença na disposição dos microtúbulos da manchete na porção anterior da espermátide nos de insetos aquáticos em relação aos terrestres.

Os resultados contribuem para a elucidação das diferenças morfológicas em nível ultraestrutural das espermátides de Heteroptera, possibilitando o uso dos dados como ferramenta para futuras análises sistemáticas.

REFERÊNCIAS

AFZELIUS, B. A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of Notonecta. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 8, p. 149-161, 1976.

AFZELIUS, B.A.; DALLAI, R.; LINDSKOG, P. Spermatozoa of saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). **Journal of Ultrastructure Research**, v. 90 p. 304–312, 1985.

AIRES, E. D.; STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermatídes de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) durante a espermiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 3, p. 183-188, 2000.

AKHMANOVA, A. et al. The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis. **Genes & Development**, v. 19, p. 2501–2515, 2005.

AL-DOKHI, O. A. Morphogenesis of the acrosomal vesicle during spermiogenesis in the House Gecko, *Ptyodactylus hasselquistii* (Squamata, Reptilia). **Int. J. Zool Res**, v. 5, p. 136-149, 2009.

ARAÚJO, V. A. et al. 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.; LINO NETO, J. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* L aporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Acta Zoologica**, n. 2, v. 93, p. 239-244, 2012.

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

BACCETTI, B. et al. Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. **The Journal of cell biology**, n. 3, v. 73, p. 594-600, 1977.

BACCETTI, B.; et al. The dynein electrophoretic bands in axonemes naturally lacking the inner or the outer arm. **The Journal of cell biology**, v. 80, n. 2, p. 334-340, 1979.

BENCHIMOL, M. Detecção de proteínas. In: SOUZA, W. (Ed.). Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Rio de Janeiro: **Sociedade brasileira de microscopia**, 1998. p. 57-61.

BONDAR, G. Insetos daninhos na agricultura, 2. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 14, n. 7, p. 434-470, 1913.

BOURGOIN, T. J.; STEFFAN-CAMPBELL, D.; CAMPBELL, B. C. Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Auchenorrhyncha). The enigmatic Tettigometridae: Evolutionary affiliation and historical biogeography. **Cladistics**, n. 13, p. 207-224, 1997.

CASTANHOLE, M. M. U. et al. Spermatogenesis of riffle bugs, *Rhagovelia whitei* and *Rhagovelia* sp (Veliidae), and backswimmers *Martarega* sp (Notonectidae). **Genetics and Molecular Research**, p. 2003-2020, 2012.

COLE, A. et al. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biology of reproduction*, n. 2, v. 38, p. 385-401, 1988.

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

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

DALLAI, R.; AFZELIUS, B. A. Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance. **The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications**. Cache River Press, Vienna, IL, p. 333-350, 1999.

DALLAI, R.; GOTTARDO, M.; BEUTEL, R. G. Structure and evolution of insect sperm: new interpretations in the age of phylogenomics. **Annual review of entomology**, v. 61, p. 1-23, 2016.

DALLAI, R.; LUPETTI, P.; MENCARELLI, C. Unusual axonemes of hexapod spermatozoa. **Int. Rev. Cytol.** v. 254, p. 45-99, 2006.

DE BEAUVOIR, S.; HESSE, G. Mémoires d'une jeune fille rangée. Paris: **Gallimard**, 1958.

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

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

FOATA, J. et al. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Cavisoma magnum* (Southwell, 1927) (Acanthocephala, Palaeacanthocephala, Cavisomidae), from *Siganus lineatus* (Pisces, Teleostei, Siganidae) (Valenciennes, 1835). **New Caledonia. Micron**, v. 43, n. 2, p. 141-149, 2012.

FOUQUET, J. et al. ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis. **Journal of Cell Science**, n. 5, v. 113, p. 877-886, 2000.

JAMIESON, B. G. M. The ultrastructure of the spermatozoon of the oligochaetoid polychaete *Questa* sp. (Questidae, Annelida) and its phylogenetic significance. **Journal of ultrastructure research**, v. 84, n. 3, p. 238-251, 1983.

JAMIESON, B. G. M. **The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa**. CUP Archive, 1987.

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

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

LANZONE, C.; SOUZA, M. J. Chromosome complement and meiosis in three species of the Neotropical bug genus *Antiteuchus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae). **Gen. Mol. Biol.**, n. 29, v. 29, p. 49-55, 2006.

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

LINO NETO, J.; BÁO, S. N.; DOLDER, H. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Zoologica**, n. 81, v. 3, p. 205-211, 2000.

MAIA, M. C. Morfologia dos espermatozóides em triatominae (Hemiptera: reduviidae). 47p. Tese (Doutorado), **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, 2009.

MESSIAS JR.; N. S. Aspectos Ultra-Estruturais da espermiogênese de *Crysomya megacephala* FAB (Diptera: Calliphoridae). 115p. Dissertação (Mestrado), **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 1990.

MISOF, B. et al. Phylogenomics resolves the timing pattern of insect evolution. **Science**, n. 346, p. 763–67, 2014.

NDIAYE, M.; MATTEI, X.; THIAW, O. T. Ultrastructural diversity of the manchette in spermatids of mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Acta Zoologica**, n. 1, v. 78, p. 47-49, 1997.

NOGUCHI, T.; KOIZUMI, M.; HAYASHI, S. Mitochondria-driven cell elongation mechanism for competing sperms. **Landes Bioscience**, n. 6, v. 2, p. 113-116, 2012.

NOVAIS, A. M.; DIAS, G.; LINO-NETO, J. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera: Notonectidae). **Arthropod Structure & Development**, p. 1-9, 2017.

PAPÁČEK, M.; SOLDÁN, T. Structure and development of the reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). **Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae**, n. 2, v. 48, p. 299 – 318, 2008.

PEREIRA, L. L. V. et al. Histological and ultrastructural analysis of spermatogenesis in *Gelastocoris flavus flavus* (Heteroptera: Nepomorpha). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, n. 4, v. 3, p. 1-6, 2015.

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

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; LELLO, E. Centriole behaviour during meiosis of male germ cells of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Cytobios**, v. 85, n. 341, p. 73-80, 1996.

QUICKE, D. J. L. Preimaginal development: from gametogenesis to syngamy. In Parasitic Wasps (Ed. Quicke, D. J. L.), **Chapman & Hall**, London, p. 79-101, 1997.

SANTOS, H. P. et al. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* and *Palmistichu selaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). **Micron**, v. 51, p. 36-40, 2013.

SANTOS, A. B. R.; LINO-NETO, J.. Sperm morphology of predatory pirate bugs *Amphiareus constrictus* and *Blaptostethus pallescens* (Heteroptera: Anthocoridae) with phylogenetic inferences. **Micron**, v. 105, p. 18-23, 2018.

SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. (Ed.). Heteroptera of economic importance. **CRC press**, 2000.

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. **True Bugs of the World (Hemiptera; Heteroptera: Classification and Natural History)**. Ithaca, London: Cornell University Press, 1995.

SOUZA, H. V. et al. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007.

SU, C. X. et al. Formation of the acrosome complex in the bush cricket *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). **Arthropod Structure & Development**, n. 46, p. 579-587, 2017.

TANDLER, B.; MORIBER, L. G. Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider, *Gerris remigis* (Say). **Journal of ultrastructure research**, n. 3-4, v. 14, p. 391-404, 1966.

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

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

TRIPLEHORN, C. A., JOHNSON, N. F. Estudo dos insetos. (Ed.): Borror and Delong's introductions to the study of insects. 7^a ed. **Cengage Learning**: 816 p., 2011.

VIANNA, G. J. C.; MELO A.L. Distribution patterns of aquatic and semiaquatic Heteroptera in Retiro das Pedras, Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. **Lundiana**, v.4, n.2, p.125-128, 2003.

WEIRAUCH, C.; SCHUH, R. T. Systematics and evolution of Heteroptera: 25 years of progress. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 487-510, 2011.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. The Transmission Electron Microscope. In: **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**. Boston, p. 3–17, 1996.

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