

Fernando Cesar Silva Junior

**Aspectos estruturais e ultraestruturais das espermátides de percevejos
fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)**

São José do Rio Preto
2020

Fernando Cesar Silva Junior

**Aspectos estruturais e ultraestruturais das espermátides de percevejos
fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação de 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 FAPESP – Processo:
2016/10135-9

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

São José do Rio Preto
2020

S586a Silva Junior, Fernando Cesar
Aspectos estruturais e ultraestruturais das espermátides de
percevejos fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae) / Fernando Cesar
Silva Junior. -- São José do Rio Preto, 2020
81 p.

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

1. Polimorfismos. 2. Polimegalia. 3. Lobo harlequin. 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.

Fernando Cesar Silva Junior

**Aspectos estruturais e ultraestruturais das espermátides de percevejos
fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biociências, junto
ao Programa de Pós-Graduação de 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 FAPESP – Processo:
2016/10135-9

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mary Massumi Itoyama
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

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

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Rita Luiza Peruquetti
UNISAGRADO – Câmpus de Bauru

Prof^a. Dr^a. Silvana Gisele Pegorin de Campos
UFSJ – Câmpus de Divinópolis

São José do Rio Preto
27 de Fevereiro de 2020

“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;

Aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório Luis Lenin Vicente Pereira 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, Nayara Oliveira, Keila Dantas de Moura, Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira, Fernanda Fernandez Madeira, Cecília Ártico Banho, Ana Letícia Guerra, Giovana Menezes Nunes, Amanda Ravazi, Kaio Cesar Chaboli Alevi, Felipe Miranda Ramos, Juliana Birello, Marcelia Georgia Candido dos Santos, Danilo Machado, Renan Willian da Costa, Simone Alves Reis Lira, 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 todos os dias, 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. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior por todos os conselhos dados.

Aos membros da banca examinadora Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior, Prof^a. Dr^a. Rita Luiza Peruquetti e Prof^a. Dr^a. Silvana Gisele Pegorin de Campos por disponibilizarem seu tempo e pela contribuição preciosa ao meu trabalho;

Por último, mas não menos importante, agradeço aos técnicos Me. Luiz Roberto Faleiros (IBILCE-UNESP), 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;

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

Agradeço à FAPESP pelo financiamento do projeto, sob o processo nº 2016/10135-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

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!

RESUMO

Dentro da subordem Heteroptera algumas espécies pertencentes a família Pentatomidae apresentam espermátides polimórficas em seus lobos testiculares que são oriundas de dois fenômenos: a polimegalia e o lobo *harlequin*. Para a investigação dessas espermátides polimórficas e de seu desenvolvimento comparadas às espermátides não polimórficas, foram coletadas em São José do Rio Preto as espécies *Antiteuchus tripterus*, *Edessa meditabunda*, *Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus* (Pentatomidae, Heteroptera). Os machos tiveram seus testículos extraídos, fixados e incluídos em parafina ou resina. O material incluído em parafina foi cortado e corado com hematoxilina/eosina (HE) e analisados em microscopia de luz, outros testículos, destas quatro espécies, foram incluídos em resina e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Os testículos *A. tripterus* são alongados e divididos em 6 lobos, sendo 1 a 3 sem alterações, 4 e 6 com polimegalia e o 5 o lobo *harlequin*. Foi possível observar, também, que os lobos 4 e 6 possuem espermátides grandes enquanto o 5 apresenta espermátides pequenas. Em MET foi possível observar em todos os lobos a formação da cauda da espermátide onde ocorre a formação dos derivados mitocondriais e a posterior formação do axonema entre os derivados. Além disso, foi detectada a presença de três tipos de espermatozoides no ducto eferente, sendo estes oriundos dos diferentes lobos. Há o espermatozoide maior com morfologia alongada com pequenas protuberâncias em suas extremidades; o intermediário com morfologia reniforme com a extremidade apical maior que a extremidade basal e o menor e o mais arredondado quando comparado aos demais. Já nas espécies *E. meditabunda*, *L. deducta* e *P. albopunctulatus* foi possível se observar a morfologia do testículo e formação da cauda dos espermatozoides onde em *E. meditabunda* o testículo apresentou quatro lobos todos sem alterações, também se observou só um tipo de espermátide com forma arredondada que dá origem a um tipo de espermatozoide, já *L. deducta* apresentou sete lobos testiculares sendo o 5 o *harlequin* e os demais sem alterações. Foi possível observar a presença de um tipo maior e arredondado de espermátide oriunda dos lobos sem alterações e um tipo menor e de morfologia irregular originado do lobo *harlequin*, sendo possível observar dois tipos de espermatozoides no ducto eferente onde o primeiro tipo é menor e mais arredondado, com pequenas estruturas paracristalinas em seu interior e o segundo tipo é maior e mais retangular e com grandes estruturas paracristalinas. Em *P. albopunctulatus* se observou seis lobos testiculares, sendo o 4 e 6 com polimegalia e os demais sem alterações, também foi possível visualizar espermátides normais e arredondadas presentes nos lobos sem alterações, enquanto nos

lobos com polimegalia estavam presentes espermátides gigantes com muitas mitocôndrias e vesículas em seu citoplasma. Já a compactação da cromatina ocorreu de maneira semelhante nas espécies estudadas, ela se torna finamente granulada e começa a se aglomerar onde dá origem a cromatina filamentar que se aglomera para preencher o núcleo se tornando completamente compactada. Esse processo ocorre de maneira muito semelhante nas espermátides oriundas de lobos sem alterações, com polimegalia e do *harlequin*, além de que nas espermátides do lobo *harlequin* foram encontradas todas as estruturas que compõem a cabeça dos espermatozoides.. Portanto com este estudo podemos concluir que na espécie *A. tripterus* e *L. deducta*, os seus diferentes lobos testiculares produzem diferentes tipos de espermatozoides, sendo que estes apresentam todas as estruturas necessárias para serem funcionais e que estes diferem morfológicamente entre si, a formação dos componentes da cabeça e da cauda dos espermatozoides se dá de maneira semelhante nas quatro espécies e em outros insetos estudados, a condensação da cromatina se deu de maneira semelhante em *A. tripterus* e *L. deducta* seguindo um padrão anteriormente descrito. Existem diferenças morfológicas entre os derivados mitocondriais das espécies estudadas e até mesmo na mesma espécie em espermatozoides oriundos de diferentes lobos testiculares o que pode fazer que através de novos estudos esses caracteres morfológicos sejam usados como ferramentas de identificação de novas espécies.

Palavras-chave: Polimorfismos. Polimegalia. Lobo *harlequin*.

ABSTRACT

Within the suborder Heteroptera, some species belonging to the Pentatomidae family show alterations in some of their testicular lobes, where we can show the polymegaly and the harlequin lobe. For the investigation of these polymorphic cells and their development compared to non-polymorphic cells, the species *Antiteuchus tripterus*, *Edessa mediatubunda*, *Loxa deducta* and *Proxys albopunctulatus* (Pentatomidae, Heteroptera) were collected in São José do Rio Preto. The males had their testicles extracted, fixed and included in paraffin or resin. The material included in paraffin was cut and stained with hematoxylin / eosin (HE) and analyzed under light microscopy, other testicles, of these four species, were included in resin and analyzed using a transmission electron microscope (TEM). The testicles *A. tripterus* are elongated and divided into 6 lobes, 1 to 3 without changes, 4 and 6 with polymegaly and the 5 the harlequin lobe. It was also possible to observe that lobes 4 and 6 have large cells while 5 has small cells. In TEM, it was possible to observe the formation of the sperm tail in all lobes where the formation of the mitochondrial complex occurs, which divides into two mitochondrial derivatives and the subsequent formation of the axoneme between the derivatives. In addition, the presence of three types of sperm in the efferent duct was detected, these coming from different lobes. There is the larger sperm with elongated morphology with small protuberances at its ends; the intermediate with reniform morphology with the apical extremity larger than the basal extremity and the smaller and more rounded when compared to the others. The chromatin compaction, on the other hand, becomes finely granulated and begins to clump where it gives rise to the filamentary chromatin that clusters to fill the nucleus and becomes completely compacted. This process occurred in a very similar way in the sperm cells from lobes without changes, with polymegaly. and the harlequin, besides that in the harlequin lobe sperm cells all the structures that make up the head of the spermatozoa were found. In the *E. mediatubunda*, *L. deducta* and *P. albopunctulatus* species, it was possible to observe the testis morphology and the formation of the sperm's tail, whereas in *E. mediatubunda* the testis showed four lobes, all without alterations, only one type of sperm was also observed. with a rounded shape that gives rise to a type of sperm, *L. deducta* presented seven testicular lobes, the 5 being the harlequin and the others without alterations. It was possible to observe the presence of a larger and rounded type of sperm from the lobes without alterations and a smaller type and irregular morphology originating from the harlequin lobe, being possible to observe two types of spermatozoa in the efferent duct where the first type is smaller and more rounded, with small paracrystalline structures inside and the

second type is larger and more rectangular and with large paracrystalline structures. In *P. albopunctulatus*, six testicular lobes were observed, with 4 and 6 with polyimegaly and the others without changes, it was also possible to see normal and rounded spermatids present in the lobes without changes, while in the lobes with polyimegaly, giant spermatids were present with many mitochondria and vesicles in your cytoplasm. Also in *L. deducta* the condensation of the chromatin observed occurred in a very similar way in the spermatids originating from lobes without alterations and from the harlequin to that previously described for *A. tripterus*. Therefore, with this study we were able to conclude that in the species *A. tripterus* and *L. deducta*, their different testicular lobes produce different types of sperm, which have all the necessary structures to be functional and that these differ morphologically, the formation of components of the head and tail of the sperm are similar in the four species and in other insects studied, the chromatin condensation occurred in a similar way in *A. tripterus* and *L. deducta* following a pattern previously described. There are morphological differences between the mitochondrial derivatives of the studied species and even in the same species in spermatozoa from different testicular lobes, which may cause these morphological characters to be used as tools to identify new species through new studies.

Keywords: Polymorphisms. Polimegaly. Harlequin lobe.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	ARTIGO 1 - Structural and ultrastructural analysis of <i>Antiteuchus tripterus</i> (Heteroptera: Pentatomidae: Discocephalinae) testes with emphasis on spermiogenesis of their different lobes	18
	Abstract	18
1	Introduction	19
2	Material and methods	20
2.1	Light microscopy processing and analysis	20
2.2	Transmission Electron Microscopy processing and analysis	20
3	Results	20
4	Discussion	22
5	References	24
3	ARTIGO 2 - Transformações nucleares, durante a espermiogênese, nos diferentes tipos de lobos testiculares de <i>Antiteuchus tripterus</i> (Pentatomidae: Discocephalinae)	32
	Resumo	32
1	Introdução	33
2	Material e Métodos	34
2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	34
3	Resultados	34
3.1	Lobos sem alterações	34
3.2	Lobos com polimegalia	35
3.3	Lobo <i>harlequin</i>	35
4	Discussão	36
5	Referências	37
4	ARTIGO 3 - Caracterização ultraestrutural da espermiogênese de espécies de Edessinae (<i>Edessa meditabunda</i>) e Pentatominae (<i>Loxa deducta</i> e <i>Proxys albopunctulatus</i>) (Heteroptera: Pentatomidae)	42
	Resumo	42

1	Introdução	43
2	Material e Métodos	44
2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	44
3	Resultados	45
3.1	<i>Edessa mediatibunda</i> (Lobos sem alterações)	45
3.2	<i>Loxa deducta</i> (Lobos sem alterações e <i>harlequin</i>)	46
3.3	<i>Proxys albopunctulatus</i> (Lobos sem alterações e com polimegalia)	47
4	Discussão	48
5	Referências	49
5	ARTIGO 4 - Alterações nucleares durante a espermiogênese de <i>Loxa deducta</i> (Heteroptera: Pentatomidae) em lobos sem alterações e lobo harlequin	62
	Resumo	62
1	Introdução	62
2	Material e Métodos	63
2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	63
3	Resultados	64
3.1	Lobos sem alterações	64
3.2	Lobo <i>harlequin</i>	65
4	Discussão	66
5	Referências	67
6	DISCUSSÃO GERAL	72
7	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A classe Insecta é um dos grupos de animais mais bem adaptados do planeta estando presente nos mais diversos climas e habitats. Estima-se que possam existir entre 5 e 15 milhões de espécies de insetos sendo apenas cerca de 1 milhão descritas até o último levantamento. Essa classe pode ser considerada uma das mais relevantes do meio Científico já que seus indivíduos possuem grande importância devido à sua diversidade, papel ecológico e influência na agricultura, saúde humana e recursos naturais, sendo usados em estudos de mudanças climáticas, biologia do desenvolvimento, ecologia, evolução, genética e fisiologia (FOOTTIT; ADLER, 2017).

Essa classe é dividida em 29 ordens onde podemos destacar a Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Hemiptera com cerca de 105 mil espécies representando aproximadamente 90% das espécies de insetos descritas até o momento (CASSIS; GROSS 2002; FOOTTIT; ADLER, 2017).

A ordem Hemiptera é a quinta maior da Classe Insecta e é dividida em quatro subordens Auchenorrhyncha com cerca de 40 mil espécies, Sternorrhyncha com aproximadamente 19 mil espécies, Coleorrhyncha com menos de 40 espécies e Heteroptera, a maior subordem de Hemiptera, com cerca de 45 mil espécies descritas. As espécies estão distribuídas em oitenta famílias e sete infraordens, sendo assim o maior e mais diverso grupo de insetos hemimetábolos (SCHUH; SLATER, 1995; CASSIS; GROSS 2002; FOOTTIT; ADLER, 2017). Estes insetos possuem os estágios de ovo, ninfa e adulto, sendo a grande diferença das ninfas para os adultos, a ausência de asas e o sistema reprodutor imaturo (SCHUH; SLATER, 1995; FOOTTIT; ADLER, 2017).

Estes insetos possuem hábitos alimentares diversos 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, possuem, também, e vivem em habitats variados (SCHUH; SLATER, 1995). Os Heteroptera possuem grande importância econômica já que podem ser vetores de doenças aos seres humanos e outros animais como ocorre no caso da doença de Chagas que tem como vetores indivíduos hematófagos da família Reduviidae, ou serem pragas de diversas culturas agrícolas como ocorre com vários indivíduos fitófagos da família Pentatomidae ou até como controle de pragas que podem ser observados nos indivíduos predadores das famílias Pentatomidae e Reduviidae (SCHUH; SLATER, 1995; FOOTTIT; ADLER, 2017). As principais características que definem Heteroptera são: o par de asas anterior que é espessado em seu ápice e membranoso em sua região posterior, formando uma estrutura

denominada hemiélitro que protege o segundo par de asas; um aparelho bucal sugador penetrante presente na região anterior da cabeça; um par de antenas com quatro a cinco segmentos; um grande escutelo bem desenvolvido; além de glândulas de cheiro presentes no metatórax em adultos e abdominais dorsais em ninfas (SCHUH; SLATER, 1995; FOOTTIT; ADLER, 2017).

A família Pentatomidae é uma das maiores famílias de Heteroptera, possuindo aproximadamente 4.840 espécies que estão distribuídas em 8 subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae) e 939 gêneros (CASSIS; GROSS 2002; FOOTTIT; ADLER, 2017). Os indivíduos desta família são de grande destaque pelo fato da grande maioria ser composta de espécies fitófagas causando, assim, grandes danos às culturas de diversas espécies vegetais, atacando principalmente leguminosas como, por exemplo, a soja, sendo as únicas espécies predadoras encontradas na subfamília Asopinae (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000; PONCIO et al., 2010; FOOTTIT; ADLER, 2017).

Pentatomidae recebe esse nome devido ao fato de seu par de antenas se dividir em quatro ou, principalmente, cinco segmentos. Outras características da família são o corpo ovalado, hemiélitro com cinco a doze veios e tarsos com dois ou três segmentos (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000; FOOTTIT; ADLER, 2017).

Grande parte dos insetos possui, no geral, um par de testículos alongados ou espiralados, recobertos por um epitélio protetor ou bainha peritoneal podendo esse ser ou não pigmentado, sendo estas características presentes em Pentatomidae. Cada um dos testículos possui, em seu interior, um número variado de lobos que são separados uns dos outros por seu próprio epitélio que se abre para um único ducto deferente, além disso, cada indivíduo possui após o ducto eferente uma vesícula semínífera e um ducto deferente que desembocam em um único bulbo ejaculatório ligado ao edeago (PHILLIPS, 1970; DALLAI, 2014; ELELIMY et al, 2017).

Os lobos testiculares podem se apresentar em diferentes números e formas nos vários grupos de insetos, sendo que em Pentatomidae os números variam de três a sete (o número mais comum é de sete), com morfologia alongada e a coloração de sua bainha variando entre amarelo e vermelho (PHILLIPS, 1970; SOUZA et al, 2011). Cada lobo testicular é formado de inúmeros cistos espermatogoniais que também são separados por um epitélio. Nestes cistos estão contidas as células germinativas que sofrerão todo o processo meiótico e de diferenciação, sendo que cada cisto possui divisões sincrônicas, ou

seja, todas as células de um cisto estão no mesmo estágio de diferenciação (PHILLIPS, 1970).

Os testículos possuem sincronia nas fases de diferenciação por todo seu comprimento, sendo a região inicial do testículo composta por cistos contendo espermatogônias e a região final contendo espermátides em fases finais de diferenciação e espermatozoides (JYOTI et al, 2015; ELELIMY et al, 2017). Devido a esta sincronia é possível dividir os testículos em três zonas distintas: a de crescimento onde se localiza os cistos espermatogoniais, a de maturação onde ocorre a meiose e a de diferenciação onde ocorre a diferenciação das espermátides (JYOTI et al, 2015; ELELIMY et al, 2017).

Citogeneticamente Pentatomidae é uma família muito estudada, apresentando, assim como todos os Heteroptera, cromossomos holocêntricos. Esses cromossomos não possuem centrômero definido e assim sua atividade cinética é de modo difuso, 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). Os Pentatomidae apresentam número cromossômico que varia de 6 a 27, sendo em aproximadamente 85% das espécies o número, mais comum, de 14 cromossomos, não apresentam m-cromossomos e o sistema cromossômico do sexo, mais comum, é o XX/XY (fêmea/macho) (REBAGLIATI et al., 2005).

Vários tipos de polimorfismos em espermatozoides de insetos foram relatados nas mais diversas Ordens como em Diptera por Pasini et al. (1996), Hymenoptera por Lee e Wilkes (1965), Lepidoptera por Silberglied et al. (1984), além de membros das famílias Largidae por Araújo et al. (2012) e Pentatomidae por Araújo et al. (2010) pertencentes a subordem Heteroptera. Esse polimorfismo consiste na produção de mais de um tipo de espermatozoide onde somente um tipo é considerado fecundante e os outros possuem algumas funções sugeridas como, por exemplo, o preenchimento da espermateca da fêmea impedindo a entrada de espermatozoides concorrentes (ARAÚJO et al., 2012).

Os polimorfismos nos espermatozoides de Pentatomidae foram relatados em algumas espécies e as principais diferenças encontradas foram o comprimento dos espermatozoides, além do tamanho e morfologia das estruturas que os compõe, e funções desses espermatozoides (BOWEN, 1922; SOUZA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2011).

A principal causa de polimorfismo nos espermatozoides de Heteroptera é um fenômeno chamado de polimegalia descrito por Bowen (1920 e 1922) nas espécies *Euchistus heros* e *Murgantia histrionica*, onde foi observado que dois lobos testiculares apresentavam espermatócitos e espermatozoides maiores enquanto outros lobos apresentavam tamanhos celulares normais, sendo também observado por Swallow e

Wilkinson (2002), e presente em quase todas as subfamílias de Pentatomidae com exceção de Asopinae e Acanthosomatinae (SOUZA et al., 2011). Os espermatozoides produzidos nestes lobos provêm de divisões meióticas normais sendo, portanto, mantido o número cromossômico (BOWEN, 1922, SOUZA et al., 2007).

Além da polimegalia, a família Pentatomidae apresenta uma característica intrigante, em apenas algumas espécies, denominada de lobo *harlequin*, um lobo testicular que pode ser maior que os outros e apresentar meiose atípica (REBAGLIATI et al., 2005). A meiose do lobo *harlequin* apresenta pareamento meiótico e a formação de quiasmas, a associação não específica de autossomos, uma disposição anormal dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e fusão celular. Como resultado desta divisão atípica é comum a produção de espermatozoides com número cromossômico altamente variável, o que causa polimorfismo nos espermatozoides podendo afetar a fertilidade dos indivíduos. São 22 espécies, relatadas até agora, que possuem esse lobo, sendo esta característica encontrada apenas nas subfamílias Pentatominae, Edessinae e Discocephalinae, dentre as oito de Pentatomidae (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007, 2011).

Algumas funções foram sugeridas para esses espermatozoides polimórficos como o auxílio na capacitação dos espermatozoides fecundantes e nutrição do óvulo, ajuda na migração dos espermatozoides fecundantes, além de uma possível função de eliminar espermatozoides de outros machos dentro da spermateca da fêmea (SWALLOW; WILKINSON, 2002). Estes polimorfismos já foram estudados em alguns exemplares de Heteroptera das famílias Pentatomidae e Largidae por Araújo et al. (2011, 2012).

Algumas espécies apresentando polimegalia e lobo *harlequin* foram descritas em nível citogenético, entre elas estão: *Antiteuchus tripterus* com 6 lobos testiculares sendo os lobos 4 e 6 com polimegalia e o 5 com meiose atípica (lobo *harlequin*) (SOUZA et al, 2007), *Edessa bifida* com 5 lobos sendo 2 e 4 com polimegalia (BOWEN, 1922), *Euchistus heros* com 6 lobos sendo 4 e 6 com polimegalia (REBAGLIATI, 2005) e *Nezara viridula* com 6 lobos sendo 3 e 5 com polimegalia e o 4 com meiose atípica (lobo *harlequin*) (BOWEN, 1922), dentre outras. As descrições estruturais e ultraestruturais de espermatozoides da família Pentatomidae, com polimegalia e/ou lobo *harlequin*, são escassas na literatura sendo reservadas a poucas espécies. Estes estudos se concentram em observar o tamanho dos espermatozoides e as morfologias ultraestruturais, além da presença ou ausência de algumas estruturas (ARAÚJO et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

Em insetos os espermatozoides são extremamente diversificados (JAMIESON et al., 1999) nenhum outro grupo de animais possui tão grande variabilidade na estrutura dos espermatozoides, os quais podem variar de convencional flagelado a células sem flagelo imóveis, ou ainda, de um espermatozoide pequeno, medindo poucos micrômetros de comprimento para um espermatozoide gigante de cerca de 6 cm de comprimento (DALLAI et al., 2006), sendo possível, em princípio, determinar até a espécie a qual pertence a célula espermática dada tamanha diversidade (PHILLIPS, 1970).

Dentre as regiões mais estudadas, estrutural e ultraestruturalmente, nos espermatozoides de insetos, estão a região da cabeça onde estão o acrossomo e o núcleo, e a região da cauda onde se localizam o axonema e os derivados mitocondriais.

O acrossomo se origina a partir de vesículas produzidas pelo complexo de Golgi chamadas de vesículas pró-acrossomais e que 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 espermatozoides 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).

O núcleo durante a espermiogênese sofre diversas transformações morfológicas tornando-se mais fusiforme e a cromatina torna-se, gradualmente, mais densa e compactada. O processo de condensação da cromatina se dá pela substituição gradual das histonas nucleares por um tipo de proteína muito rica em arginina ou lisina denominada protamina (KING, 1976; KASINSKY et al., 2011). Já a diminuição do núcleo ocorre através do auxílio mecânico que a manchete de microtúbulos, faz ao redor do núcleo em condensação (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993).

Na região da cauda é encontrado o derivado mitocondrial que tem sua origem com as fusões das mitocôndrias, passando por um estágio esférico e único denominado complexo mitocondrial que, posteriormente, se divide formando os derivados mitocondriais que se localizam circundando o axonema. A principal função sugerida para os derivados é a 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 (PHILLIPS, 1970; 1974; TOKUYASU, 1974; 1975; BACCETTI; AFZELIUS, 1976).

O axonema tem origem através da atividade centriolar e possui, nos insetos, o padrão de microtúbulos de $9+9+2$, 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).

Todas essas estruturas citadas anteriormente se mostram importantes ferramentas em estudos taxonômicos e filogenéticos levando-se em conta que as células espermáticas podem apresentar diferenças capazes de identificar até o nível de gênero (PHILLIPS, 1970). Diversos estudos foram realizados ressaltando a importância taxonômica e filogenética destas características em diversas ordens de insetos, como Lino-Neto e Dolder (2001), Araújo et al. (2012) para Heteroptera, Dallai (2014) para diversas ordens de insetos, além de estudos com a família Pentatomidae (ARAÚJO et al., 2011).

Embora, como descrito anteriormente, os Heteroptera, em especial Pentatomidae, sejam muito relevantes no âmbito ecológico e econômico, e tenham sido muito estudados citogeneticamente, o estudo do comportamento dos componentes celulares da espermatogênese, em nível de estrutura e ultraestrutura, permanecem ocultos para a maioria das espécies. Portanto o nosso objetivo foi o de analisar estrutural e ultraestruturalmente a espermatogênese de espécies da família Pentatomidae com enfoque em espécies das subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar os aspectos estruturais e ultraestruturais da espermatogênese de espécies da família Pentatomidae (Heteroptera) que possuem ou não lobos com polimegalia e/ou *harlequin*, comparando os diferentes tipos de espermatozoides encontrados inter e intraespecificamente.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o complexo mitocondrial, os derivados mitocondriais, o acrossomo, o axonema nas espermátides e espermatozoides polimórficos oriundos dos diferentes lobos testiculares intraespecificamente;
- b) Comparar estrutura e ultraestruturalmente os componentes, citados anteriormente, encontrados nas diferentes espermátides e espermatozoides interespecificamente;
- c) Comparar estrutural e ultraestruturalmente as espécies que possuem apenas um dos tipos de alterações testiculares.

2 ARTIGO 1 - Structural and ultrastructural analysis of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae: Discocephalinae) testes with emphasis on spermiogenesis of their different lobes

Silva Junior, F.C.^{a,*}; Itoyama, M.M.^a

^aLaboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

***Corresponding author:** Fernando Cesar Silva Junior, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. e-mail: ju_fcsj@hotmail.com; Telephone number: +55 (17) 982306004.

Abstract: In some species of Heteroptera belonging to the family Pentatomidae, sperm polymorphism is common, most of them due to the presence of polymegaly. The polymorphism, too, can be observed in harlequin lobe. These events may occur separately or simultaneously, such as *Antiteuchus tripterus*. With aim to analyze spermatids and sperm from lobes affected or not, with these phenomena *A. tripterus* testes were analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). The testicles of this species are elongated and divided into 6 lobes, 1 to 3 without changes, 4 and 6 with polymegaly and 5 the harlequin lobe. It was also observed that lobes 4 and 6 have large cells while 5 has small cells. In TEM, it was possible to observe in all lobes the formation of the spermatid tail where the formation of the mitochondrial complex that divides into two mitochondrial derivatives occurs and the subsequent formation of the axonema between the derivatives. In addition, the presence of three types of spermatozoa in the efferent duct was detected, which were from different lobes. There is the larger sperm with elongated morphology with small bulges at its ends; the intermediate with reniform morphology with the apical extremity larger than the basal extremity and the smaller and more rounded one when compared to the others. With this study we could conclude that in *A. tripterus* species, their different testicular lobes produce different types of sperm, which have all the necessary structures to be functional and that they differ morphologically from each other, and we know that only one of the types of sperm is fecundating and further studies are needed to determine which sperm and which function the other two types have.

Keywords: Polymorphisms, Polymegaly, Harlequin lobe.

1 Introduction

Insects generally have a pair of elongated or spiraled testicles covered by a protective epithelium, also called the peritoneal sheath, which may or not be pigmented (SOUZA et al, 2011). The testicles have varying numbers of lobes that are separated from each other by their own epithelium and all flow into the vas deferens (PHILLIPS, 1970; DALLAI, 2014). These testicular lobes can be present in different numbers and shapes, in different groups of insects, being in the family Pentatomidae (Heteroptera) from 3 to 8, with elongated morphology and coloration of the predominantly reddish peritoneal sheath, with some being yellowish (PHILLIPS, 1970 ; SWALLOW; WILKINSON, 2002; SOUZA et al, 2011; AGUIAR et al, 2017).

The testes have synchrony in the stages of differentiation of spermatogenesis over their entire length, with the initial region of the testis composed of cysts containing spermatogonia and the final containing spermatids in late development and sperm (JYOTI et al, 2015; ELELIMY et al, 2017).). Due to this synchrony, it was possible to divide the testicles into three distinct zones: growth where spermatogonial cysts are located, maturation where meiosis occurs and differentiation where spermatid differentiation occurs (JYOTI et al, 2015; ELELIMY et al, 2017).

Insect sperm polymorphisms have been reported in several Orders such as Diptera by Pasini et al. (1996), Hymenoptera by Lee and Wilkes (1965), Lepidoptera by Silberglied et al. (1984), in addition to Hemiptera, suborder Heteroptera, Largidae families by Araújo et al. (2012) and Pentatomidae by Araújo et al. (2011), and this polymorphism consists in the production of more than one type of sperm where only one type is considered fecundant and for the others the following functions have been suggested: assisting in the capacitation of fertilizing sperm and egg nutrition; aid in the migration of fertilizing sperm; besides a possible function of eliminating sperm from other males within the spermateca (SWALLOW; WILKINSON, 2002).

Two phenomena that produce different types of sperm are described for the family Pentatomidae. Polymegaly where the larger sperm originate from large cells by normal meiotic divisions and thus the chromosomal number is maintained (BOWEN, 1922; SCHRADER; LEUCHTENBERGER 1950). And the harlequin lobe in which sperm are produced from atypical meiotic divisions, the cells may have extremely variable chromosomal numbers, usually the smallest sperm (BOWEN, 1922; SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950; SOUZA et al. , 2007). One species with these descriptions is *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae/Discocephalinae) which has lobes 1, 2 and 3

(unchanged), 4 and 6 (with polymegaly) and 5 (harlequin) (Souza et al., 2007). Thus, the present work aimed to describe the structural and ultrastructural description of spermiogenesis of the testicular lobes of this species, as well as to analyze ultrastructurally the sperm formed from these lobes.

2 Material and methods

2.1 Light microscopy processing and analysis

Ten adult specimens of *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae: Heteroptera: Discocephalinae) were collected from São José do Rio Preto, SP, Brazil (20° 47 '13 "S, 49 ° 21' 38" W), and the testes were extracted and placed in solution of Karnovsky for 24 hours and then taken to the LEICA® TP1020 automatic tissue processor and included in paraplast. The blocks were cut in a LEICA® RM2155 automatic rotating microtome, and the sections fixed in slides and stained with Hematoxylin/Eosin method. Slides were analyzed under the ZEISS® AXIO SCOPE A1 microscope using the AXIO VISION LE version 4.8 image analysis program.

2.2 Transmission Electron Microscopy processing and analysis

After fixation of the testicles in Karnovsky, transmission electron microscopy (TEM) processing was performed. The testes were subjected to two Millonig buffer washes for about 5 minutes each, then postfixed with 1% Osmium Tetroxide: 1: 3 for 2 hours in a refrigerator. The material was washed rapidly in bidistilled water and dehydrated in a sequence of solutions with increasing concentrations of acetone (30 to 100%) for 15 minutes each step. After this process the material was included in Araldite 502 resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). The blocks were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate. After this post-processing, sections were analyzed with the aid of the Jeol JEM-100 CXII transmission electron microscope.

3 Results

The testicles of *A. tripterus* are elongated, consisting of six lobes, numbered from 1 to 6, with 1 being the closest to the efferent duct and 6 the most distant. The lobes 4 and 6 are smaller than the others, while 5 is the highest of all (Figure 1a). The testes have a

certain curvature due to the difference in lobe size (5 larger than 1) (Figure 1a). They are enveloped externally by a membrane called a reddish-colored peritoneal sheath. All lobes converge on a single region called the efferent duct, which is present in the terminal region of the testis through which the sperm are led to the seminiferous vesicle (Figure 1a).

It features three distinct zones: the growth (ZC) that is located in the anterior testis region where there are the spermatogonial cysts, which suffer mitosis, differing in spermatocytes (Figure 1a), the maturation (ZM), located in a small area of the intermediate region of the testis where meiosis occurs giving rise to spermatids and, finally, the area of differentiation (ZD) that encompasses the intermediate and final region of the testis where differentiation of spermatids to sperm occurs (Figure 1a). The sperm are distributed in bundles, and it can be observed that they are closely organized: head to head, small initial end of the beam and tail to tail, the largest beam extension (Figure 1b).

As previously mentioned, the *A. tripterus* testis has six lobes, the sixth internal to the fifth (Figure 1a), where it is possible to notice, in sequential longitudinal sections, from the outermost to the innermost region of the testis (Figure 2a-d), that initially this lobe occupies only the initial part of the fifth lobe and in deeper sections, it appears that it occupies almost the entire lobe (Figure 2e).

Regarding cytogenetic aspects, the first, second and third lobes (without alterations) present cells of intermediate size to those of lobes 4 and 6 (with polymegaly) and 5 (harlequin), with the fourth and sixth largest and fifth, the smallest cells (Figure 3).

The testicular lobes (without alterations, with polymegaly and harlequin) of *A. tripterus* were also individually analyzed ultrastructurally, and similar results could be observed in all of them. In the differentiating spermatids, mitochondria were observed starting to cluster (Figure 4a, b). These mitochondria are round in shape and are located around the nucleus. During this fusion it can be observed that they still preserve their individual membranes (Figure 4b-d). In later spermatids, complete mitochondrial fusion was observed, with gradual loss of individual mitochondrial membranes, resulting in the mitochondrial complex (Figure 4c-f). Subsequently, this mitochondrial complex divides (Figure 5a) into mitochondrial derivatives (Figure 5b). These derivatives at the beginning of the tail formation are rounded and symmetrical (Figure 5c, d) and at intermediate stages of differentiation they become elongated but still symmetrical (Figure 5e). Near the final stages of differentiation it is possible to see the complete axoneme and the beginning of the formation of paracrystalline structures (Figure 5f).

In order to observe the different sperm found, the seminiferous vesicle and the efferent duct were analyzed, and a total of three were found (Figure 6c). There is

intermediate sperm with reniform morphology with apical extremity larger than basal (Figure 6a); the largest with elongated morphology with small protuberances at its extremities (Figure 6b); and the smallest and most rounded when compared to the others (Figure 6c).

The three types have two symmetrical mitochondrial derivatives and two paracrystalline structures inside, where the largest has one large and one small paracrystalline structure in each derivative, the intermediate has two large structures and the smallest type had two small (Figure 5e). In addition, an axoneme surrounded by these mitochondrial derivatives can be observed (Figure 5e).

During the formation of mitochondrial derivatives, axoneme formation was also observed (Figure 5a-c), with the standard conformation of $9 + 9 + 2$ microtubules being observed, being nine outer accessory microtubules, nine intermediate microtubule pairs and two central microtubules. It was also possible to verify the bridges linking the axoneme to the inner region of mitochondrial derivatives (Figure 5d).

4 Discussion

In *A. tripterus* it was possible to structurally prove the characteristics analyzed cytogenetically, such as the fact that the species has six testicular lobes, three without alterations (lobes 1-3), two with polymegaly (lobes 4 and 6, being 6 internal to 5), and a harlequin lobe (lobe 5) (SOUZA et al., 2007).

The testicles of this species are covered by a peritoneal sheath, consisting of epithelial cells and a reddish-colored non-cellular membrane, covering these cells, called proper tunic (RODRIGUES et al., 2008; ELELIMY et al., 2017). The lobes are divided among themselves by a connective tissue layer as verified for the species *Euchistus heros* (Pentatomidae) by Souza et al (2010) and Aguiar et al (2017), a layer also referred to as a septum in *Martarega bentoi* (Notonectidae) by Novais et al (2017).

The species *A. tripterus* presented lobes 4 and 6 with polimegalia, this phenomenon being largely found in the family Pentatomidae being absent only in the subfamilies Asopinae and Acanthosomatinae (Souza et al., 2010). The lobe 5 of the species presented as harlequin, being this phenomenon with more restricted distribution, and in this family, occurs only in the subfamilies Discocephalinae, Edessinae and Pentatominae, among the eight subfamilies of Pentatomidae, presenting this type of lobe, totaling 22 species described so far (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007, 2010).

With ultrastructurally analyzing of *A. tripterus* spermiogenesis it was observed that sperm tail formation occurs in a standard manner for insects as described by Phillips (1970) and Dallai (2014) for several insect orders and Pratt (1970) and Mercati et al. (2009) specifically for the suborder Heteroptera. The conformation of the 9 + 9 + 2 axoneme is considered an Insecta class synapomorphy, while the two bridges that connect the derivatives to the axoneme are considered synapomorphies for the Heteroptera suborder (DALLAI, 2014).

It was also possible to observe in the species *A. tripterus*, due to the fact that it has the normal lobes, with polymegaly and harlequin, three types of sperm. This polymorphism is common in several insect orders including the suborder Heteroptera where the phenomenon occurs mainly in the family Pentatomidae (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950; SWALLOW; WILKINSON, 2002; SOUZA et al., 2007). Polymorphic sperm were found by Araujo et al (2011) in *Podisus nigrispinus*, *P. distinctus* and *Brontocoris tabidus* (Pentatomidae) species, Aguiar et al (2017) described in *E. heros* (Pentatomidae) species, Araújo et al (2012) in *Largus rufipennis* (Largidae) and Baffa et al. (2017) in five species of the *Triatoma brasileinsis* complex (Reduviidae).

We can conclude, therefore, that in the species *A. tripterus*, their different testicular lobes produce different types of sperm, which have all the structures necessary to be functional and that they differ morphologically from each other. It is known that only one type of sperm will be fruitful, and further studies are needed to determine which one and which function of the other two types.

Acknowledgments: We thank Luiz Roberto Falleiros Junior and Maria Dolores Seabra Ferreira for their support in material processing, and José Augusto Maulin for his support with TEM. The work was supported by the Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financing Code 001 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Process 2016/10135-9.

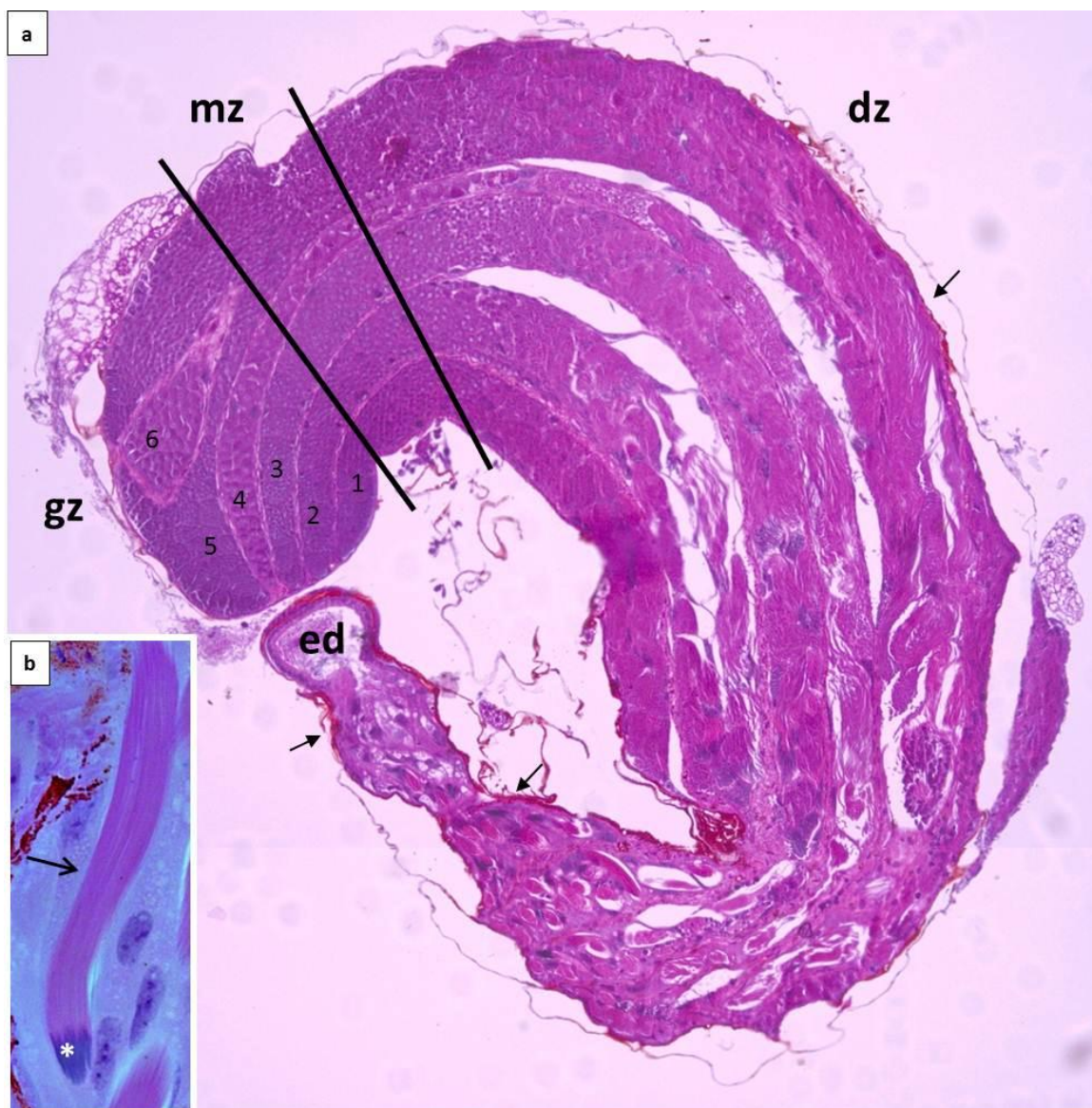
Funding: The work was supported by the Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Financing Code 001 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Process 2016/10135-9.

5 References

1. AGUIAR, R. C. M., HUSCH, P. E., GALLO, R. B., LEVY, S. M., VILAS-BÔAS, L. A., DA SILVA, C. R. M., SOSA-GÓMEZ, D. R., DA ROSA, R. (2017). Effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on spermatogenesis of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). *Entomological Science*, v. 20, n. 1, p. 279-287, 2017.
2. 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.
3. 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.
4. BAFFA, A. F. et al. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. *Medical and veterinary entomology*, v. 31, n. 2, p. 192-199, 2017.
5. BOWEN, R. H. Studies on insect spermatogenesis. IV. The phenomenon of polymegaly in the sperm cells of the family Pentatomidae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*. American Academy of Arts and Sciences, 1922. p. 391-422.
6. DALLAI, R. Overview on spermatogenesis and sperm structure of Hexapoda. *Arthropod structure & development*, v. 43, n. 4, p. 257-290, 2014.
7. ELELIMY, H. A. S., GHAZAWY, N. A., OMAR, A. H., MEGUID, A. A. Morphology and histology of the male reproductive system of *Spilostethus pandurus* (Scopoli) (Hemiptera: Lygaeidae). *African Entomology*, v. 25, n. 1, p. 210-219, 2017.
8. JYOTI, G., SANTOSH, N., DESAI, A. Revamp Studies on Morpho-Histology of the Male Reproductive System of *Halys dentatus* Fabricious (Hemiptera: Pentatomidae). *Annual Research & Review in Biology*, v. 6, n. 3, p. 176, 2015.
9. LEE, Peter E.; WILKES, A. Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science*, v. 147, n. 3664, p. 1445-1446, 1965.,
10. 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.
11. NOVAIS, A. M.; DIAS, G; LINO-NETO, J. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martarega bentoi* (Heteroptera:Notonectidae). *Arthropod structure & development*, v. 46, n. 4, p. 635-643, 2017.
12. PHILLIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, v. 44 p.243-277, 1970.
13. PASINI, M. E., REDI, C. A., CAVIGLIA, O.; PEROTTI, M. E. Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue and Cell*, v. 28, n. 2, p. 165-175, 1996.

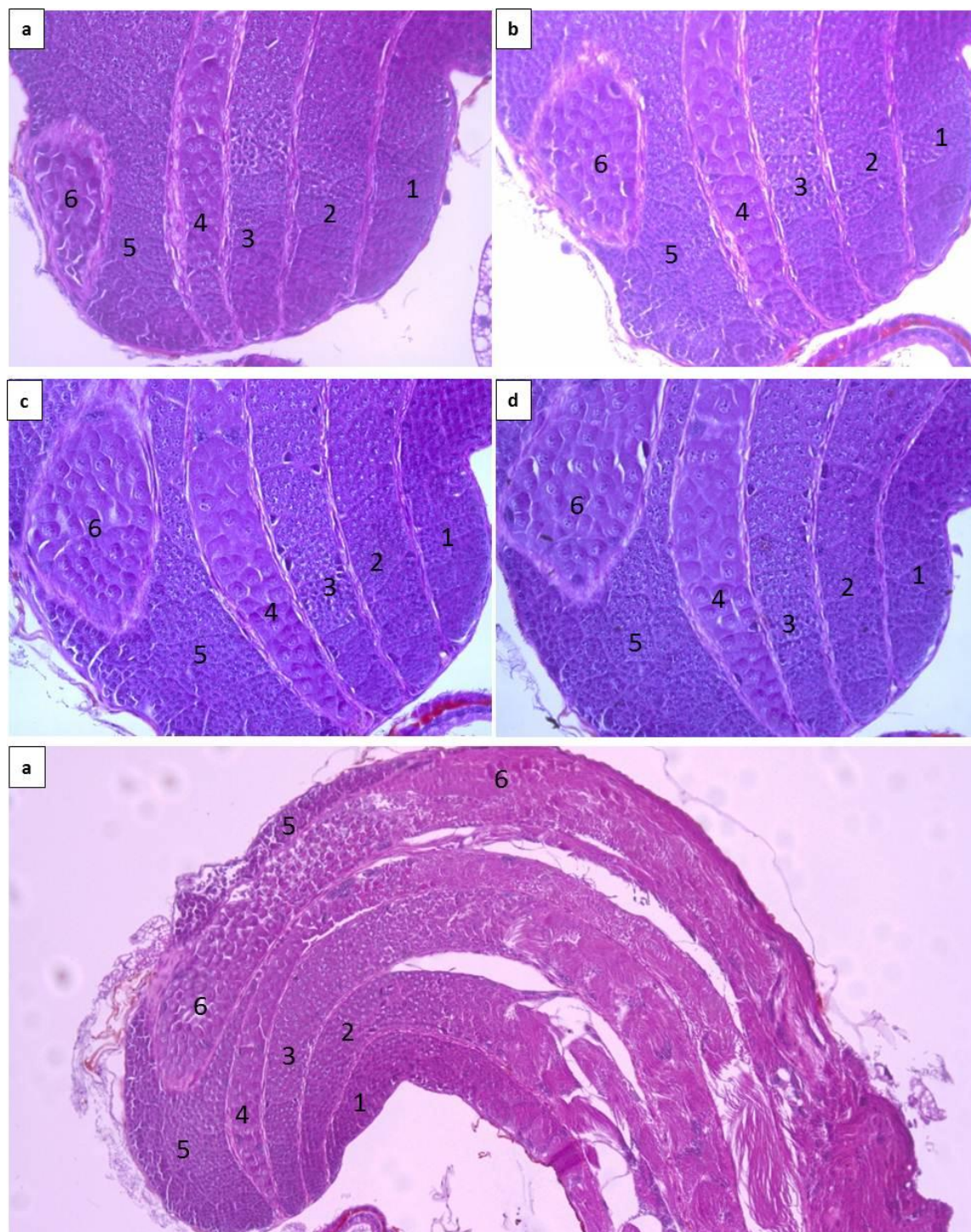
14. PRATT, S. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of an hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. Comparative Spermatology, p. 301-311, 1970.
15. REBAGLIATI, P. J. et al. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. Journal of zoological systematics and evolutionary research, v. 43, n. 3, p. 199-213, 2005.
16. RODRIGUES, A. R., SERRÃO, J. E., TEIXEIRA, V. W., TORRES, J. B., TEIXEIRA, A. A. Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. Journal of insect physiology, v. 54, n. 12, p. 1543-1551, 2008.
17. SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). Experimental Cell Research, Experimental Cell Research, v. 1, n. 3, p. 421-452, 1950.
18. SILBERGLIED, R. E., SHEPHERD, J. G., DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera?. American Naturalist, p. 255-265, 1984.
19. SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M.; COSTA, C. L. A. A.; ITOYAMA, M. M.. A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). Eur. J. Entomol, v. 104, p. 353-362, 2007.
20. SOUZA H. V., ITOYAMA M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). Psyche: A Journal of Entomology, v. 2010, 2010.
21. SOUZA, H. V., MURAKAMI, A. S., DE MOURA, J., DE ALMEIDA, E. C., MARQUES, I. F. G., ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). European Journal of Entomology, v. 108, n. 3, p. 333, 2011.
22. SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G.S..The long and short of sperm polymorphisms in insects. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, v. 77, n. 02, p. 153-182, 2002.

Figure 1. General micrograph of *Antiteuchus tripterus* testis. (a) Lobes 1, 2 and 3, unchanged; 4 and 6, with polymegaly and 5 the harlequin. Note three zones: growth (gz), maturation (mz) and differentiation (dz). Also note the conflicting lobes for a single efferent duct (ed) and a peritoneal sheath around the testis (arrows); b) spermatic bundle, with the tails (arrow) and heads (asterisks) regions. Hematoxylin/eosin; Increases: a) 100x; b) 1000x.



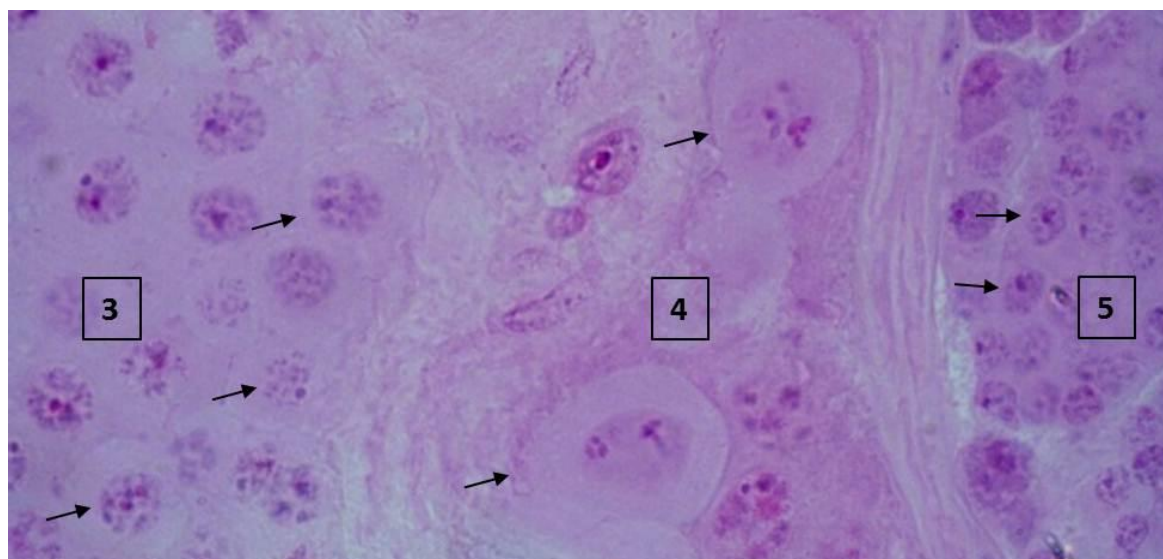
Fonte: Elaborado pelo autor

Figure 2. Micrographs of sequential longitudinal sections of the anterior testicular region (a-d) of *A. tripterus*, indicating the six lobes (1 to 6). a, b) external region of the testis showing the appearance of the lobe 6; c, d) intermediary region of the testis showing lobe 6 growth within 5; e) lobe 6 extending throughout the testis, occupying almost the entire lobe 5. Hematoxylin/eosin; Increases: a-d) 400x; e) 100x.



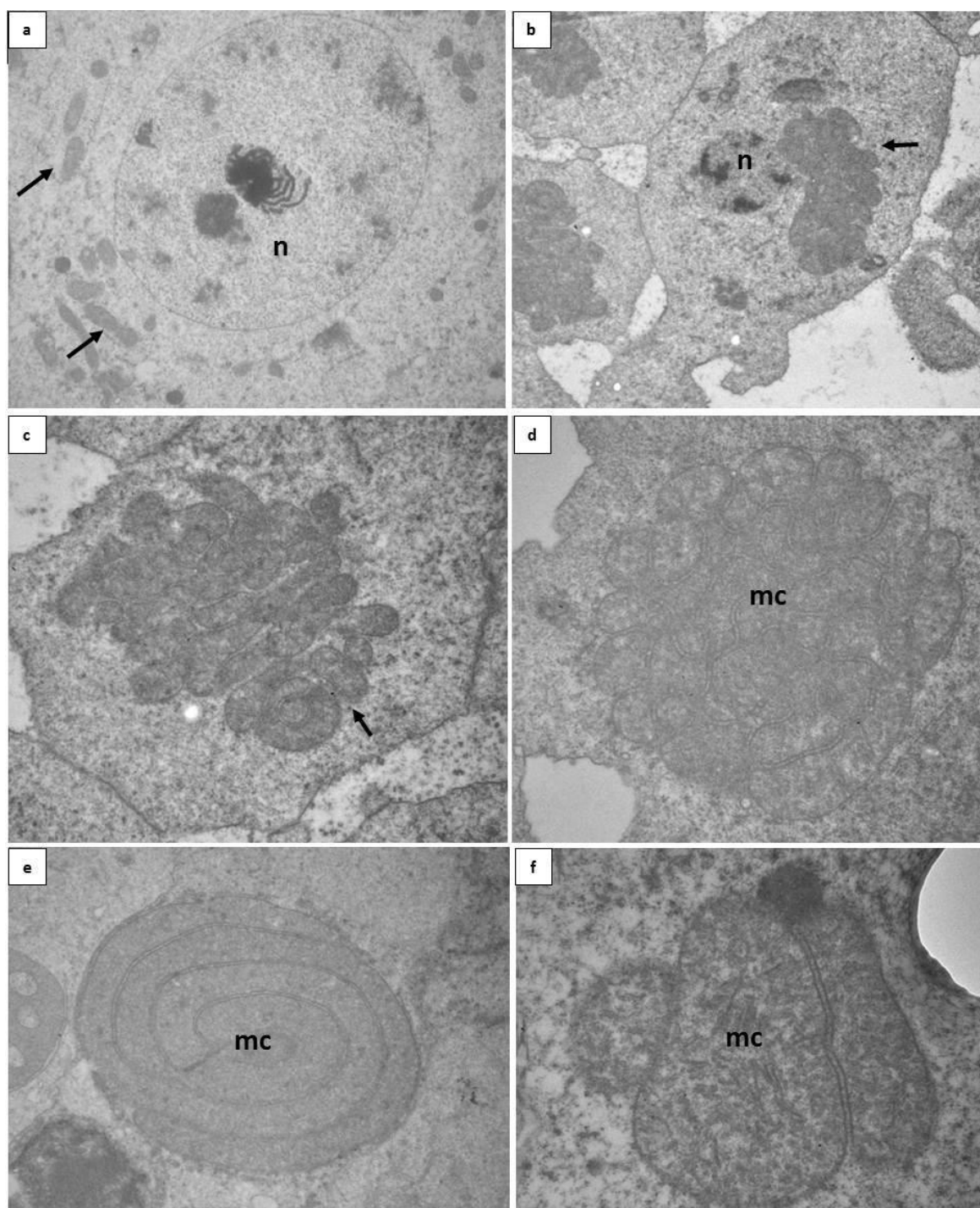
Fonte: Elaborado pelo autor

Figure 3. Micrograph of *A. tripterus* testis showing lobe 3 cells, unchanged, 4 with polymegaly and 5 harlequin. Note that the cells of lobe 4 are the largest, 3 are intermediary and 5, the smallest of all. Hematoxylin / eosin; Magnification: 630x.



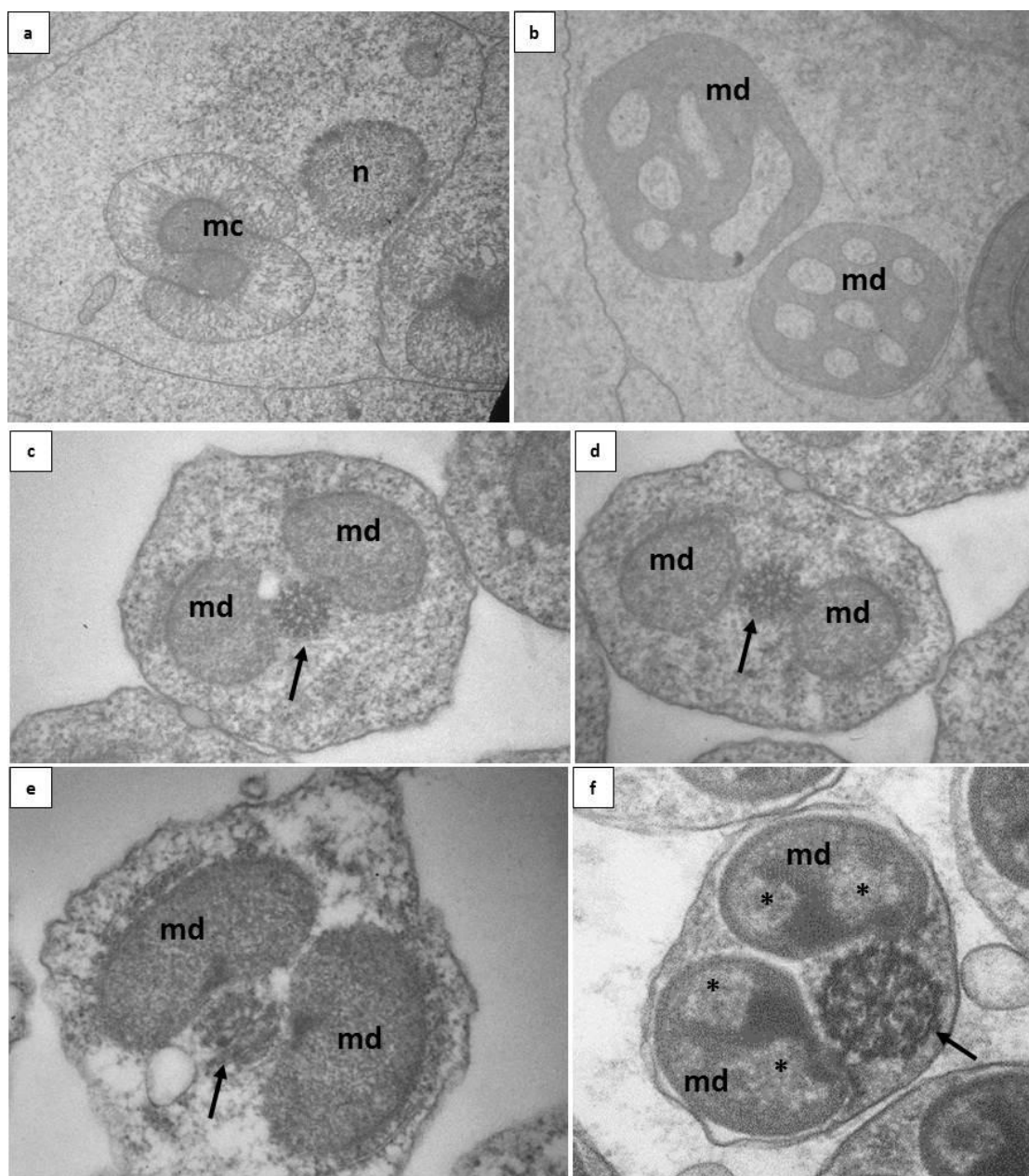
Fonte: Elaborado pelo autor

Figure 4. Electron micrographs of testicular lobes without polymegaly of *A. tripterus* showing the mitochondria at the beginning of their fusion and the formation of the mitochondrial complex. a, b) Initiation of mitochondrial fusion and formation of mitochondrial complex; c, d) Mitochondrial complex with membranes remaining from the fusion process; and f) Advanced mitochondrial complex already losing the inner membranes. Nucleus (n), mitochondrial complex (mc) and mitochondrial clusters (arrows). Increases: a, b) 6000X; c) 14000X; d, e) 20000X; f) 27000X



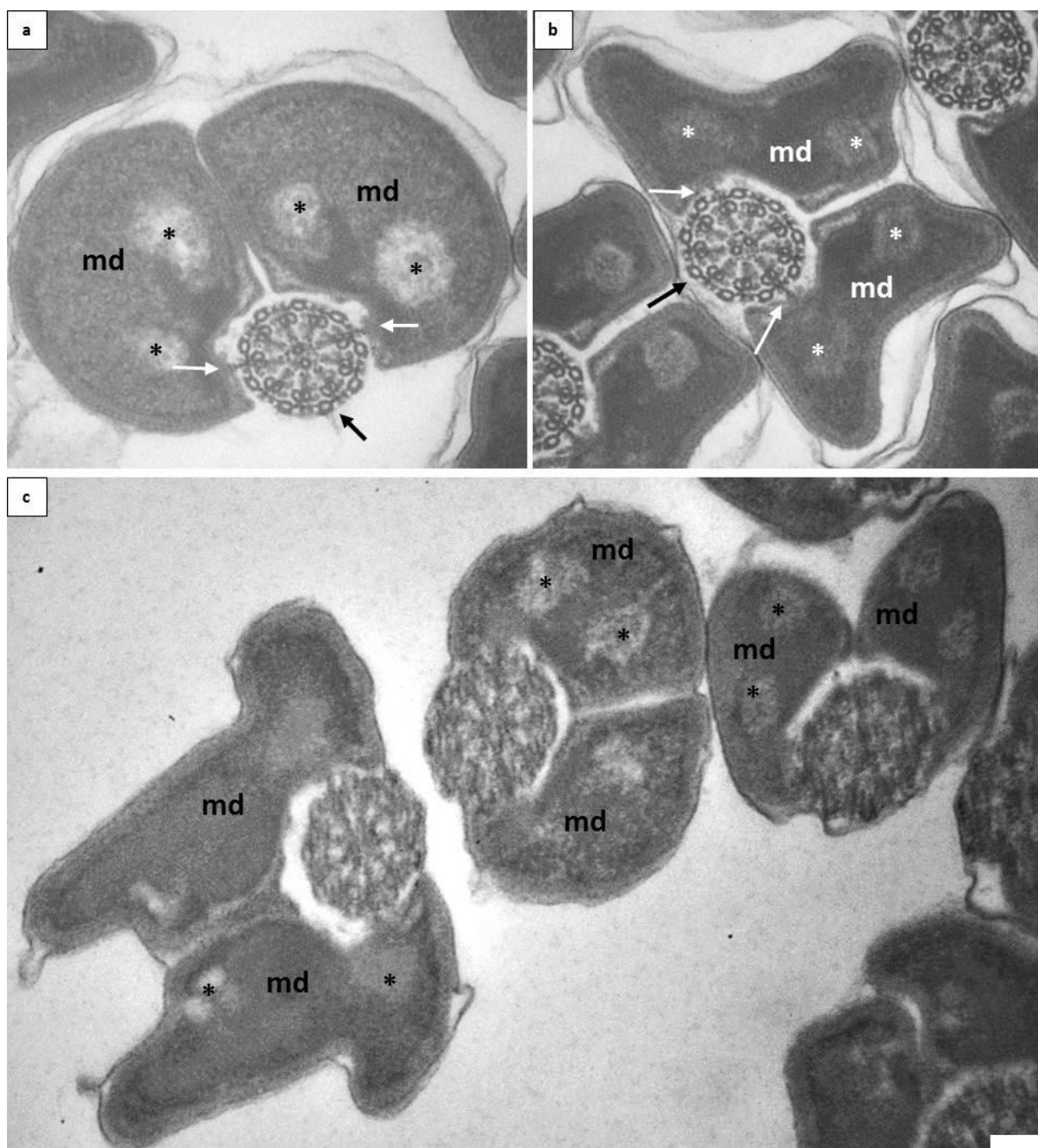
Fonte: Elaborado pelo autor

Figure 5. Electron micrographs of testicular lobes of *A. tripterus*. a, b) Beginning of the division of the mitochondrial complex into two mitochondrial derivatives; c-e) Formation of the tail region, where it is possible to observe the rounded and symmetrical mitochondria derivatives (c, d) which later become elongated (e); f) Advanced stage of mitochondrial derivatives where it is possible to observe the complete axoneme and the appearance of paracrystalline structures. Mitochondrial complex (mc), mitochondrial derivatives (md), paracrystalline structure (asterisk) and axoneme (arrows). Increases: a, b) 20000X; c-f) 40000X.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figure 6. Electron micrographs of the final region of the testicular lobes of *A. tripterus*. a) Large round type of sperm showing two rounded paracrystalline structures, axoneme 9 + 9 + 2 and bridges linking the derivatives to the axoneme; b) Type of sperm with projections at their ends showing two paracrystalline structures inside, axoneme 9 + 9 + 2 and posts linking this to the derivatives; c) The three types of sperm and their components together. Mitochondrial derivatives (md), paracrystalline structure (asterisk), axoneme (dark arrows) and bridges (light arrows). Increases: 40000X



Fonte: Elaborado pelo autor

3 ARTIGO 2 - Transformações nucleares nos diferentes tipos lobos testiculares de *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae: Discocephalinae)

Silva Junior, F.C.; Itoyama, M.M.

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto - SP.

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth
CEP: 15054-000
São José do Rio Preto, SP
ju_fcsj@hotmail.com

Resumo: Os Heteroptera constituem uma das maiores subordens de insetos, na qual podemos destacar a família Pentatomidae que possui oito subfamílias, sendo três (Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae) muito peculiares por apresentarem polimorfismos de espermatozoides oriundos de diferentes alterações testiculares (polimegalia e lobo *harlequin*) que podem ou não estarem presentes conjuntamente nos indivíduos. Com o objetivo de caracterizar ultraestruturalmente as modificações nucleares durante a espermiogênese de indivíduos com a presença de lobos sem alterações, com polimegalia e harlequin espécimes de *Antiteuchus tripterus* foram coletados e seus testículos analisados em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Foi possível verificar que a compactação da cromatina teve início com um aglomerado de textura finamente granular, ao qual se seguiu um "agregado" filamentar e, este último, se organizou para tornar a cromatina completamente compactada no núcleo. Esse processo ocorre de maneira muito semelhante nas espermátides oriundas de lobos sem alterações, com polimegalia e do harlequin, além de que nas espermátides do lobo harlequin foram encontradas todas as estruturas que compõem a cabeça dos espermatozoides. Podemos concluir, portanto, que a condensação da cromatina de *A. tripterus* é semelhante a várias espécies de insetos nas mais diferentes ordens, e que, surpreendentemente, mesmo o lobo *harlequin* que sofre uma meiose atípica tem um comportamento similar de condensação com uma única diferença relacionado ao formato aberrante desses núcleos, sendo, assim, necessários mais estudos para elucidar o comportamento deste lobo durante a espermiogênese.

Palavras-chave: Cromatina; Polimorfismo; Lobo harlequin.

1 Introdução

Heteroptera é uma das quatro subordens da Ordem Hemiptera, possui cerca de 40 mil espécies distribuídas em sete infraordens e oitenta famílias, sendo assim o maior e mais diverso grupo de insetos hemimetábolos (SCHUH; SLATER, 1995; CASSIS; GROSS 2002; HENRY et al., 2017). Dentre as famílias podemos destacar Pentatomidae, uma das maiores famílias de Heteroptera, que está distribuída em 8 subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae), 939 gêneros totalizando 4840 espécies descritas até o momento (CASSIS; GROSS 2002; HENRY et al., 2017).

A subfamília Discocephalinae pode ser considerada peculiar, pois assim como as Edessinae e Pentatominae, podem apresentar polimorfismo de espermatozoides através de dois fenômenos distintos sendo esses a polimegalia e o lobo *harlequin* (SWALLOW; WILKINSON, 2002; REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

A polimegalia é comum em algumas famílias de Heteroptera e consiste em alterações do tamanho e da morfologia dos espermatozoides, sendo o número cromossômico mantido (BOWEN, 1922; SCHRADER; LEUCHTENBERGER 1950; SWALLOW; WILKINSON, 2002). O lobo harlequin, por sua vez, origina espermátides onde existe grande variação no número cromossômico e consequentemente espermatozoides polimórficos (SWALLOW; WILKINSON, 2002; REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

Nestes tipos de fenômenos uma estrutura interessante de se analisar é o núcleo durante a condensação da cromatina devido ao fato de que além da mudança de tamanho celular, existe a diferença de número cromossômico no caso do lobo harlequin devido a sua meiose irregular (SOUZA et al., 2007; 2011).

Portanto para a realização do presente estudo a espécie *Antiteuchus tripterus* pertencente à subfamília Discocephalinae foi utilizada devido ao fato de seu testículo apresentar, segundo Souza et al. (2007), os três tipos de lobos possíveis para a subfamília, sendo lobos sem alteração (1-3), com polimegalia (4 e 6) e o harlequin (5). O objetivo, portanto, foi o de caracterizar ultraestruturalmente as transformações nucleares de espermatozoides oriundos dos três tipos lobos, para verificar se há diferenças nos processos de condensação da cromatina.

2 Material e Métodos

2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Dez espécimes de *Antiteuchus tripterus* foram coletados em São José do Rio Preto (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W) tiveram os testículos extraídos e fixados em Karnovsky por 24 horas para a realização do processamento para microscopia eletrônica de transmissão, os testículos foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig por cerca de 5 minutos cada, 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 solução com concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%) por 15 minutos cada etapa. Após esse processo o material foi incluído em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Os blocos obtidos foram cortados e contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo 0,2 % em solução de hidróxido de sódio 1M. Após esse pós-processamento os cortes foram analisados com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM- 100 CXII.

3 Resultados

Os testículos de *A. tripterus* tiveram os lobos sem alterações, com polimegalia e harlequin, analisados separadamente, sendo os resultados descritos a seguir:

3.1 Lobos sem alterações

Como já descrito, os lobos sem alterações são os 1, 2 e 3. Nestes lobos, observamos que o processo de condensação da cromatina, durante a espermiogênese, inicia-se com a cromatina dispersa (Figura 1a). Essa cromatina começa a se tornar finamente filamentosa (Figura 1b,c), até que esses filamentos se tornem definidos (Figura 1d). Os filamentos de cromatina vão se tornando mais espessos e é notada a presença de blocos de cromatina condensada (Figura 1e-h). Esses blocos vão preenchendo cada vez mais o núcleo até a cromatina estar completamente condensada (Figura 1i-m).

Concomitantemente a condensação da cromatina é possível observar a presença do acrossomo sempre em conjunto com o núcleo em sua região apical, sendo que este também parece sofrer redução de tamanho (Figura 1b-m). Também é possível

observar a manchete de microtúbulos ao redor das duas estruturas, esta manchete está presente desde as fases iniciais de condensação (Figura 1a,b) de maneira mais fina, porém vai se tornando espessa com a evolução da diferenciação (Figura 1c-m).

3.2 Lobos com polimegalia

O quarto e o sexto lobos apresentam polimegalia. Durante a condensação da cromatina nesse tipo de lobo o núcleo apresenta, primeiramente, cromatina granular e amplamente distribuída (Figura 2a), posteriormente essa cromatina se torna densamente filamentosa (Figura 2b), a partir dessa etapa começam a aparecer blocos de cromatina condensada (Figura 2c), esses blocos se apresentam cada vez maiores e ocupando mais o interior do núcleo (Figura 2d-g) até que ocupam todo o interior do núcleo (Figura 2h,i), dando assim fim ao processo.

Ao mesmo tempo em que a cromatina se condensa é possível se observar a presença da manchete de microtúbulos ao redor do núcleo (Figura 2), onde ela se expande com o passar das fases (Figura 2a,b) e depois recua nas fases finais (Figura 2c-i).

3.3 Lobo *harlequin*

O quinto lobo da espécie é o *harlequin*. A condensação da cromatina neste lobo ocorre primeiramente com o núcleo apresentando pequenas porções de heterocromatina na região periférica (Figura 3a), posteriormente é possível se observar a presença de pequenos filamentos cromatínicos ocupando o núcleo, além de este começar a apresentar uma forma irregular (Figura 3b,c), a partir desta etapa o núcleo começa a apresentar cada vez mais regiões heterocromáticas (Figura 3d-f). Essa compactação prossegue até a cromatina estar completamente condensada e o núcleo é um formato fusiforme (Figura 3g).

Um pequeno acrossomo pode ser observado sempre na região lateral do núcleo (Figura 3), é possível se observar também a presença da manchete de microtúbulos ao redor do núcleo, mesmo com o núcleo apresentando formatos irregulares (Figura 3).

4 Discussão

Ao analisarmos ultraestruturalmente os testículos de *A. tripterus* foi possível verificar que quando observamos a compactação da cromatina nos três tipos de lobos houve grande semelhança no processo, sendo que em todos a cromatina se encontra de maneira dispersa e granular no início do processo, passando por um estágio filamentoso onde, posteriormente, estes filamentos se tornam espessos e, finalmente, começam a surgir blocos heterocromáticos que vão ocupando cada vez mais o núcleo das espermatídes até preenchê-los completamente. Esse processo também é muito conservado em outras ordens de insetos se apresentando de maneira semelhante ao descrito em *A. tripterus* em Diptera (GASNER III et al., 1972; TOKUYASU, 1974), Orthoptera (SZOLLOSI, 1974), Isoptera (BACCETTI et al., 1981) e Coleoptera (BÁO; HAMÚ, 1993).

Este processo de condensação da cromatina ocorre pela substituição gradual das histonas nucleares por proteínas muito ricas em arginina ou lisina denominadas protaminas, sendo o resultado deste processo a gradual mudança de forma da cromatina durante a espermiogênese (KING, 1976; KASINSKY et al., 2011).

Foi possível observar, ainda, em todos os lobos, durante a fase de condensação da cromatina nas espermatídes, a presença de manchete de microtúbulos, uma estrutura que é formada por inúmeros microtúbulos orientados na mesma direção que surge ao redor do núcleo em condensação sendo sua principal função a de auxiliar o alongamento nuclear durante a espermiogênese (FAWCETT et al., 1971; SZOLLOSI, 1974; TOKUYASU, 1974; BACCETTI et al., 1981; BÁO; HAMÚ, 1993; FERNANDES et al., 2001).

Uma característica interessante observada no lobo *harlequin* é que os núcleos em condensação apresentam formas aberrantes durante o processo, porém ao final deste processo o núcleo se apresenta semelhante aos dos outros tipos de lobos, sendo essas características ainda não descritas na literatura.

Portanto podemos concluir que a condensação da cromatina nos diferentes tipos de lobos testiculares de *A. tripterus* se dá de maneira semelhante à de várias espécies de insetos nas mais diferentes ordens, e que, surpreendentemente, mesmo no lobo *harlequin* que sofre uma meiose atípica tem um comportamento similar de condensação, sendo necessários mais estudos para elucidar o comportamento deste lobo durante a espermiogênese, como, por exemplo, o que acontece com as espermatídes com poucos ou nenhum cromossomo e a função desses espermatozoides.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2016/10135-9.

5 Referências

BACCETTI, B.; DALLAI, R.; CALLAINI, G. The spermatozoon of Arthropoda: *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 87-99, 1981.

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

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.

CASSIS, G.; G. F. GROSS. Hemiptera: Heteroptera (Pentatomomorpha). In **W. W. K. Houston and G. V. Maynard**. Zoological Catalogue of Australia. CSIRO, Melbourne, Australia, v. 27.3B p. 1-737, 2002.

FAWCETT, D. W.; ANDERSON, W. A.; PHILLIPS, D. M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Developmental biology**, v. 26, n. 2, p. 220-251, 1971.

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, 2001.

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.

HENRY, T. J.; FOOTIT, R. G.; ADLER, P. H. Biodiversity of Heteroptera. **Insect Biodiversity: Science and Society**, v. 1, p. 279-335, 2017.

KASINSKY, H. E.; EIRIN-LOPEZ, J. M.; AUSIÓ, J. Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 8, p. 755-771, 2011.

King, R. C. Handbook of genetics: Volume 5 Molecular Genetics. 1st ed. **New York: Plenum Press**, p.161.1976.

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.

SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 3, p. 421-452, 1950.

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.

SILBERGLIED, R. E., SHEPHERD, J. G., & DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera?. **American Naturalist**, p. 255-265, 1984.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M.; COSTA, C. L. A. A.; ITOYAMA, M. M.. A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Eur. J. Entomol**, v. 104, p. 353-362, 2007.

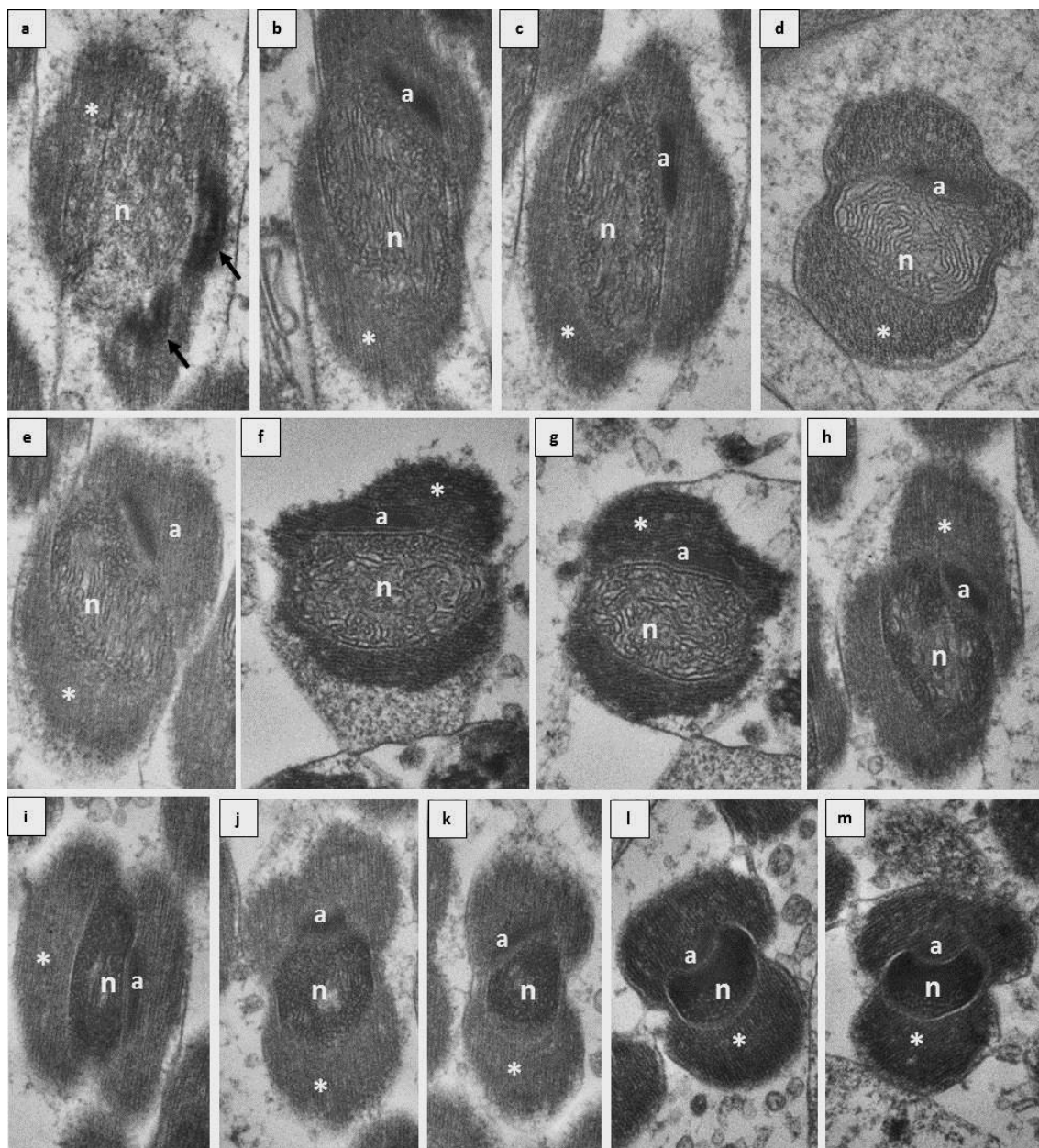
SOUZA, H. V., MURAKAMI, A. S., DE MOURA, J., DE ALMEIDA, E. C., MARQUES, I. F. G., ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, n. 3, p. 333, 2011.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G.S..The long and short of sperm polymorphisms in insects. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 02, p. 153-182, 2002.

SZÖLLÖSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect Orthoptera). **Journal of ultrastructure research**, v. 50, n. 3, p. 322-346, 1975.

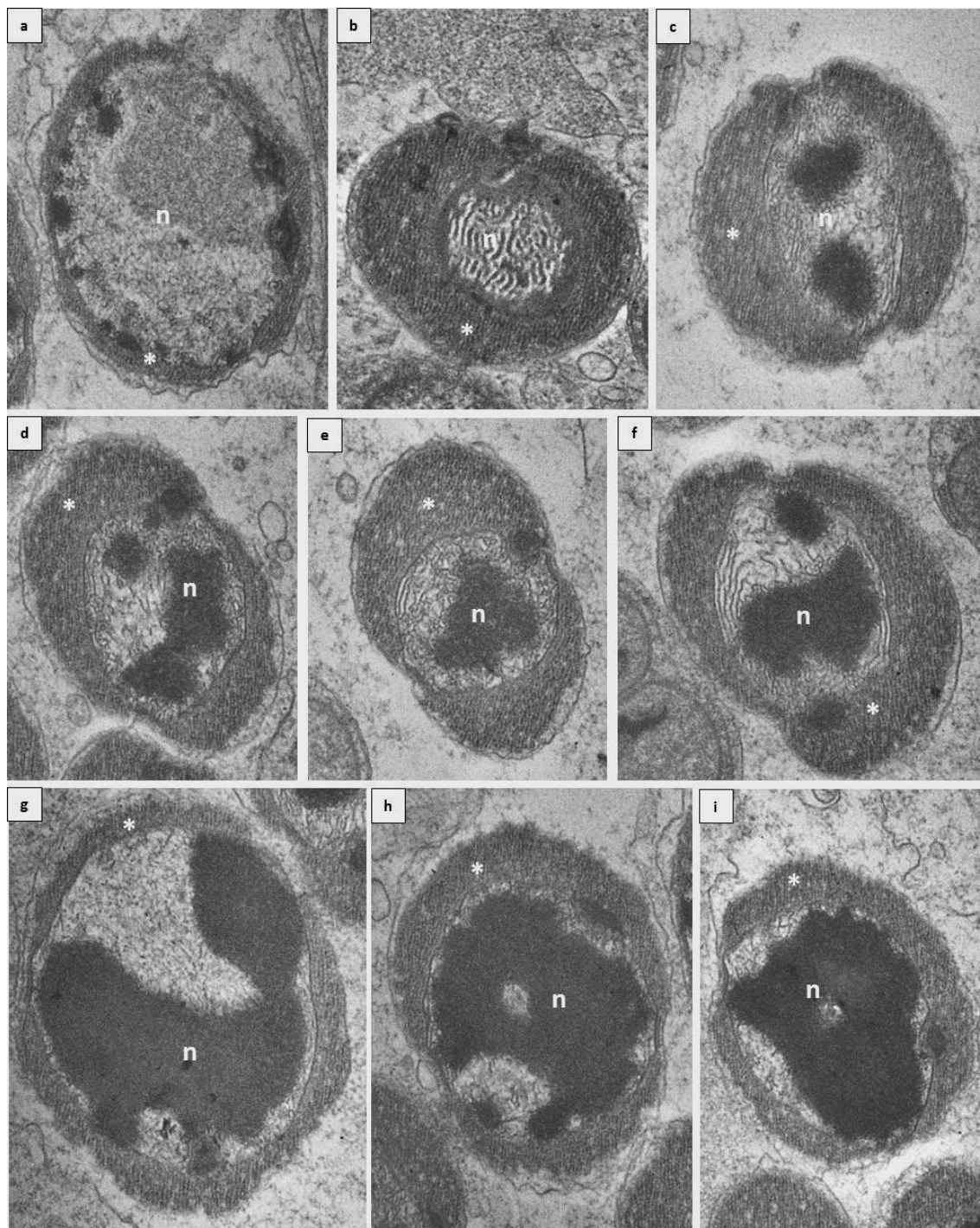
TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: IV. Nuclear transformation. **Journal of ultrastructure research**, v. 48, n. 2, p. 284-303, 1974.

Figura 1. Eletromicrografias dos testículos *A. tripterus* evidenciando as transformações do processo de condensação da cromatina durante a espermiogênese dos lobos sem alterações. a-g) Observar o processo de condensação da cromatina e a redução do núcleo com o auxílio dos microtúbulos; h-m) Aparecimento do estrangulamento nuclear e de blocos de cromatina até a total compactação da cromatina (l,m). Núcleo (n), acrosomo (a), microtúbulos (asterisco) e adjunto do centríolo (setas). Aumentos: 27000x.



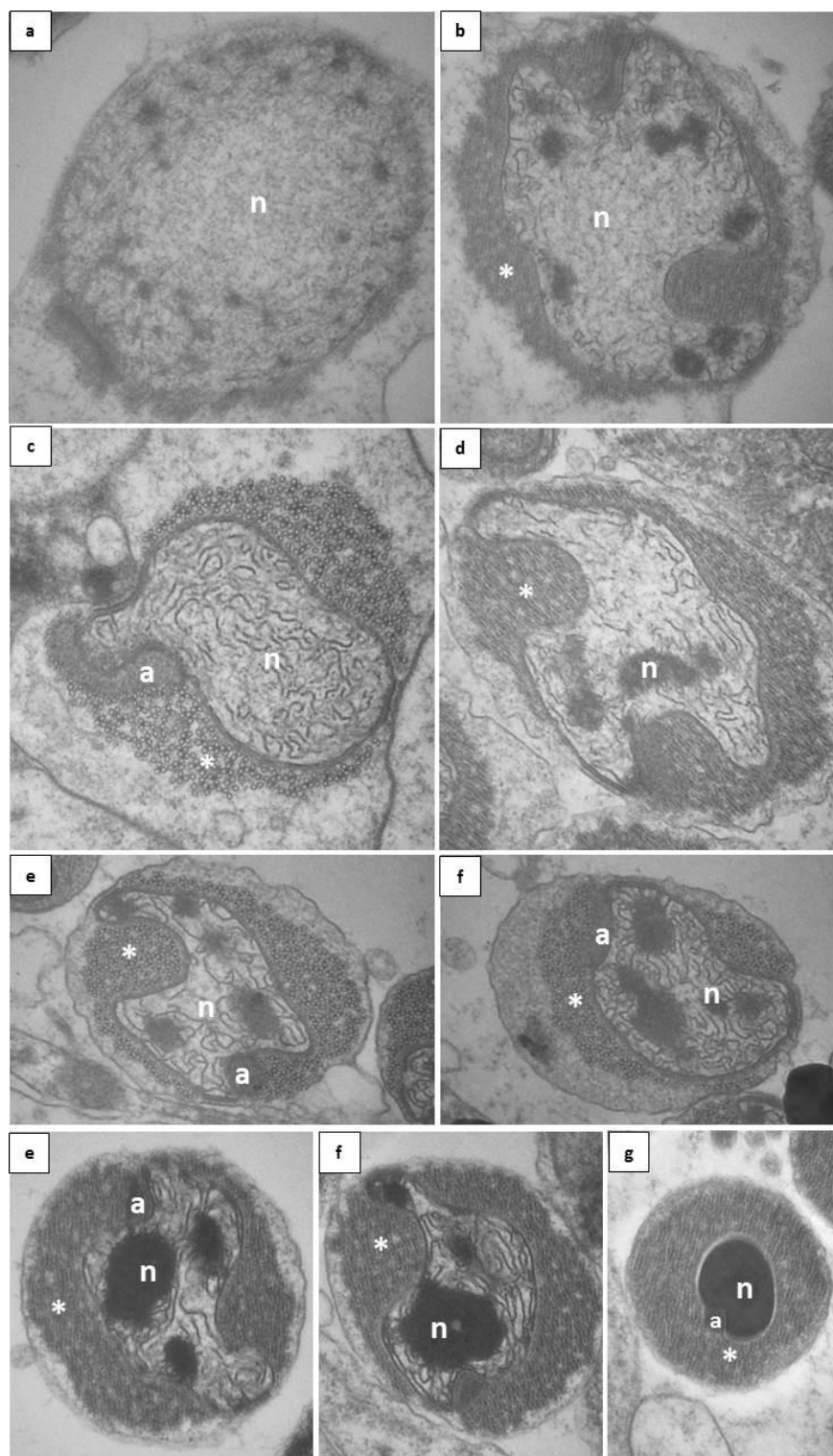
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2. Eletromicrografias dos testículos *A. tripterus* as transformações do processo de condensação da cromatina durante a espermiogênese dos lobos com polimegalia. a) Cromatina começando a se condensar; b) Cromatina filamentosa se compactando enquanto o núcleo vai sendo reduzido de tamanho com auxílio dos microtúbulos; c-i) Cromatina filamentosa se condensa em blocos que ocupam cada vez mais o núcleo. Núcleo (n) e microtúbulos (asterisco). Aumentos: 27000x.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3. Eletromicrografias dos testículos *A tripterus* com as transformações do processo de condensação da cromatina durante a espermiogênese do lobo *harlequin*. a,b) Cromatina começando a se condensar, apresentando regiões de cromatina condensada na periferia nuclear; c) Cromatina filamentosa se compactando enquanto o núcleo vai reduzindo de tamanho com auxílio dos microtúbulos; d-f) Cromatina filamentosa se condensa em blocos de heterocromatina que ocupam cada vez mais o núcleo; g) Núcleo condensado com o acrossomo ao seu lado. Núcleo (n), microtúbulos (asterisco) e acrossomo (a). Aumentos: 40000x.



Fonte: Elaborado pelo autor

4 ARTIGO 3 - Caracterização ultraestrutural da espermiogênese de espécies de Edessinae (*Edessa meditabunda*) e Pentatominae (*Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus*) (Heteroptera: Pentatomidae)

Silva Junior, F.C.; Itoyama, M.M.

1 – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto - SP.

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth
CEP: 15054-000
São José do Rio Preto, SP
ju_fcsj@hotmail.com

Resumo

Polimorfismos de espermatozoides podem ser originados nos lobos testiculares com polimegalia, fenômeno comum nas espécies de Pentatomidae (Heteroptera), e pelo lobo *harlequin* que é um fenômeno mais raro. Com o objetivo de caracterizar ultraestruturalmente a espermiogênese e evidenciar os polimorfismos e os fenômenos que os originaram, amostras das espécies *Edessa meditabunda*, *Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus* foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em *E. meditabunda* o testículo apresentou quatro lobos todos sem alterações, também se observou só um tipo de espermátide com forma arredondada que dá origem a um tipo de espermatozoide, já *L. deducta* apresenta sete lobos testiculares sendo o 5 o *harlequin* e os demais sem alterações. Foi possível observar a presença de um tipo maior e arredondado de espermátide oriunda dos lobos sem alterações e um tipo menor e de morfologia irregular originado do lobo *harlequin*. Foi possível, também, observar dois tipos de espermatozoides no ducto eferente onde o primeiro tipo é menor e mais arredondado, com pequenas estruturas paracristalinas em seu interior e o segundo tipo é maior e mais retangular e com grandes estruturas paracristalinas, sendo um tipo oriundo de lobos sem alterações e outro do lobo *harlequin*. Em *P. albopunctulatus* se observou seis lobos testiculares, sendo o 4 e 6 com polimegalia e os demais sem alterações, também foi possível visualizar espermátides normais e arredondadas presentes nos lobos sem alterações, enquanto nos lobos com polimegalia estavam presentes espermátides gigantes com muitas mitocôndrias e vesículas em seu citoplasma. Portanto, podemos concluir que a formação dos espermatozoides e seus componentes nas espécies analisadas são semelhantes a outros indivíduos estudados da

família Pentatomidae e, também, de outras ordens de insetos estudadas. Pode ser verificado, também, que existe polimorfismo nos espermatozoides das espécies estudadas de acordo com a presença fenômenos testiculares nelas.

Palavras chave: Polimorfismos, Polimegalia, Lobo *harlequin*.

1 Introdução

Dentre as oitenta famílias de Heteroptera um dos grandes destaques é a família Pentatomidae, a quarta maior com mais de 4.000 espécies descritas. A maior parte das espécies desta família são fitófagas causando, assim, grande dano às culturas de diversas espécies vegetais, atacando principalmente leguminosas como, por exemplo, a soja e o feijão. As espécies, desta família, estão distribuídas em 8 subfamílias (Asopinae, Cyrtocorinae, Discocephalinae, Edessinae, Pentatominae, Phyllocephalinae, Podopinae e Serbaninae) e 760 gêneros (SCHUH; SLATER, 1995; SCHAEFER; PANIZZI, 2000; PONCIO et al., 2010).

Os membros da família Pentatomidae possuem um par de testículos alongados, recobertos por um epitélio protetor, a bainha peritoneal, de coloração variando de amarelado ao avermelhado. Eles são divididos em pequenos compartimentos denominados lobos, podendo variar de 3 a 7 (sendo 6, o mais comum) (PHILLIPS, 1970; SOUZA et al., 2011; DALLAI, 2014). Espécies, desta família, podem apresentar testículos com lobos: a) sem alterações como *Edessa mediatubunda*, *Edessa collaris* e *Thyanta perditor*; b) sem alterações e com polimegalia como *Proxys albopunctulatus* e *Euchistus heros*; c) sem alterações e com lobo *harlequin* como *Loxa deducta* e *Thyanta custator*; ou d) sem alterações, polimegalia e *harlequin* como *Antiteuchus tripterus*, *Nezara viridula* e *Loxa viridis* (SOUZA et al., 2010, 2011).

Algumas espécies de Pentatomidae podem apresentar espermatozoides polimórficos, sendo que esse polimorfismo consiste na produção de mais de um tipo de espermatozoide onde somente um tipo é considerado fecundante e os outros possuem algumas funções sugeridas como, por exemplo, o preenchimento da espermateca da fêmea impedindo a entrada de espermatozoides concorrentes e a nutrição de espermatozoides fecundantes e dos óvulos (SWALLOW; WILKINSON, 2002; SOUZA et al, 2011). No lobo *harlequin* podemos observar estes polimorfismos onde os espermatozoides são produzidos a partir de divisões meióticas aberrantes, podendo, as células, apresentar números cromossômicos extremamente variáveis, sendo normalmente os espermatozoides

de menores tamanhos (BOWEN, 1922; SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1960; SOUZA et al., 2007).

A maioria das oito subfamílias de Pentatomidae apresenta polimegalia em algumas de suas espécies com exceção das subfamílias Asopinae e Acanthosomatinae (SOUZA et al., 2011). Já o lobo *harlequin* é um fenômeno que possui distribuição mais restrita, sendo que nesta família, somente as subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae apresentam este tipo de lobo, sendo 22 espécies descritas, até o momento, com este fenômeno (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007, 2010).

Edessinae é uma pequena subfamília contendo apenas 13 espécies descritas pertencentes a 4 gêneros (REBAGLIATI et al., 2003) a qual pertence *Edessa meditabunda*. Esta espécie possui quatro lobos testiculares (sem alterações), bainha peritoneal avermelhada e complemento cromossômico de $2n = 12A + XY$ (REBAGLIATI et al., 2003; SOUZA et al., 2011).

A subfamília Pentatominae é a maior de Pentatomidae possuindo mais de 3.300 espécies descritas, distribuídas em 632 gêneros (GARBELOTTO; CAMPOS, 2014). A espécie *Loxa deducta* (Pentatominae) possui sete lobos testiculares (sem alterações e *harlequin*, quinto lobo), bainha avermelhada e $2n = 14$ cromossomos ($12 A + XY$) (SOUZA et al., 2011). Já *Proxys albopunctulatus* (Pentatominae) possui seis lobos testiculares (sem alterações e polimegalia, 4 e 6), bainha avermelhada e $2n = 14$ cromossomos ($12 A + XY$) (SOUZA et al., 2011).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a comparação ultraestrutural da espermiogênese de espécies com padrões diferentes de testículos (lobos sem alterações; sem alterações e *harlequin*; sem alterações e polimegalia), além de analisar ultraestruturalmente os espermatozoides formados a partir desses lobos.

2 Material e Métodos

2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os espécimes de *Edessa meditabunda* (Edessinae), *Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus* (Pentatominae) coletados em São José do Rio Preto, SP, Brasil (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W), sendo dez indivíduos de cada. Os testículos foram extraídos e mantidos em Karnovsky por 24 horas para a realização do processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Posteriormente, os testículos foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig por cerca de 5 minutos cada, 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 solução com concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%) por 15 minutos cada etapa. Após esse processo o material foi incluído em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Os blocos obtidos foram cortados e contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo 0,2 % em solução de hidróxido de sódio 1M. Após esse pós-processamento os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM- 100 CXII.

3 Resultados

As informações referentes às análises ultraestruturais dos testículos de *Edessa meditabunda* (Edessinae), *Loxa deducta* (Pentatominae) e *Proxys albopuctulatus* (Pentatominae) estão descritas a seguir:

3.1 *Edessa meditabunda* (Lobos sem alterações)

As análises ultraestruturais dos testículos confirmaram que esta espécie possui somente lobos sem alterações, por este motivo, os resultados estão descritos em conjunto. Na parte anterior do testículo há os cistos espermáticos (Figura 1a,b), constituídos por espermátides, todas na mesma orientação e fase de diferenciação (Figura 1a,b). As análises das espermátides, de todos os lobos testiculares, mostraram espermátides com pequenas quantidades de mitocôndrias, arredondadas, distribuídas uniformemente e que, posteriormente, foram se agrupando (Figura 1c,d).

Durante a formação da cauda do espermatozoide as mitocôndrias aumentam em número e se deslocam para um dos polos da célula se fundindo, dando origem ao complexo mitocondrial (Figura 2a,b) que inicialmente apresenta varias membranas no seu interior (Figura 2a) que vai se perdendo gradativamente (Figura 2b). Posteriormente, este complexo começa a se dividir dando origem a dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes (Figura 2c) que se tornam simétricos e são arredondados com uma pequena vesícula em seu interior (Figura 2d) e, posteriormente, se tornam reniformes (Figura 2e,f). Nesta fase, é possível observar, também, estruturas paracristalinas no interior de cada um dos derivados, sendo estas estruturas de formato irregular e em número de duas, em cada derivado mitocondrial (Figuras 2e). Outra estrutura observada é o axonema apresentando a conformação de 9+9+2, sendo nove microtúbulos acessórios externos, nove duplas de

microtúbulos mais internos e dois microtúbulos centrais e ainda, pontes conectando os derivados mitocondriais ao axonema (Figura 2f), além de ser possível encontrar apenas um tipo de espermatozoide (Figura 2f).

Cortes transversais, sequenciais, foram realizados ao longo do comprimento das espermatídes (Figura 3). A região inicial da cabeça apresentou microtúbulos circundando o núcleo e o acrosso grande (Figura 3a,b). Na região mediana foi possível notar a redução do acrosso e a cromatina completamente condensada (Figura 3b,c). Na região de transição núcleo-flagelo (cabeça-cauda) observou-se a região terminal do núcleo e a porção inicial do adjunto do centríolo (Figura 3d). Na região da cauda foram observados os derivados mitocondriais e o axonema (Figura 3e).

3.2 *Loxa deducta* (Lobos sem alterações e *harlequin*)

Ao analisarmos ultraestruturalmente o testículo de *Loxa deducta* foi possível observar que eles são formados por lobos sem alterações (lobos 1, 2, 3, 4, 6 e 7) e *harlequin* (lobo 5). Observamos inicialmente que os lobos sem alterações e *harlequin* apresentam o processo inicial da espermatogênese semelhante, diferindo somente na fase de espermiogênese. Portanto a fase inicial será descrita em conjunto. Inicialmente, os testículos apresentam cistos espermáticos com todas as células na mesma fase de diferenciação e voltadas para a mesma posição, sendo que estes cistos se apresentam de forma arredondada (Figura 4a,b).

Foram encontrados dois tipos de espermatídes (Figura 4c,d), sendo o tipo maior proveniente dos lobos sem alterações (Figura 4c). Estes possuem mitocôndrias em profusão ao redor do núcleo que se fundem para formar o complexo mitocondrial. O tipo menor é proveniente do lobo *harlequin* e possui morfologia irregular (Figura 4d), estas com poucas mitocôndrias ao redor do núcleo que se fundem e dão origem ao complexo mitocondrial.

A formação da cauda do espermatozoide se deu de maneira semelhante nos dois tipos lobulares (sem alterações e *harlequin*) de *L. deducta*, sendo as mitocôndrias arredondadas se deslocando para um dos polos da célula e se fundindo, dando origem ao complexo mitocondrial com várias membranas em seu interior (Figura 5a), esse complexo vai perdendo as membranas ao longo da diferenciação (Figura 5b) e, posteriormente, se divide dando origem aos derivados mitocondriais que são simétricos (Figura 5c-e), localizados bilateralmente ao axonema (Figura 6), e no fim da diferenciação assumem morfologias diferentes (Figura 6).

Estruturas paracristalinas no interior de cada um dos derivados foram observadas sendo de formato irregular e em número de duas em cada derivado mitocondrial (Figura 6). O axonema observado apresentou a conformação de 9+9+2 (nove microtúbulos acessórios externos, nove duplas de microtúbulos mais internos e dois microtúbulos centrais) (Figura 6), e ainda, pontes conectando os derivados mitocondriais ao axonema (Figura 6c).

Foi possível observar a presença de dois tipos morfológicos de espermatozoides (Figura 5a), sendo o primeiro tipo menor e mais arredondado com pequenas estruturas paracristalinas em seu interior (Figura 5b) e o segundo tipo maior e mais retangular e com grandes estruturas paracristalinas (Figura 5c).

Cortes sequenciais foram realizados nas espermátides dessa espécie, sendo a região inicial da cabeça apresentando microtúbulos circundando o núcleo e um acrossomo grande (Figura 7a,b), na região mediana foi possível verificar que a cromatina ainda se mostra filamentosa (Figura 7c-e), já na região de transição núcleo-flagelo observou-se a região terminal do núcleo e a porção inicial do adjunto do centríolo (Figura 7f,g). Ainda foi possível observar a zona de sobreposição do núcleo com o flagelo, onde se encontram o final do núcleo e o início dos derivados mitocondriais (Figura 7h,i). Na região da cauda foram observados os derivados mitocondriais e o axonema (Figura 7j) e, também, que no fim da cauda os derivados desaparecem restando somente o axonema (Figura 7k,l).

3.3 *Proxys albopunctulatus* (Lobos sem alterações e com polimegalia)

Nas análises ultraestruturais realizadas em *P. albopunctulatus* foi observada a presença de lobos sem alterações e lobos com polimegalia. Também foram observados cistos com espermátides em um mesmo estágio de diferenciação, sendo esses cistos arredondados (Figura 8a,b).

Nos lobos sem alterações foram encontradas espermátides de tamanho pequeno e arredondadas que possuem, relativamente, poucas mitocôndrias ao redor do núcleo (Figura 8c), já nos lobos com polimegalia foi possível verificar a presença de grandes espermátides com inúmeras mitocôndrias ao redor do núcleo (Figura 8d).

A cauda da espermátide foi formada de maneira semelhante nos dois tipos de lobos, sendo que as mitocôndrias ao redor do núcleo migram para um polo e se fundem formando o complexo mitocondrial (Figura 9a), esse complexo possui inúmeras membranas em seu interior e vai perdendo-as com o passar da diferenciação (Figura 9a,d),

posteriormente o complexo começa a se dividir (Figura 9e) e dá origem a dois derivados mitocondriais (Figura 9f).

Os derivados mitocondriais irão se localizar no polo basal do núcleo, a partir do ajunto do centríolo será formado o axonema que irá se localizar entre os derivados (Figura 10a), posteriormente os derivados se tornam simétricos adotando a morfologia típica da estrutura para a espécie (Figura 10b).

4 Discussão

As espécies *Edessa meditabunda*, *Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus* tiveram seus testículos analisados ultraestruturalmente, no presente trabalho, onde foi observado que *E. meditabunda* apresenta quatro lobos testiculares sem nenhuma alteração corroborando o encontrado por Rebagliati et al. (2003) e Souza et al. (2011), *L. deducta* apresentou sete lobos testiculares sendo o quinto o *harlequin* e *P. albopunctulatus* com seis lobos apresentando polimegalia no 4 e 6 corroborando, assim, com Souza et al. (2011) em seu estudo citogenético com as mesmas espécies.

As três espécies estudadas apresentaram espermatogênese cística, característica, esta, encontrada, também, por Phillips (1970), Dumser (1980) e Dallai (2014) em várias ordens de insetos, Nelsen (1931) em *Melanoplus differentialis* (Orthoptera) e Quagio-Grassiotto e Lello (1996) em *Dermatobia hominis* (Diptera), sendo essa característica padrão para a classe Insecta (DALLAI, 2014).

Sobre a formação do espermatozoide foi possível observar, nas espécies estudadas, que o processo de migração das mitocôndrias para um polo celular e fusão formando o complexo mitocondrial, e posteriormente, a divisão do complexo dando origem a dois derivados mitocondriais, além da formação do axonema entre eles, foi de maneira semelhante as outras espécies, sendo a principal diferença que para *E. meditabunda* os derivados são pequenos e em posição lateral ao axonema enquanto *L. deducta* são encontrados dois tipos de espermatozoides sendo um mais arredondado e outro aparentemente retangular. Este processo é semelhante nas mais diversas ordens de insetos, como Orthoptera, Diptera, Hymenoptera, Heteroptera, entre outras (PRATT 1970; PHILLIPS 1970; MERCATI et al., 2009; DALLAI, 2014). Quanto ao axonema das espécies estudadas foi encontrado o padrão de microtúbulos de 9+9+2 considerado comum para a classe Insecta (NAME et al., 2012; DALLAI, 2014; DALLAI et al., 2016; CUQUETTO-LEITE et al., 2017).

Devido ao fato de não possuir alterações nos lobos *E. mediatunda* apresentou apenas um tipo de espermatozoide, resultados semelhantes aos encontrados para outras espécies de Pentatomidae como *Thynacanta marginata* e *Supputius cincticeps* por Araújo et al. (2011). Já *L. deducta* que possui o lobo *harlequin* apresentou dois tipos de espermatozoides, sendo este resultado semelhante a de outros Pentatomidae estudados (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950; SWALLOW; WILKINSON, 2002; SOUZA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2011).

Portanto, podemos concluir que a formação dos espermatozoides e seus componentes nas espécies analisadas, no presente trabalho, é semelhante a outros indivíduos estudados da família Pentatomidae e, também, de outras ordens de insetos estudadas. Além de ser verificado que a morfologia dos espermatozoides das espécies estudadas difere entre elas já que em *E. mediatunda* os derivados são pequenos e em posição lateral ao axonema enquanto *L. deducta* são encontrados espermatozoides com derivados maiores e mais unidos ao redor do axonema, além de diferirem até dentro da mesma espécie como no caso de *L. deducta* que apresentou dois tipos de espermatozoides no presente trabalho.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2016/10135-9.

5 Referências

- 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.
- 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.
- CUQUETTO-LEITE, L., DOLDER, H., OLIVEIRA, P. S., SANTO, N. E., LINO-NETO, J., MANCINI, K. C. Structural and ultrastructural characterization of the spermatozoa in *Pachycondyla striata* and *P. marginata*. **Insectes sociaux**, v. 64, n. 2, p. 209-217, 2017.
- 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., 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

DUMSER, J. B. The regulation of spermatogenesis in insects. **Annual review of entomology**, v. 25, n. 1, p. 341-369, 1980.

GARBELOTTO, T.A., CAMPOS, L.A. A subfamília Pentatominae. In: Pentatominae do Sul de Santa Catarina. **Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia**, p. 7-8, 2014.

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.

NELSEN, O. E. Life cycle, sex differentiation, and testis development in *Melanoplus differentialis* (Acrididae, Orthoptera). **Journal of Morphology**, v. 51, n. 2, p. 467-525, 1931.

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

PONCIO, S., DEQUECH, S. T. B., STURZA, V. S., LISSNER, R. A. D., PERLIN, L. F., ROSALINO, P. K., & RIBEIRO, L. D. P. (2010). First report of *Stiretrus de castigmus* in Brazil preying *Microtheca ochroloma*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1203-1205, 2010.

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

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DE LELLO, E. Cytoplasmic bridges, intercellular junctions, and individualization of germ cells during spermatogenesis in *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Journal of morphology**, v. 227, n. 2, p. 145-154, 1996.

REBAGLIATI, P. J.; PAPESCHI, A. G.; MOLA, L. M. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa meditabunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **European Journal of Entomology**, v. 100, n. 1, p. 11-18, 2003.

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.

SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 3, p. 421-452, 1950.

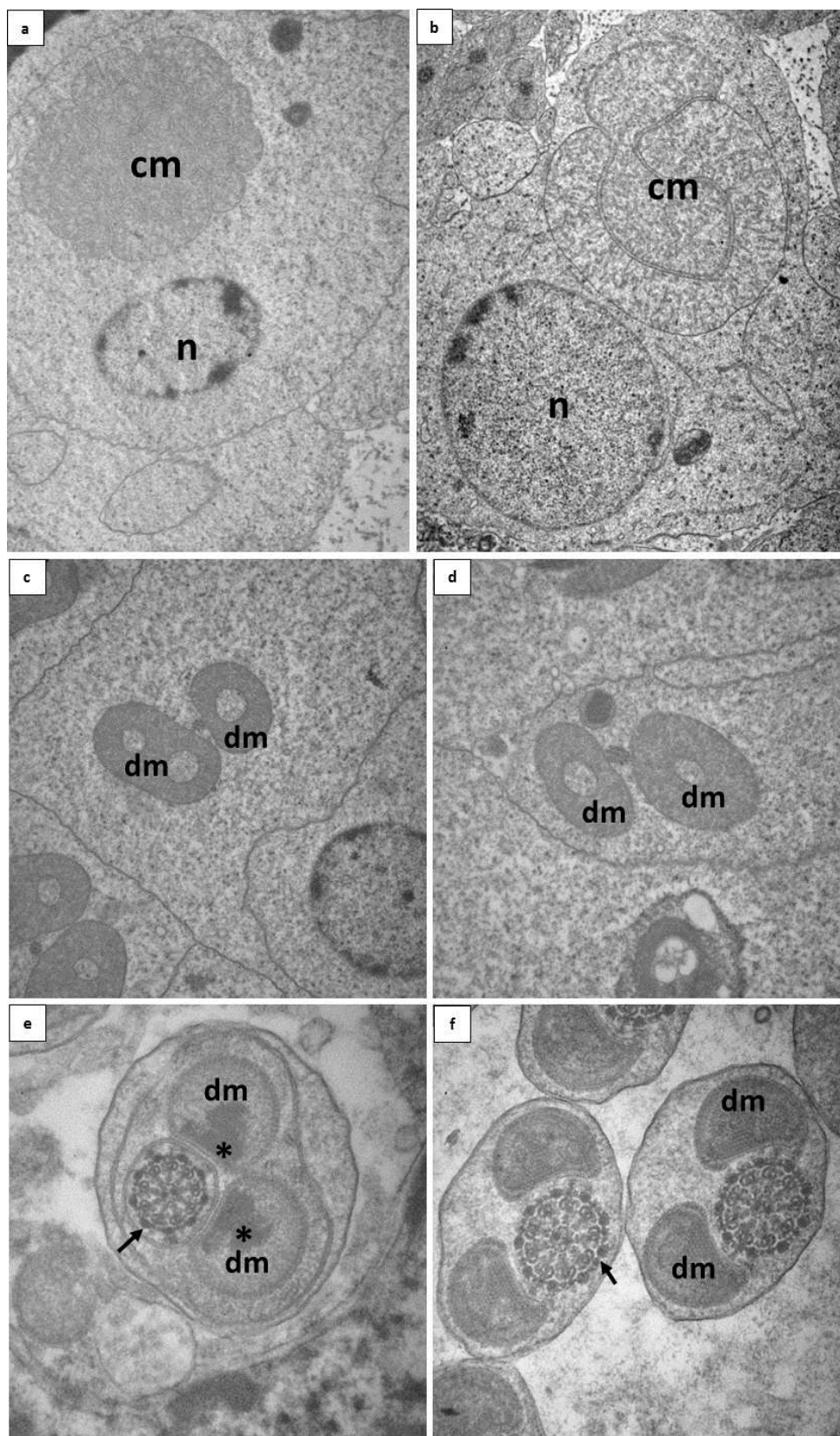
SOUZA H. V., ITOYAMA M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2010, 2010.

SOUZA, H. V., MURAKAMI, A. S., DE MOURA, J., DE ALMEIDA, E. C., MARQUES, I. F. G., ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, n. 3, p. 333, 2011.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G.S..The long and short of sperm polymorphisms in insects.**Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 02, p. 153-182, 2002.

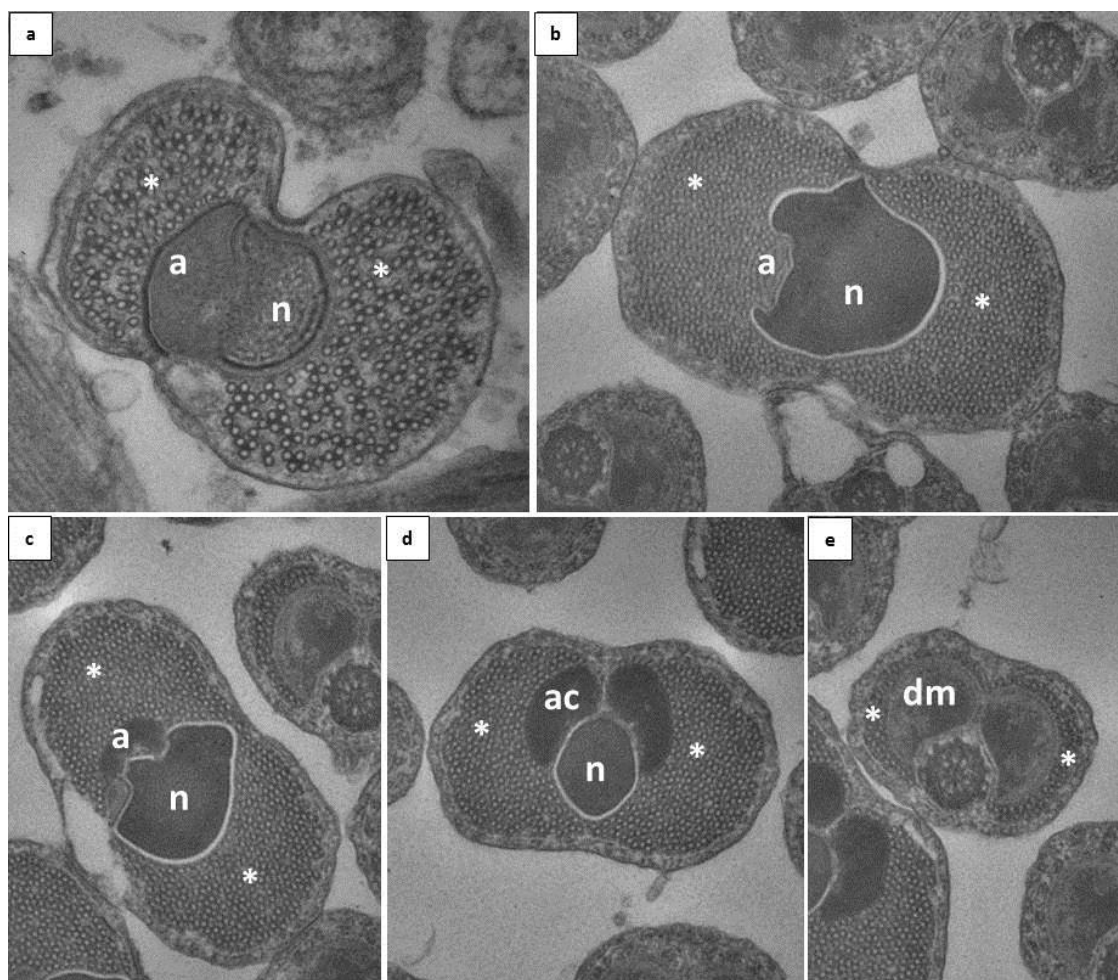


Figura 2. Eletromicrografias dos testículos *E. meditabunda*. a,b) Formação do complexo mitocondrial; c,d) Divisão do complexo em derivados mitocondriais e a formação do axonema; e,f) Derivados mitocondriais simétricos com estruturas paracristalinas em seu interior e axonema 9+9+2. Núcleo (n), complexo mitocondrial (cm), derivados mitocondriais e axonema (setas). Aumentos: a) 14000x; b) 20000x; c) 80000x; d) 100000x.



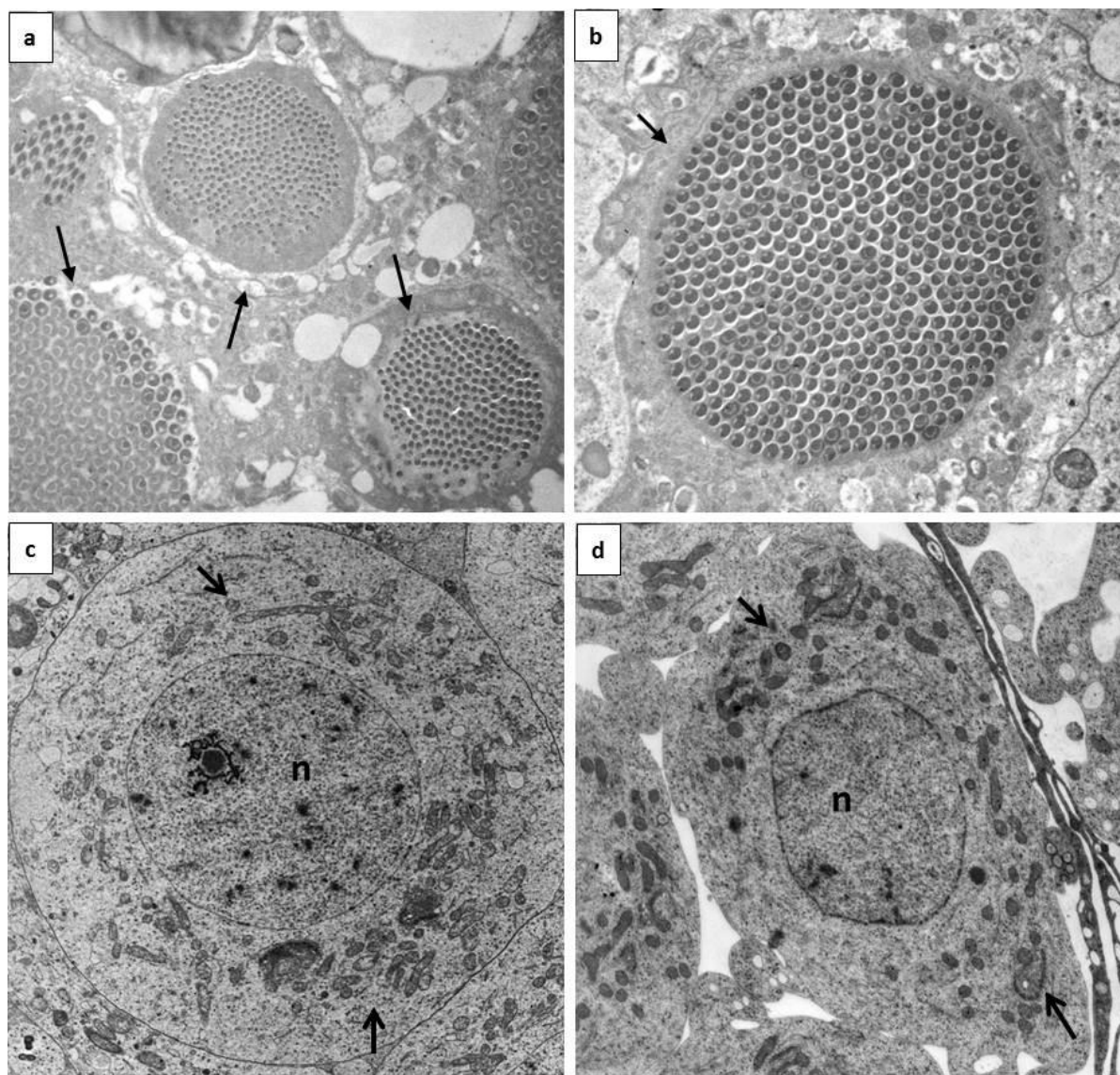
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3. Eletromicrografias dos testículos de *E. mediatunda* em cortes sequencias das espermátides em diferenciação. a) Região inicial da cabeça evidenciando os inúmeros microtúbulos, o acrossomo e o núcleo pouco condensado; b,c) Região mediana da cabeça evidenciando inúmeros microtúbulos, uma pequena parte do acrossomo e o núcleo bem condensado; d) Região de transição núcleo-flagelo onde é possível se observar o início do adjunto do centríolo e o final do núcleo; e) Região flagelar onde se observa os derivados mitocondriais e o axonema. Núcleo (n) acrossomo (a), microtúbulos (asterisco), derivados mitocondriais (dm). Aumentos: a) 67000x; b-e) 50000x.



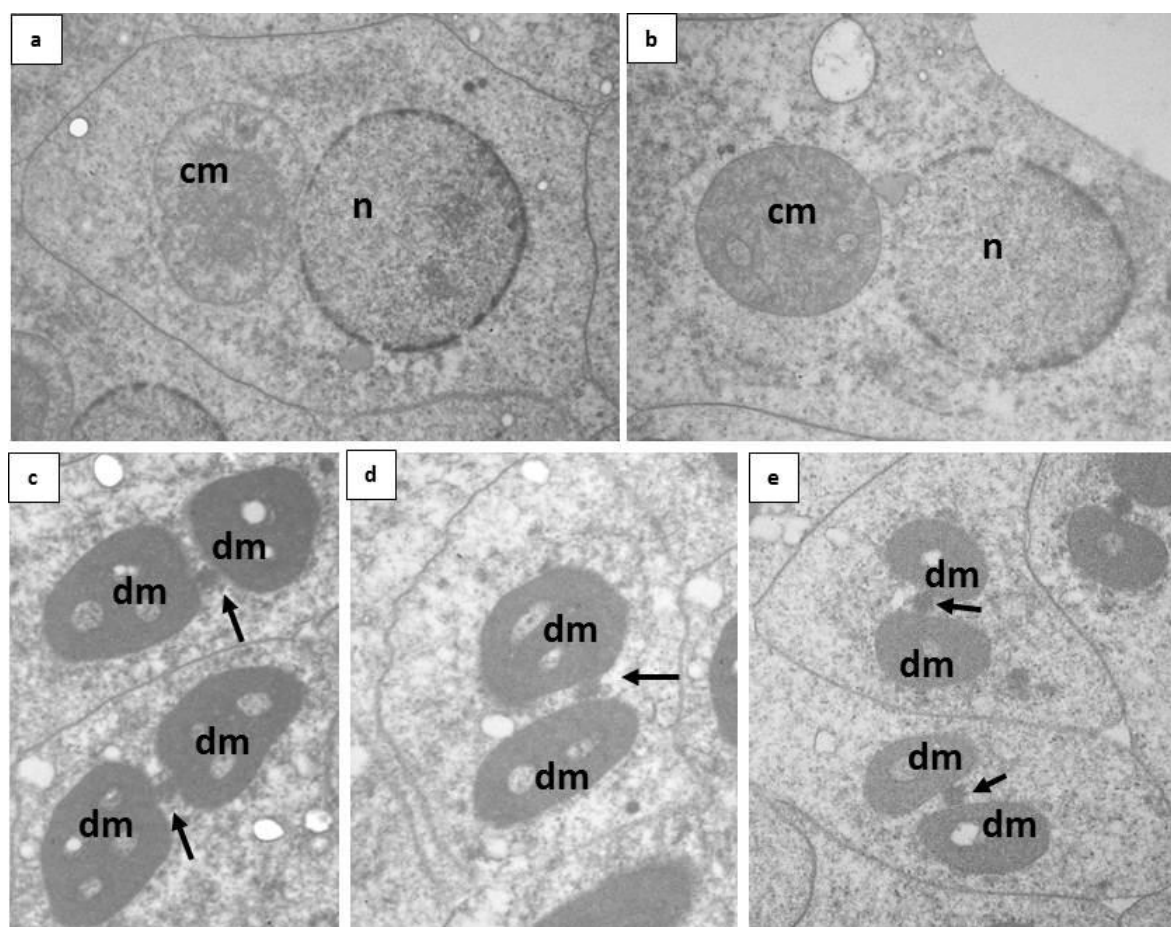
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4. Eletromicrografias do testículo de *Loxa deducta*. a,b) Cistos espermáticos arredondados com espermátides em final de diferenciação; c) Espermátides de lobos testiculares sem alterações se mostrando grandes e arredondadas; d) Espermátides do lobo *harlequin* se mostrando menores e de formato irregular. Cistos espermáticos (setas), núcleo (n) e aglomerados de mitocôndrias (setas abertas). Aumentos: a) 5000x; b-d) 6700x.



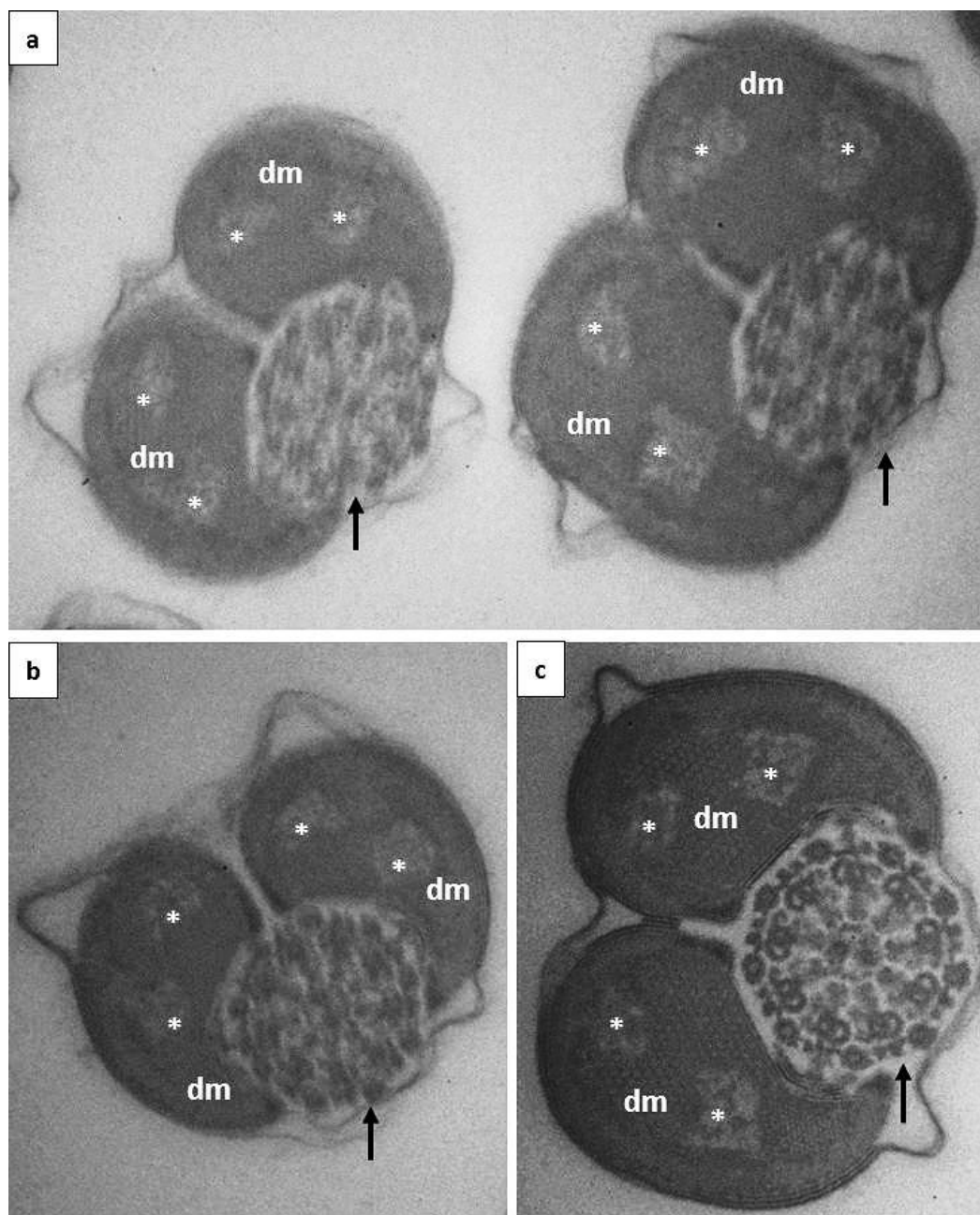
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta*. a,b) Formação do complexo mitocondrial no polo basal do núcleo; c-e) Derivados mitocondriais com a presença de vesículas citoplasmáticas em seu interior e a formação do axonema. Núcleo (n), complexo mitocondrial (cm), derivados mitocondriais (dm) e axonema (setas). Aumentos: 10000X.



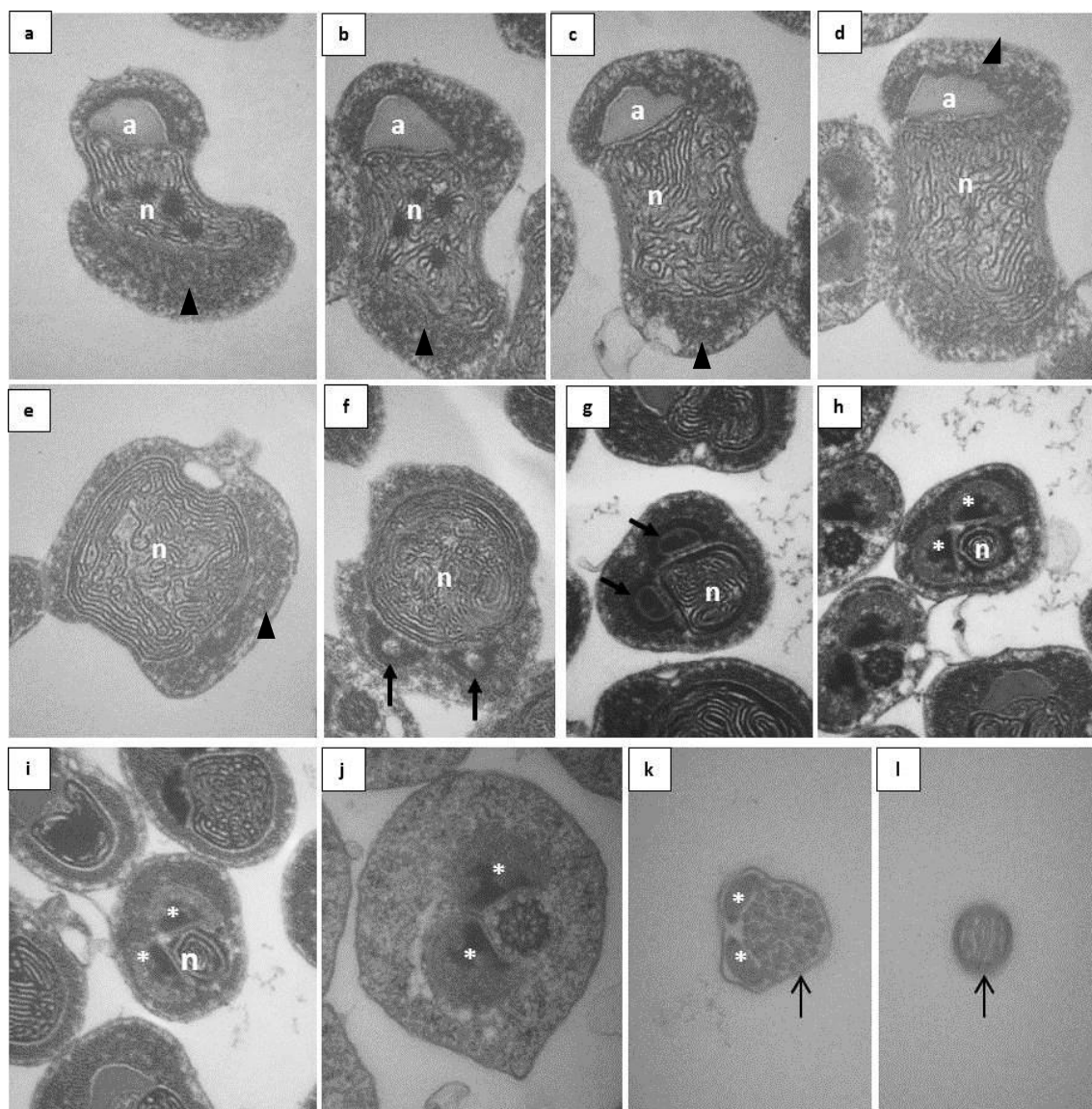
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta* evidenciando dois tipos morfológicos de espermatozoides. a) Os dois tipos de morfologias encontradas nos espermatozoides encontrados lado a lado; b-c) Detalhes dos dois tipos de espermatozoides; Derivados mitocondriais (dm), estruturas paracristalinas (asterisco) axonema 9+9+2 (setas). Aumentos: a) 67000x; b) 80000x; c) 100000x.



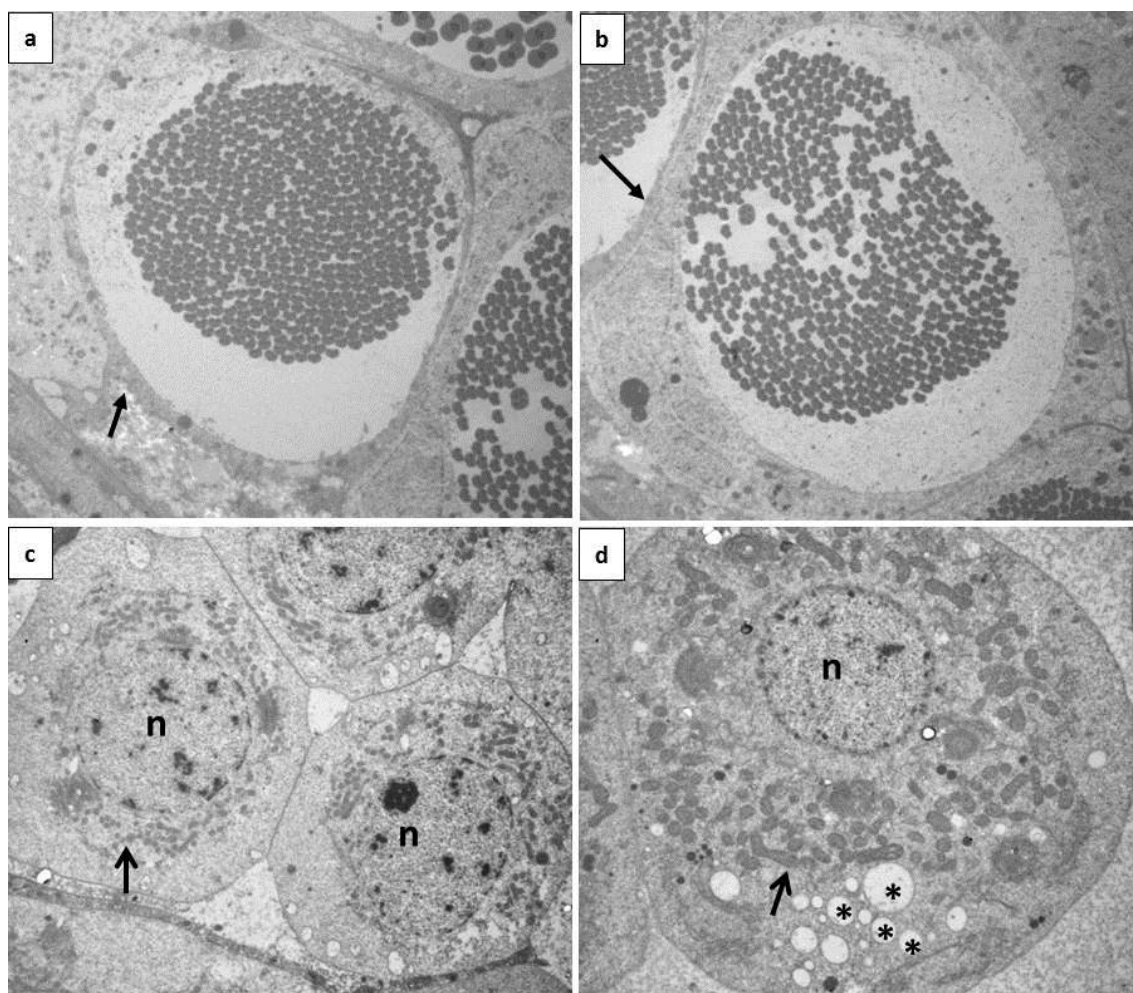
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 7. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta* mostrando cortes sequenciais de espermátides no mesmo estágio de diferenciação. a-e) Cortes da região inicial da cabeça até a região mediana onde é possível se observar o acrosso (a) ao lado do núcleo em condensação e microtúbulos ao redor das estruturas; f-g) Região final da cabeça onde é possível se observar o aparecimento do adjunto do centríolo; h-i) Zona de transição cabeça-cauda onde é possível se observar os derivados mitocondriais e a região terminal do núcleo; j-l) Região da cauda do seu início até o fim onde resta somente o axonema. Núcleo (n), acrosso (a), microtúbulos (ponta de seta), adjunto do centríolo (seta), derivados mitocondriais (asterisco) e axonema (seta aberta). Aumentos: a-i) 40000x; j) 50000x; k-l) 67000x.



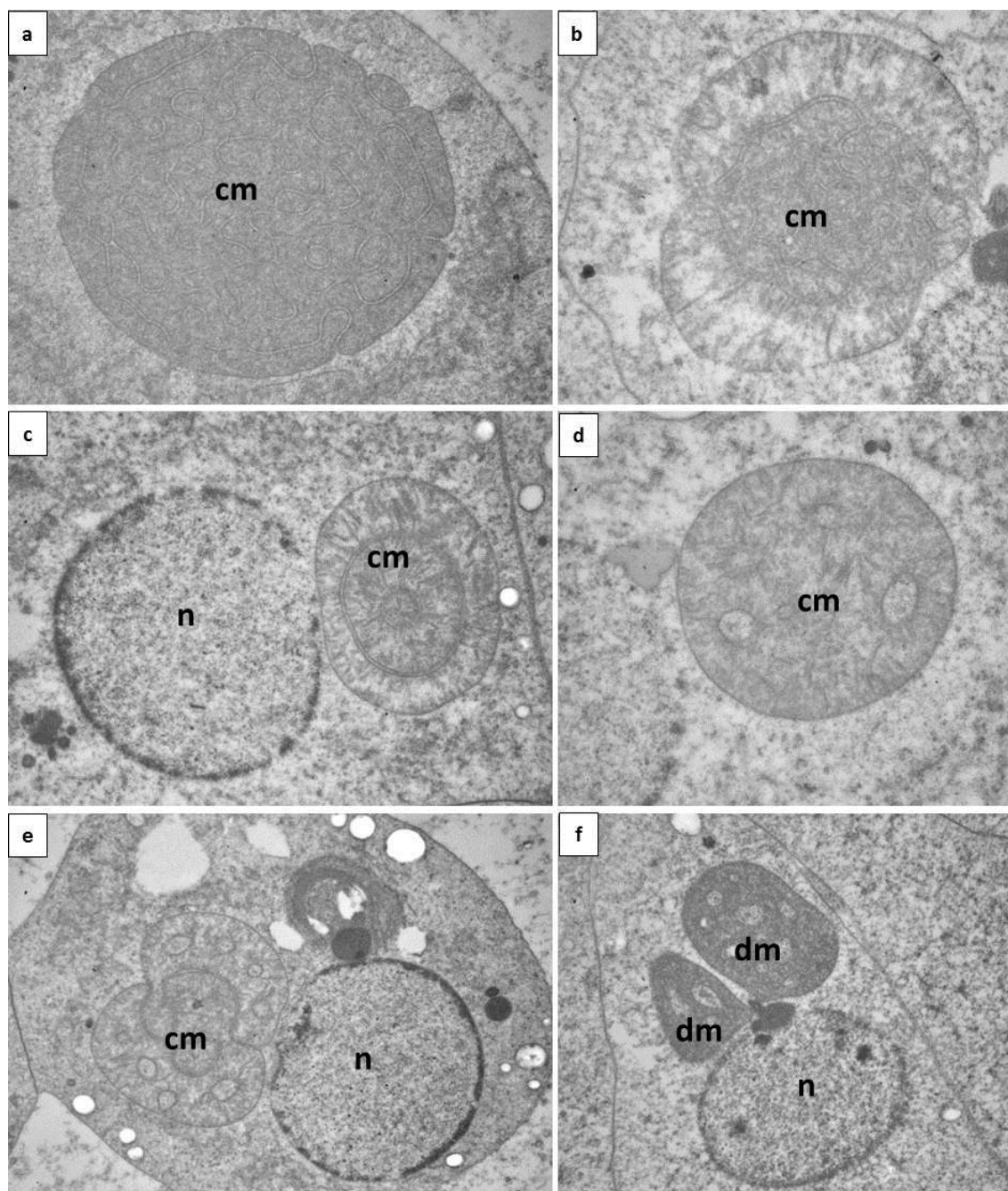
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8. Eletromicrografias dos testículos de *Proxys albopunctulatus*. a,b) Cistos espermáticos arredondados com suas espermatídes em uma mesma orientação e fase de diferenciação. c) Espermatídes dos lobos sem alterações evidenciando poucas mitocôndrias ao redor do núcleo; d) Espermatíde oriunda dos lobos com polimegalia onde se observa seu grande tamanho e inúmeras mitocôndrias ao redor do núcleo, além de inúmeras vesículas no citoplasma. Cistos (setas), núcleo (n) mitocôndrias (setas abertas) e vesículas (asteriscos). Aumentos: a,b) 4000X; c,d) 6700X.



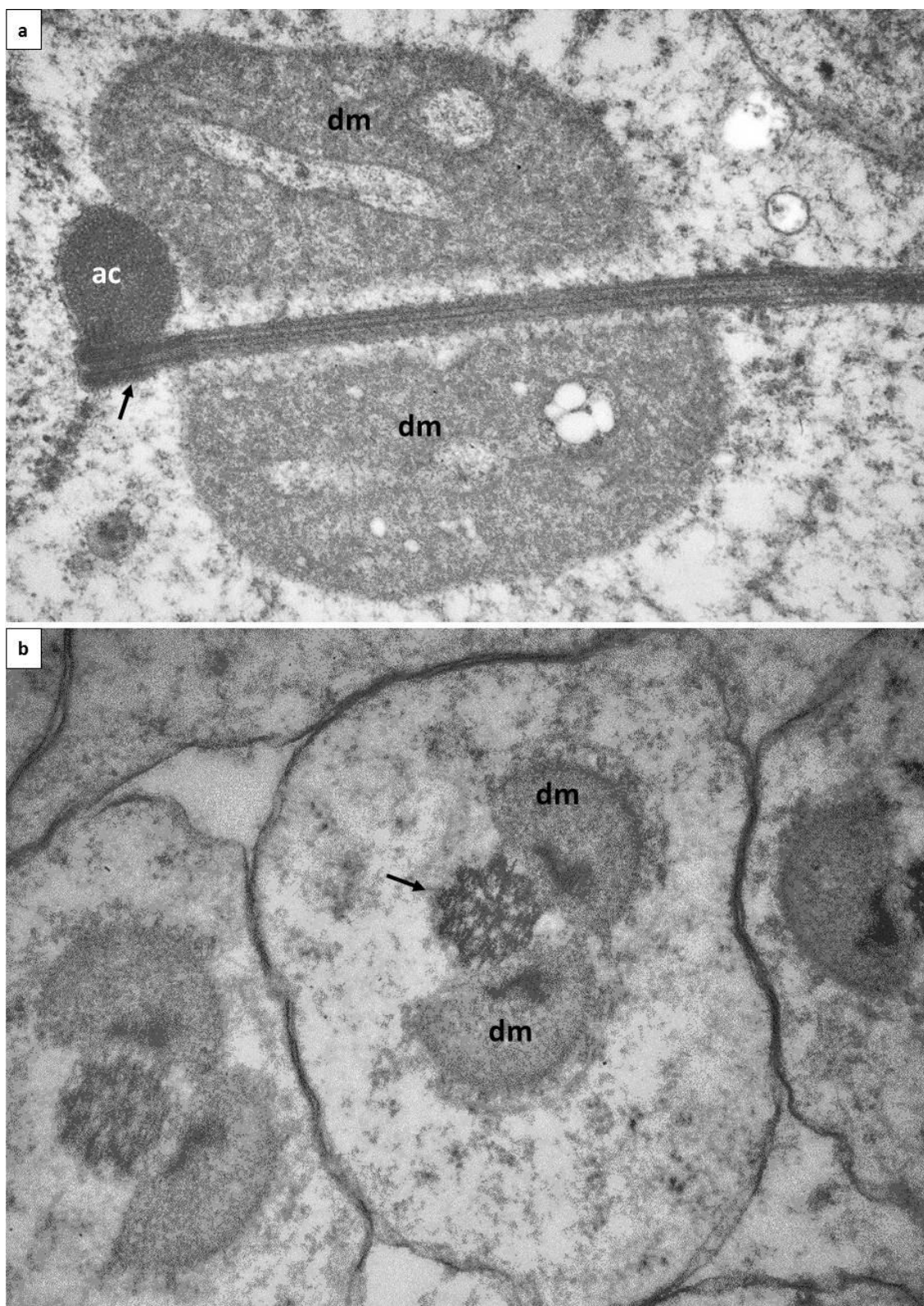
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9. Eletromicrografias do testículo de *P. albopunctulatus*. a-d) Formação do complexo mitocondrial e a perda de suas membranas interiores; e-f) Divisão do complexo mitocondrial em derivados mitocondriais e o aparecimento do axonema entre eles. Núcleo (n), complexo mitocondrial (cm) e derivados mitocondriais (dm). Aumentos: a,c) 14000X; b,d) 20000X; e,f) 10000X.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10. Eletromicrografias do testículo de *P. albopunctulatus*. a) Axonema ligado ao adjunto do centríolo e derivados em início de elongação em corte longitudinal; b) Corte transversal da cauda evidenciando o axonema entre os dois derivados mitocondriais simétricos. Derivados mitocondriais (dm), adjunto do centríolo (ac) e axonema (setas). Aumentos: a) 20000X; b) 50000X.



Fonte: Elaborado pelo autor

5 ARTIGO 4 - Alterações nucleares durante a espermiogênese de *Loxa deducta* (Heteroptera: Pentatomidae) em lobos sem alterações e lobo harlequin

Silva Junior, F.C.; Itoyama, M.M.

1 – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto - SP

Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth
CEP: 15054-000
São José do Rio Preto, SP
ju_fcsj@hotmail.com

Resumo: Os polimorfismos em espermatozoides de insetos é um fenômeno comum, nos Heteroptera da família Pentatomidae que pode ser originado por polimegalia ou no lobo *harlequin*. Com o objetivo de caracterizar ultraestruturalmente as modificações nucleares durante a espermiogênese de indivíduos com a presença de lobos sem alterações e lobo *harlequin*, espécimes de *Loxa deducta* foram coletados e seus testículos preparados para análises em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Foi possível verificar durante as análises que em *L. deducta* a compactação da cromatina se deu de maneira muito semelhante nas espermátides oriundas de lobos sem alterações e do *harlequin*, além de que nas espermátides do lobo *harlequin* foram encontradas todas as estruturas que compõem a cabeça dos espermatozoides. Podemos concluir então que a condensação da cromatina de *L. deducta* é semelhante às várias espécies de insetos nas mais diferentes ordens, e que, surpreendentemente, mesmo o lobo *harlequin* que sofre uma meiose atípica tem um comportamento similar de condensação, sendo necessários mais estudos para elucidar o comportamento deste lobo durante a espermiogênese.

Palavras-chave: Cromatina; Polimorfismo; Lobo harlequin.

1 Introdução

A classe Insecta exibe grande variedade de polimorfismos quando tratamos de espermatozoides, podendo produzir espermatozoides nucleados e anucleados. Como exemplo temos a ordem Lepidoptera e a subordem Heteroptera que produzem espermatozoides que variam na morfologia e tamanho podendo ou não variar no

complemento cromossômico (SILBERGLIED et al., 1984; SWALLOW; WILKINSON, 2002; ARAÚJO et al., 2010). A família Pentatomidae pode ser considerada peculiar dentro da subordem Heteroptera, pois há presença de polimorfismos tanto na forma quanto na ploidia dos espermatozoides.

A causa mais comum de polimorfismos de espermatozoides em Pentatomidae é a polimegalia, porém este fenômeno só altera o tamanho e morfologia dos espermatozoides, sendo a sua ploidia mantida (BOWEN, 1922; SCHRADER; LEUCHTENBERGER 1950; SWALLOW; WILKINSON, 2002). O fenômeno mais intrigante para a produção de espermatozoides polimórficos é o chamado lobo *harlequin*, onde existe grande variação na ploidia dos espermatozoides, no entanto esse é um fenômeno raro e restrito a apenas as subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae com somente 22 espécies descritas possuindo o fenômeno (SWALLOW; WILKINSON, 2002; REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2011).

Dentre estruturas que podem ser analisadas nesses espermatozoides polimórficos podemos destacar o núcleo já que este pode ou não estar presente (SILBERGLIED et al., 1984). Durante a espermiogênese podemos destacar que o núcleo sofre diversas transformações morfológicas se tornando mais fusiforme, além de mudanças em sua cromatina que se torna gradualmente mais densa e compacta, sendo ambas as transformações simultâneas (PHILLIPS, 1970; TOKUYASU, 1974; BÁO; HAMÚ, 1993).

A espécie *Loxa deducta* pertencente à família Pentatomidae apresenta espermatozoides polimórficos já que possui sete lobos testiculares, sendo seis sem alterações e um (o quinto) sendo o lobo *harlequin* (SOUZA et al., 2011). Portanto este estudo tem como objetivo caracterizar ultraestruturalmente as transformações nucleares de espermatozoides oriundos de lobos sem alterações e lobo *harlequin* da espécie *L. deducta*, para verificar se há alterações nos processos destas transformações devido à variada ploidia de espermátides oriundas do lobo *harlequin* comparado aos dos lobos sem alterações.

2 Material e Métodos

2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Foram coletados 10 espécimes de *Loxa deducta* em São José do Rio Preto (20° 47' 13" S, 49° 21' 38" W) tiveram os testículos extraídos e fixados em Karnovsky por 24 horas para a realização do processamento para microscopia eletrônica de transmissão, os testículos foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig por cerca de 5

minutos cada, 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 solução com concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%) por 15 minutos cada etapa. Após esse processo o material foi incluído em resina Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Os blocos obtidos foram cortados e contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo 0,2 % em solução de hidróxido de sódio 1M. Após esse pós-processamento os cortes foram analisados com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM- 100 CXII.

3 Resultados

3.1 Lobos sem alterações

Para a análise do processo de compactação da cromatina, da espécie *Loxa deducta*, durante a espermiogênese, os seus sete lobos testiculares foram analisados separadamente, sendo os resultados para os lobos sem alterações descritos a seguir.

Nestes lobos é possível se observar com muitos detalhes a cromatina (Figura 1), onde se nota que esta é granular e com um grande volume no interior do núcleo (Figura 1a) e, posteriormente, passa, gradativamente, a forma filamentosa (Figura 1b-f). Esses filamentos são inicialmente pequenos e com pouca espessura (Figura 1b,c), porém, com o passar da espermiogênese os filamentos vão se tornando longos e muito espessos (Figura 1d-f).

Pôde ser visualizado durante este processo que o tamanho nuclear é diminuído conforme a cromatina se torna filamentosa e compactada (Figura 1). Foi visualizada, também, a formação de estruturas eletrondensas no envoltório nuclear e o posterior estrangulamento do núcleo, além da grande presença de microtúbulos, todos orientados para a mesma direção (Figura 1d-f). É possível visualizar o acrossomo sempre no polo anterior do núcleo durante o processo de compactação (Figura 1).

Nas fases seguintes de condensação foram observadas grandes regiões eletrólúcidas no interior do núcleo junto da cromatina filamentosa e aglomerada (Figura 2a-d). Conforme o núcleo diminui, a condensação da cromatina aumenta, podendo se observar grande quantidade de cromatina aglomerada em blocos (Figura 2e), que, posteriormente, se torna uma massa cromatínica que vai preenchendo cada vez mais o núcleo (Figura 2e-g) até este se tornar completamente condensado (Figura 2h).

Nesta fase também é possível se observar os microtúbulos orientados em uma mesma direção (Figura 2), porém nota-se que a quantidade de microtúbulos aparenta ser bem maior nas fases finais do processo (Figura 2f-h), além de poder ser observada a presença do acrossomo sempre no polo anterior do núcleo (Figura 2).

3.2 Lobo *harlequin*

Nas análises ultraestruturais dos testículos de *L. deducta* foi observado que dos sete lobos da espécie somente o quinto possuía alterações, sendo esse o *harlequin*, e os resultados para este lobo são descritos a seguir.

Neste lobo foi possível observar o processo de condensação da cromatina em que após a divisão meiótica irregular as espermatídes começam a apresentar uma grande quantidade de cromatina finamente granular e uma profusão de microtúbulos orientados para uma mesma direção ao redor do núcleo (Figura 3a). Esta cromatina vai se tornando mais filamentosa com o passar da diferenciação das espermatídes (Figura 3b,c). Esses filamentos vão se compactando mais e se tornando mais espessos a cada fase de diferenciação (Figura 3d-i).

Outro fato interessante é que esta condensação ocorre simultaneamente por toda a extensão nuclear, já que é possível se observar a cromatina no mesmo estágio de condensação em cortes na região inicial (Figura 3a,b), mediana (Figura 3c) e terminal (Figura 3d,e) do núcleo.

Concomitantemente à compactação da cromatina, podemos visualizar que há também, o estrangulamento do núcleo. Isto ocorre devido a uma estrutura eletrondensa presente próximo ao envoltório nuclear, onde essa parece exercer uma pressão lateral no núcleo (Figura 3f-l), enquanto os microtúbulos exercem força nos polos anterior e posterior do núcleo (Figura 3f-l). Observa-se, também, a diminuição do núcleo e o aumento da compactação da cromatina (Figura 3f-i) a partir desta estrutura (Figura 3j-l).

Na próxima etapa de condensação observou-se a cromatina constituída de filamentos muito definidos e extremamente espessos (Figura 4) começando a se unir para formar o núcleo completamente condensado e há, ainda, uma grande quantidade de microtúbulos ao redor do núcleo (Figura 4). Durante este processo foi possível observar a diminuição gradativa da cromatina filamentosa (Figura 4a-f) e a formação de grandes massas de cromatina condensada a partir da região mediana do núcleo (Figura 4g-m), de maneira que ao final só se observa a cromatina completamente condensada (Figura 4n-p).

Existe outro processo de estrangulamento nuclear nesta fase que parece auxiliar na diminuição do tamanho do núcleo e o processo de condensação da cromatina em conjunto com os microtúbulos ao redor do núcleo (Figura 4i-p).

O acrossomo também é visualizado sempre no polo anterior do núcleo tendo uma forma achatada nos estágios iniciais de diferenciação (Figura 3) e, já nos estágios finais uma forma arredondada (Figura 4).

4 Discussão

Através das análises ultraestruturais, realizadas em *L. deducta*, foi possível observar que a espécie possui sete lobos testiculares, sendo seis sem alterações e um, o quinto, o harlequin, descrição essa que corrobora Souza et al. (2011).

A compactação da cromatina nos dois tipos de lobos testiculares ocorrem de maneira similar, onde primeiramente a cromatina se encontra de maneira fibrilar e dispersa, em fases posteriores já se encontra de maneira fibrilar densa, passando por um estágio filamentosos pouco espesso e, posteriormente por um estágio filamentosos muito espesso até, por fim, apresentar aglomerados ou blocos cromatínicos que irão formar a massa cromatínica completamente condensada. Este processo se dá pela substituição gradual das histonas nucleares por um tipo de proteína muito rica em arginina ou lisina denominada protamina (KING, 1976; KASINSKY et al., 2011).

O processo de compactação da cromatina ocorrido nos dois tipos de lobos de *L. deducta* se dá de maneira muito semelhante ao encontrado em vários insetos como *Musca domestica* (GASNER III et al., 1972) e *Drosophila melanogaster* (TOKUYASU, 1974) para a ordem Diptera, *Locusta migratoria* (SZOLLOSI, 1974) para ordem Orthoptera, *Coelomera lanio* e *Diabrotica speciosa* (BÁO; HAMÚ, 1993) para a ordem Coleoptera, em *Zootermopsis nevadensis* (BACCETTI et al., 1981) para a ordem Isoptera, *Ceresa* sp. e *Tylozygres* sp. (FAWCETT et al., 1971) da ordem Hemiptera, além de *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001) pertencente a família Pentatomidae da subordem Heteroptera.

Podemos observar nas espermatídes dos dois tipos de lobos de *L. deducta* o aparecimento de inúmeros microtúbulos que circundam o núcleo e o acrossomo, este conjunto de microtúbulos é denominado manchete, cuja função é a de auxiliar no alongamento celular na espermiogênese (FAWCETT et al., 1971; TOKUYASU, 1974) e pode ser encontrado nos mais diversos animais desde os mais variados insetos

(SZOLLOSI, 1974; TOKUYASU, 1974; BACCETTI et al., 1981; BÁO; HAMÚ, 1993; FERNANDES et al., 2001) até porcos e carneiros (FAWCETT et al., 1971).

Outras estruturas que aparecem durante o processo de compactação são estruturas eletrondensas promovendo o estrangulamento do núcleo. Estas estruturas foram denominadas tiras nucleares por Tokuyasu (1974) em Diptera, e encontradas, também, por Fawcett et al. (1971) em Hemiptera e Báó e Hamú (1993) em Coleoptera. No início do processo de condensação, estas estruturas estão associadas à cromatina densamente compactada, podendo esta estrutura estar ligada a distribuição da cromatina no núcleo que está sendo condensado (TOKUYASU, 1974).

Portanto podemos concluir que a condensação da cromatina de *L. deducta* se dá de maneira semelhante a várias espécies de insetos nas mais diferentes ordens, e que, surpreendentemente, mesmo o lobo *harlequin* que sofre uma meiose atípica tem um comportamento similar de condensação, sendo necessários mais estudos para elucidar o comportamento deste lobo durante a espermiogênese.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2016/10135-9.

5 Referências

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.; DALLAI, R.; CALLAINI, G. The spermatozoon of Arthropoda: *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 87-99, 1981.

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

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.

FAWCETT, D. W.; ANDERSON, W. A.; PHILLIPS, D. M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Developmental biology**, v. 26, n. 2, p. 220-251, 1971.

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

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.

KASINSKY, H. E.; EIRIN-LOPEZ, J. M.; AUSIÓ, J. Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 8, p. 755-771, 2011.

King, R. C. Handbook of genetics: Volume 5 Molecular Genetics. 1st ed. **New York: Plenum Press**, p.161.1976.

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

SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 3, p. 421-452, 1950.

SILBERGLIED, R. E., SHEPHERD, J. G., & DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera?. **American Naturalist**, p. 255-265, 1984.

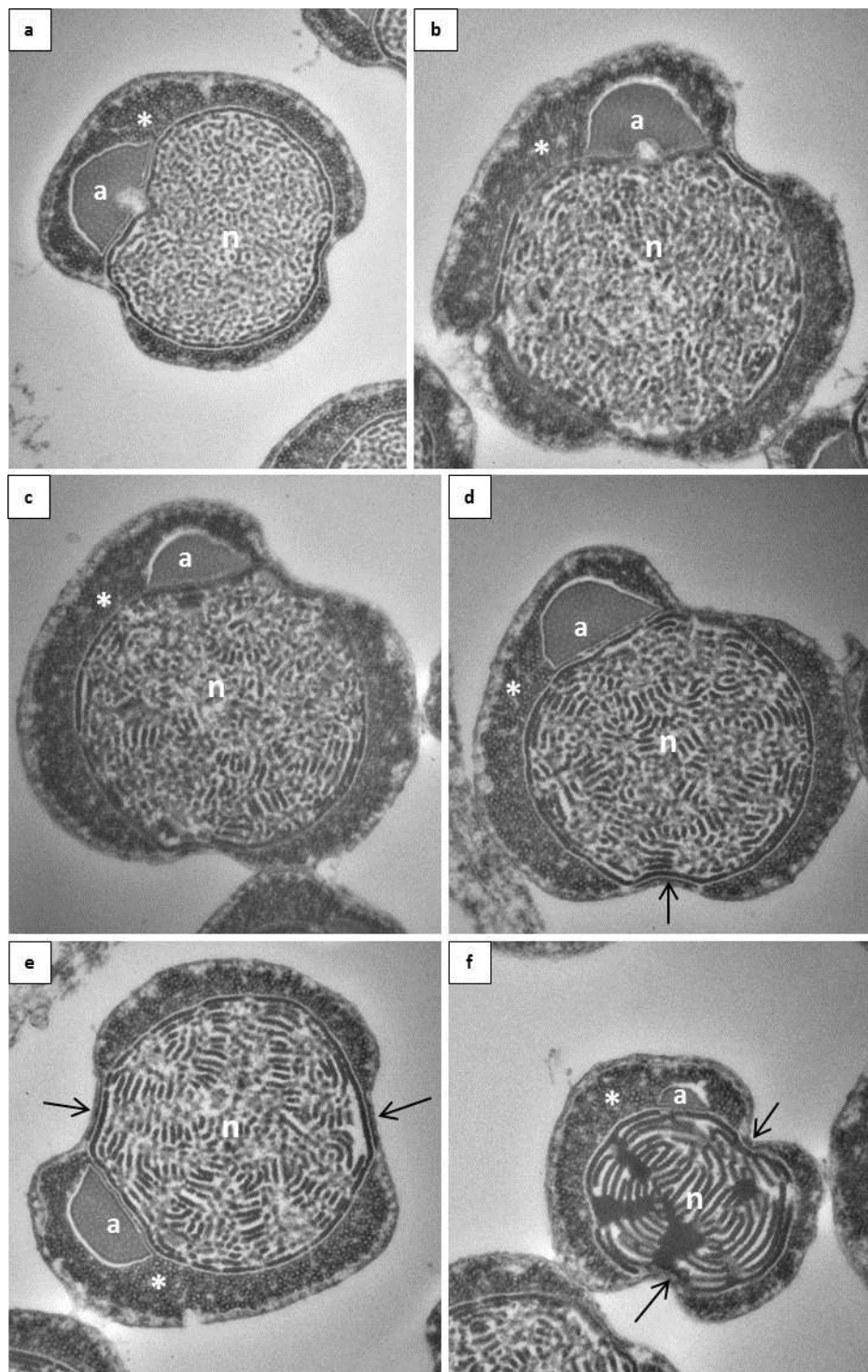
SOUZA, H. V., MURAKAMI, A. S., DE MOURA, J., DE ALMEIDA, E. C., MARQUES, I. F. G., ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, n. 3, p. 333, 2011.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G.S..The long and short of sperm polymorphisms in insects.**Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 02, p. 153-182, 2002.

SZÖLLÖSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect Orthoptera). **Journal of ultrastructure research**, v. 50, n. 3, p. 322-346, 1975.

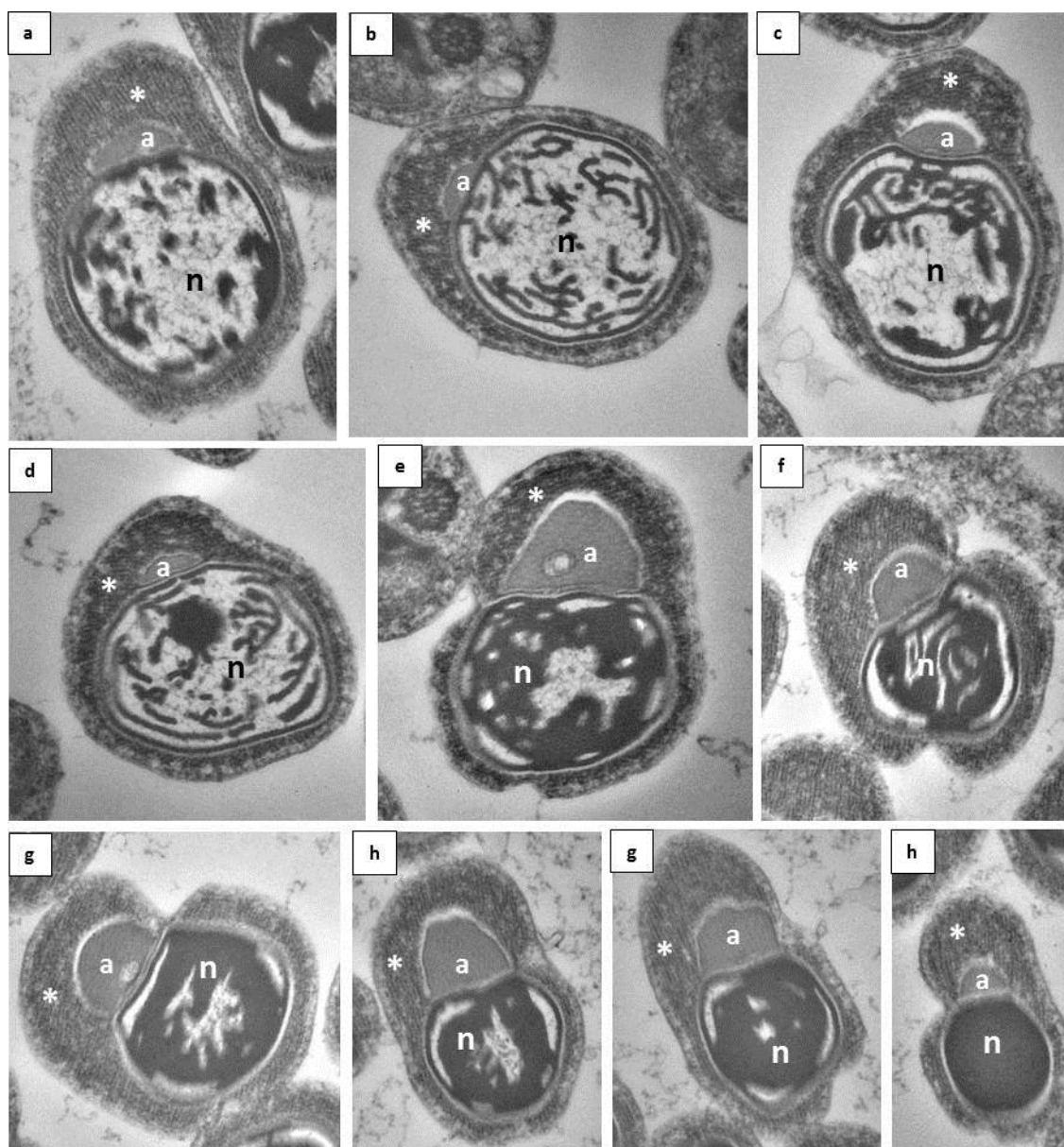
TOKUYASU, K. T. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*: IV. Nuclear transformation. **Journal of ultrastructure research**, v. 48, n. 2, p. 284-303, 1974.

Figura 1. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta* evidenciando as transformações do núcleo e a condensação da cromatina durante a espermiogênese de lobos sem alterações. a-c) Formação de microtúbulos ao redor do núcleo e a transformação da cromatina de granular para filamentosa; d-f) Aparecimento de estruturas eletrondensas na membrana nuclear e o estrangulamento do núcleo. Núcleo (n), acrosso (a), microtúbulos (asterisco) e estrutura elétrondensa (setas abertas). Aumentos: 40000x.



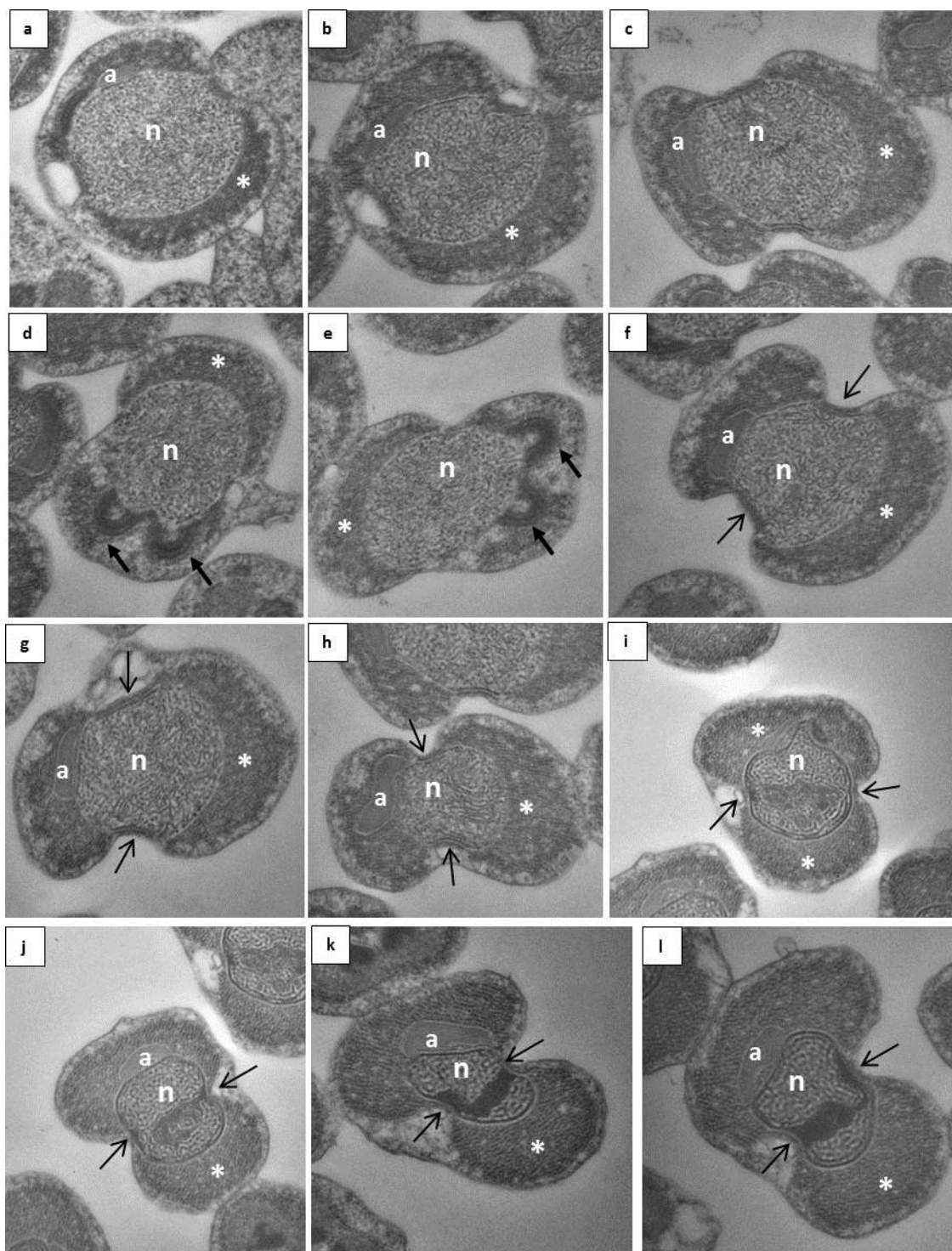
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta* evidenciando as transformações do núcleo e a condensação da cromatina durante a espermiogênese de lobos sem alterações. a-m) Cromatina filamentosa se compacta enquanto o núcleo reduz de tamanho com auxílio dos microtúbulos. Núcleo (n), acrossomo (a), microtúbulos (asterisco). Aumentos: 40000x.



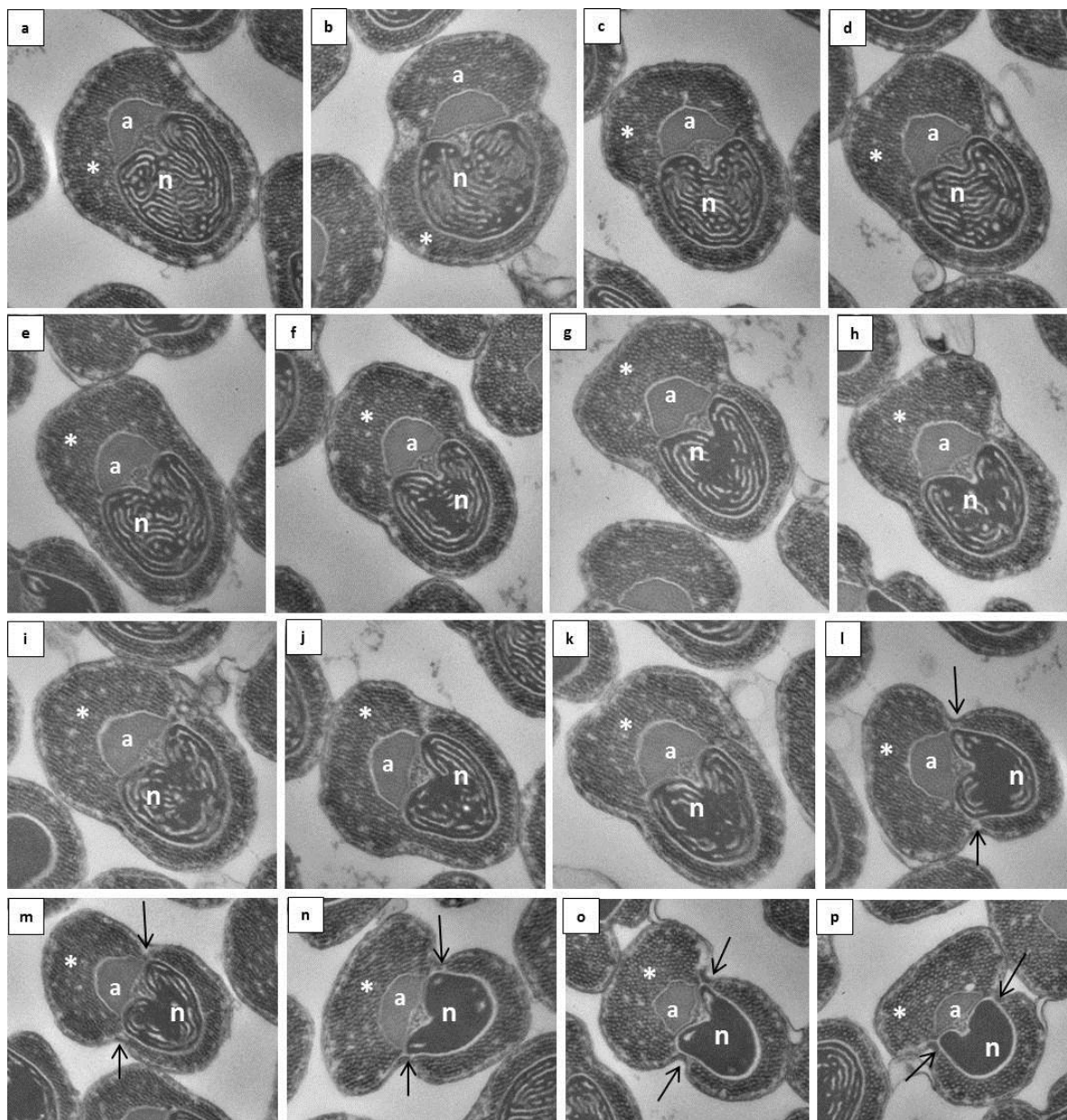
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3. Eletromicrografias dos testículos *Loxa deducta* evidenciando as transformações do núcleo e a condensação da cromatina durante a espermiogênese de lobo harlequin. a-e) Começo da condensação da cromatina e achatamento do núcleo se dá com a formação de microtúbulos ao redor do núcleo; f-h) Formação de estruturas eletrondensas na membrana nuclear provocando o estrangulamento do núcleo; i-l) Maior condensação da cromatina a partir da estrutura eletrondensa da membrana nuclear. Núcleo (n), acrosso (a), microtúbulos (asterisco), adjunto do centríolo (setas) e estrutura eletrondensa (setas abertas). Aumentos: 40000x.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4. Eletromicrografias dos testículos *L. deducta* evidenciando as transformações do núcleo e a condensação da cromatina durante a espermiogênese de lobo harlequin. a-k) Após a primeira etapa de condensação a cromatina se torna mais densa e o núcleo se torna menor com o auxílio dos microtúbulos; l-p) Surgimento de novo estrangulamento nuclear e a total compactação da cromatina. Núcleo (n), acrosso (a), microtúbulos (asterisco) e estrutura elétrondensa (setas abertas). Aumentos: 40000x.



Fonte: Elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO GERAL

As espécies *Edessa meditabunda*, *Loxa deducta*, *Proxys albopunctulatus* e *Antiteuchus tripterus* tiveram seus testículos analisados ultraestruturalmente, no presente trabalho, onde foi observado que *E. meditabunda* apresenta quatro lobos testiculares sem nenhuma alteração corroborando o encontrado por Rebagliati et al. (2003) e Souza et al. (2011), *L. deducta* apresentou sete lobos testiculares sendo o quinto o *harlequin* e *P. albopunctulatus* com seis lobos apresentando polimegalia no 4 e 6 corroborando, assim, com Souza et al. (2011), já em *A. tripterus* foi possível comprovar estruturalmente as características analisadas citogeneticamente, como o fato da espécie possuir seis lobos testiculares, sendo três sem alterações (lobos 1-3), dois com polimegalia (lobos 4 e 6, sendo o 6 interno ao 5) e um lobo *harlequin* (lobo 5) (SOUZA et al., 2007).

Os testículos destas espécies apresentam-se revestidos por uma bainha peritoneal, sendo formada de células epiteliais e uma membrana não celular de coloração avermelhada, recobrindo essas células, denominada *tunica propria* (RODRIGUES et al., 2008; ELELIMY et al., 2017). Os lobos são divididos entre si por uma camada de tecido conjuntivo como verificado também para a espécie *Euchistus heros* (Pentatomidae) por Souza et al (2010) e Aguiar et al (2017), camada esta também referida como septo em *Martarega bentoi* (Notonectidae) por Novais et al (2017).

As espécies estudadas apresentaram espermatogênese cística, característica, esta, encontrada, também, por Phillips (1970), Dumser (1980) e Dallai (2014) em várias ordens de insetos, Nelsen (1931) em *Melanoplus differentialis* (Orthoptera) e Quagio-Grassiotto e Lello (1996) em *Dermatobia hominis* (Diptera), sendo essa característica padrão para a classe Insecta (DALLAI, 2014).

As espécies *A. tripterus* e *P. albopunctulatus* apresentaram os lobos 4 e 6 com polimegalia, sendo este fenômeno encontrado em grande parte da família Pentatomidae estando ausente apenas nas subfamílias Asopinae e Acanthosomatinae (SOUZA et al., 2010). Já as espécies *A. tripterus* e *L. deducta* apresentaram o lobo 5 como *harlequin*, sendo este fenômeno com distribuição mais restrita, sendo que nesta família, ocorre somente nas subfamílias Discocephalinae, Edessinae e Pentatominae, dentre as oito subfamílias de Pentatomidae, a apresentarem este tipo de lobo, totalizando 22 espécies descritas, até o momento (REBAGLIATI et al., 2005; SOUZA et al., 2007, 2010).

Ao analisar ultraestruturalmente a espermiogênese das quatro espécies estudadas foi possível observar que a formação da cauda do espermatozoide ocorre de maneira padrão para os insetos como descrito por Phillips (1970) e Dallai (2014) para

diversas ordens de insetos e Pratt (1970) e Mercati et al. (2009) especificamente para a subordem Heteroptera. A conformação do axonema de 9+9+2 é considerada uma sinapomorfia da classe Insecta, enquanto as duas pontes que ligam os derivados ao axonema são consideradas sinapomorfias para a subordem Heteroptera (DALLAI, 2014).

Devido ao fato de não possuir alterações nos lobos *E. meditabunda* apresentou apenas um tipo de espermatozoide, resultados semelhantes aos encontrados para outras espécies de Pentatomidae como *Thynacanta marginata* e *Supputius cincticeps* por Araújo et al. (2011). Já *L. deducta* que possui o lobo *harlequin* apresentou dois tipos de espermatozoides, sendo este resultado semelhante a de outros Pentatomidae estudados (SCHRADER; LEUCHTENBERGER, 1950; SWALLOW; WILKINSON, 2002; SOUZA et al., 2007; ARAÚJO et al., 2011). Conseguimos, também, observar na espécie *A. tripterus*, devido ao fato de possuir os lobos normais, com polimegalia e *harlequin*, três tipos de espermatozoides. Espermatozoides polimórficos foram encontrados por Araujo et al (2011) nas espécies *Podisus nigrispinus*, *P. distinctus* e *Brontocoris tabidus* (Pentatomidae), Aguiar et al (2017) descreveu na espécie *E. heros* (Pentatomidae), Araújo et al (2012) na *Largus rufipennis* (Largidae) e Baffa et al. (2017) em cinco espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae).

Através das análises ultraestruturais, realizadas em *L. deducta* e *A. tripterus*, a compactação da cromatina nos tipos de lobos testiculares e que essa compactação ocorre de maneira similar nesses lobos, onde primeiramente a cromatina se encontra de maneira fibrilar e dispersa, em fases posteriores já se encontra de maneira fibrilar densa, passando por um estágio filamentoso pouco espesso e, posteriormente por um estágio filamentoso muito espesso até, por fim, apresentar aglomerados ou blocos cromatínicos que irão formar a massa cromatínica completamente condensada. Este processo se dá pela substituição gradual das histonas nucleares por um tipo de proteína muito rica em arginina ou lisina denominada protamina (KING, 1976; KASINSKY et al., 2011).

O processo de compactação da cromatina ocorrido nos dois tipos de lobos de *L. deducta* e nos três de *A. tripterus* se dá de maneira muito semelhante ao encontrado em vários insetos como *Musca domestica* (GASNER III et al., 1972) e *Drosophila melanogaster* (TOKUYASU, 1974) para a ordem Diptera, *Locusta migratoria* (SZOLLOSI, 1974) para ordem Orthoptera, *Coelomera lanio* e *Diabrotica speciosa* (BÁO; HAMÚ, 1993) para a ordem Coleoptera, em *Zootermopsis nevadensis* (BACCETTI et al., 1981) para a ordem Isoptera, *Ceresa* sp. e *Tylozygres* sp. (FAWCETT et al., 1971) da ordem Hemiptera, além de *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001) pertencente a família Pentatomidae da subordem Heteroptera.

Podemos observar nas espermátides de todos os tipos de lobos das espécies estudadas o aparecimento de inúmeros microtúbulos que circundam o núcleo e o acrossomo, este conjunto de microtúbulos é denominado manchete, cuja função é a de auxiliar no alongamento celular na espermiogênese (FAWCETT et al., 1971; TOKUYASU, 1974) e pode ser encontrado nos mais diversos animais desde os mais variados insetos (SZOLLOSI, 1974; TOKUYASU, 1974; BACCETTI et al., 1981; BÃO; HAMÚ, 1993; FERNANDES et al., 2001) até porcos e carneiros (FAWCETT et al., 1971).

Outras estruturas que aparecem durante o processo de compactação são estruturas eletrondensas promovendo o estrangulamento do núcleo. Estas estruturas foram denominadas tiras nucleares por Tokuyasu (1974) em Diptera, e encontradas, também, por Fawcett et al. (1971) em Hemiptera e Bão e Hamú (1993) em Coleoptera. No início do processo de condensação, estas estruturas estão associadas à cromatina densamente compactada, podendo esta estrutura estar ligada a distribuição da cromatina no núcleo que está sendo condensado (TOKUYASU, 1974).

Uma característica interessante observada no lobo *harlequin* é que os núcleos em condensação apresentam formas aberrantes durante o processo, porém ao final deste processo o núcleo se apresenta semelhante aos dos outros tipos de lobos, sendo essas características ainda não descritas na literatura.

Podemos concluir, portanto, que nas espécies *A. tripterus* e *L. deducta*, os seus diferentes lobos testiculares produzem diferentes tipos de espermatozoides, sendo que estes apresentam todas as estruturas necessárias para serem funcionais e que estes diferem morfológicamente entre si. É sabido que somente um dos tipos de espermatozoides será fecundante, sendo necessários estudos mais profundos para determinar qual deles e qual a função exercida pelos outros tipos. Já a condensação da cromatina de *L. deducta* e *A. tripterus* se dá de maneira semelhante a várias espécies de insetos nas mais diferentes ordens, e que, surpreendentemente, mesmo o lobo *harlequin* que sofre uma meiose atípica tem um comportamento similar de condensação, sendo necessários mais estudos para elucidar o comportamento deste lobo durante a espermiogênese.

7 CONCLUSÕES

As análises ultraestruturais da espermatogênese de *Antiteuchus tripterus*, *Edessa mediatubunda*, *Loxa deducta* e *Proxys albopunctulatus* permitiram concluir que:

- As mitocôndrias se agrupam formando um complexo mitocondrial, que posteriormente se divide em dois derivados mitocondriais que se dispõem bilateralmente ao axonema;
- Os derivados mitocondriais são simétricos entre si;
- Os derivados apresentam pelo menos duas estruturas paracristalinas em seu interior;
- O axonema encontrado é de padrão 9+9+2;
- A cromatina se condensa passando de um estágio granular para um estágio filamentosos que se une em grandes blocos que posteriormente ocupam todo o núcleo;
- O núcleo diminui de tamanho com o auxílio da manchete de microtúbulos que se origina ao seu redor e das tiras nucleares;
- Espécies que possuem alterações testiculares originam mais de um tipo de espermatozoides;
- Existem diferenças morfológicas nos derivados mitocôndrias entre as espécies estudadas e até mesmo na mesma espécie caso essa tenha alterações testiculares;
- A formação da cauda se dá de maneira semelhante em todas as espécies estudadas independente da presença de alterações testiculares;
- A compactação da cromatina ocorre similarmente em todos os tipos de lobos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. C. M., HUSCH, P. E., GALLO, R. B., LEVY, S. M., VILAS-BÔAS, L. A., DA SILVA, C. R. M., SOSA-GÓMEZ, D. R., DA ROSA, R. (2017). Effects of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin on spermatogenesis of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Entomological Science**, v. 20, n. 1, p. 279-287, 2017.
- 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.; 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, B.; DALLAI, R.; CALLAINI, G. The spermatozoon of Arthropoda: *Zootermopsis nevadensis* and isopteran sperm phylogeny. **International Journal of Invertebrate Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 87-99, 1981.
- BAFFA, A. F. et al. Sperm dimorphism in the *Triatoma brasiliensis* species complex and its applications. **Medical and veterinary entomology**, v. 31, n. 2, p. 192-199, 2017.
- 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.; 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.

- CASSIS, G.; G. F. GROSS. Hemiptera: Heteroptera (Pentatomomorpha). In **W. W. K. Houston and G. V. Maynard**. Zoological Catalogue of Australia. CSIRO, Melbourne, Australia, v. 27.3B p. 1–737, 2002.
- CUQUETTO-LEITE, L., DOLDER, H., OLIVEIRA, P. S., SANTO, N. E., LINO-NETO, J., MANCINI, K. C. Structural and ultrastructural characterization of the spermatozoa in *Pachycondyla striata* and *P. marginata*. **Insectes sociaux**, v. 64, n. 2, p. 209-217, 2017.
- DALLAI, R.; LUPETTI, P.; MENCARELLI, C. Unusual axonemes of hexapod spermatozoa. **Int. Rev. Cytol.** v. 254, p. 45–99, 2006.
- 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., 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.
- DUMSER, J. B. The regulation of spermatogenesis in insects. **Annual review of entomology**, v. 25, n. 1, p. 341-369, 1980.
- ELELIMY, H. A. S., GHAZAWY, N. A., OMAR, A. H., MEGUID, A. A. Morphology and histology of the male reproductive system of *Spilostethus pandurus* (Scopoli) (Hemiptera: Lygaeidae). **African Entomology**, v. 25, n. 1, p. 210-219, 2017.
- FAWCETT, D.W.; ITO, S. The fine structure of bat spermatozoa. **The American journal of anatomy**, v. 116 p. 567-610, 1965.
- FAWCETT, D.W.; EDDY, E.M.; PHILLIPS, D.M. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v.2(1), p. 129-153, 1970.
- FAWCETT, D. W.; ANDERSON, W. A.; PHILLIPS, D. M. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Developmental biology**, v. 26, n. 2, p. 220-251, 1971.
- 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, 2001.
- FOOTIT, R. G.; ADLER, P. H. Biodiversity of Heteroptera. **Insect Biodiversity: Science and Society**, v. 2, 2017.
- GARBELOTTO, T.A., CAMPOS, L.A. A subfamília Pentatominae. In: Pentatominae do Sul de Santa Catarina. **Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia**, p. 7-8, 2014.
- 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.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I step method. **Experientia**, v. 36, p. 104-105, 1980.

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.

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

JYOTI, G., SANTOSH, N., DESAI, A. Revamp Studies on Morpho-Histology of the Male Reproductive System of *Halysdentatus* Fabricious (Hemiptera: Pentatomidae). **Annual Research & Review in Biology**, v. 6, n. 3, p. 176, 2015.

KASINSKY, H. E.; EIRIN-LOPEZ, J. M.; AUSIÓ, J. Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 8, p. 755-771, 2011.

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.

KING, R. C. Handbook of genetics: Volume 5 Molecular Genetics. 1st ed. **New York: Plenum Press**, p.161.1976.

LEE, Peter E.; WILKES, A. Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. **Science**, v. 147, n. 3664, p. 1445-1446, 1965.,

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.

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

- 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.; 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.
- NELSEN, O. E. Life cycle, sex differentiation, and testis development in *Melanoplusdifferentialis* (Acrididae, Orthoptera). **Journal of Morphology**, v. 51, n. 2, p. 467-525, 1931.
- NOVAIS, A. M., DIAS, G., LINO-NETO, J. Testicular, spermatogenesis and sperm morphology in *Martaregabentoi* (Heteroptera: Notonectidae). **Arthropod Structure & Development**, 2017.
- 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
- PASINI, M. E., REDI, C. A., CAVIGLIA, O., & PEROTTI, M. E. Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. **Tissue and Cell**, v. 28, n. 2, p. 165-175, 1996.
- 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.
- PONCIO, S., DEQUECH, S. T. B., STURZA, V. S., LISSNER, R. A. D., PERLIN, L. F., ROSALINO, P. K., & RIBEIRO, L. D. P. (2010). First report of *Stiretrus de castigmus* in Brazil preying *Microtheca ochroloma*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1203-1205, 2010.
- PONCIO, S., DEQUECH, S. T. B., STURZA, V. S., LISSNER, R. A. D., PERLIN, L. F., ROSALINO, P. K., & RIBEIRO, L. D. P. (2010). First report of *Stiretrus de castigmus* in Brazil preying *Microtheca ochroloma*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1203-1205, 2010.
- PRATT, S. Formation and differentiation of the nebenkern in spermatids of anhemipteran insect, *Murgantia histrionica*. **Comparative Spermatology**, p. 301-311, 1970.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; DE LELLO, E. Cytoplasmic bridges, intercellular junctions, and individualization of germ cells during spermatogenesis in *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Journal of morphology**, v. 227, n. 2, p. 145-154, 1996.
- REBAGLIATI, P. J.; PAPESCHI, A. G.; MOLA, L. M. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa mediatubunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **European Journal of Entomology**, v. 100, n. 1, p. 11-18, 2003.

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.

RODRIGUES, A. R., SERRÃO, J. E., TEIXEIRA, V. W., TORRES, J. B., TEIXEIRA, A. A. Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisusnigrispinus*. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 12, p. 1543-1551, 2008.

SCHRADER, F., LEUCHTENBERGER, C. A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). **Experimental Cell Research**, **Experimental Cell Research**, v. 1, n. 3, p. 421-452, 1950.

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.

SILBERGLIED, R. E., SHEPHERD, J. G., & DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera?. **American Naturalist**, p. 255-265, 1984.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M.; COSTA, C. L. A. A.; ITOYAMA, M. M.. A study of meiosis and spermiogenesis in the testicular lobes of *Antiteuchustripteris* (Heteroptera: Pentatomidae). **Eur. J. Entomol**, v. 104, p. 353-362, 2007.

SOUZA H. V., ITOYAMA M. M. Comparative study of spermatogenesis and nucleolar behavior in testicular lobes of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2010, 2010.

SOUZA, H. V., MURAKAMI, A. S., DE MOURA, J., DE ALMEIDA, E. C., MARQUES, I. F. G., ITOYAMA, M. M. Comparative analysis of the testes and spermatogenesis in species of the family Pentatomidae (Heteroptera). **European Journal of Entomology**, v. 108, n. 3, p. 333, 2011.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G.S..The long and short of sperm polymorphisms in insects.**Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 02, p. 153-182, 2002.

SZÖLLÖSI, A. Electron microscope study of spermiogenesis in *Locusta migratoria* (Insect Orthoptera). **Journal of ultrastructure research**, v. 50, n. 3, p. 322-346, 1975.

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.