

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Luis Lênin Vicente Pereira

**Estudo morfológico dos testículos com ênfase
na análise da espermatogênese e
ultraestrutura de espécies aquáticas de
Heteroptera**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre em
Genética**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Luis Lênin Vicente Pereira

**Estudo morfológico dos testículos com ênfase
na análise da espermatogênese e
ultraestrutura de espécies aquáticas de
Heteroptera**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre em
Genética**

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

São José do Rio Preto-SP
2011

Pereira, Luis Lênin Vicente.

Estudo morfológico dos testículos com ênfase na análise da espermatogênese e ultraestrutura de espécies aquáticas de Heteroptera

/ Luis Lênin Vicente Pereira. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

100 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mary Massumi Itoyama

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética animal. 2. Ultraestrutura de Heteroptera. 3. Testículos – Morfologia. 4. Hemíptera. I. Itoyama, Mary Massumi. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.754

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

Luis Lênin Vicente Pereira

Estudo morfológico dos testículos com ênfase na análise da espermatogênese e ultraestrutura de espécies aquáticas de Heteroptera

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de concentração em Genética Animal e Evolução, junto ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mary Massumi Itoyama
Professora Assistente Doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos
Professora Doutora
UFG- Goiás

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina de Carvalho Marchesin
Professora Doutora
UNIP-São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, SP
2011

Dedico esta Dissertação a Regina Lúcia da Silva Vicente Pereira (minha mãe), ao Luís Lênin Pereira (meu pai, *in memoriam*), à Karine Carolina Vicente Pereira e Felipe Augusto Vicente Pereira (meus irmãos).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha mãe Regina Lúcia da Silva Vicente Pereira, ao meu pai Luís LÊNIN Pereira (*in memoriam*) e aos meus irmãos Karine Carolina Vicente Pereira e Felipe Augusto Vicente Pereira por todo apoio e carinho;

Minha Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Mary Massumi Itoyama por ter me aberto as portas desta Instituição, por ter me orientado desde o Estágio Básico até o Mestrado, e principalmente pelo apoio à mim e à minha família;

Agradeço aos meus amigos, Ana Cambraia, Camila Furlan, Francisco Hofstetter, Henrique Minharro, Marco Jaquetto, Rafael Gomes, Robson Roberto, Rodrigo D'Agostinho, Sônia Bacco, Valéria Benes Gaetan e em especial Reverso Roberto da Silva pelo companheirismo sincero em todas as horas e amizade;

À minha querida amiga Márcia Maria Urbanin Castanhole, companheira de coletas e em todas as horas;

Agradeço, também, aos meus amigos do laboratório Mariana Oliveira Gomes, Tatiani Seni de Souza Firmino e Hederson Vinícius de Souza, e aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética por estarem comigo fazendo parte desta jornada;

Aos amigos da Graduação, Aliane Oliveira, Daiane Arduini, Danusa Cassiano, Edna Alves, Francine de Souza, Jaqueline Renata, Juliana de Souza, Luciana Bauck, Maria Lúcia P. César, Miriam Pereira, Natália Padovan, Silmara Sanches e Silvana Barufi pelos momentos de estudo em grupo, pelo apoio, força e principalmente pelo carinho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética;

Ao órgão de Fomento CNPq pela bolsa concedida;

Aos Funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação pelo apoio;

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, à Dr^a. Rosana Silistino de Souza e ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior pela orientação e auxílio nas análises ultraestruturais;

Finalmente gostaria de agradecer a todos os Professores que me guiaram até o momento, por terem contribuído com a sua sabedoria, em especial: a Prof^a Ivone Aparecida Sanfelici de Farias Gobbi por ter me instigado desde o colégio a paixão pela Biologia, e aos professores da Graduação, em especial: Andréia Rezende, Eliana Fernandez, Fabiano Taddei, Fernanda Alcantara dos Santos, LÍlian Castiglioni, Maria Tercília Oliveira, Omar Khalil, Regiane Gonçalves, Rogério Castro, Tabata Atique, Ursulandrea Abelan, Valéria Stranghetti e Zélia Valsechi.

“A ignorância afirma ou nega veementemente; a ciência duvida.”

François Marie Arouet (Voltaire)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	09
1. Características Gerais dos Heteroptera Aquáticos	09
2. Aspectos Citogenéticos	10
3. Morfologia Testicular	15
4. Aspectos Ultraestruturais	16
4.1. Acrossomo	16
4.2. Axonema	17
4.3. Complexo Mitocondrial e Derivado Mitocondrial	18
4.4. Corpo Cromatóide	19
4.5. Espermátides Aberrantes e Elementos Supranumerários	20
4.6. Nucléolo	20
II. OBJETIVOS	23
III. CAPÍTULOS	24
Artigo I Descrição da espermatogênese de espécies aquáticas das famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae (Heteroptera).....	26
Artigo II Ultraestrutura da espermatogênese de <i>Gelastocoris flavus flavus</i> e <i>Martarega uruguayensis</i> (Heteroptera)	50
IV. DISCUSSÃO GERAL	73
V. CONCLUSÕES	79
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
VII. RESUMO	99
VIII. ABSTRACT	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR: Impregnação por íons prata
AT: Azul de Toluidina
CB: Corpo cromatóide (*chromatoid body*)
DNA: Ácido desoxiribonucleico
DNAr: DNA ribossômico
KCl: Cloreto de potássio
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
RNA: Ácido ribonucleico
RNAr: RNA ribossômico
RON ou NOR: Região Organizadora Nucleolar

FIGURAS

Ac: Acrossomo
Ax: Axonema
CB: Corpo Cromatóide
CM: Complexo Mitocondrial
DM: Derivados Mitocondriais
Mi: Mitocôndrias
N: Núcleo
Nu: Nucléolo

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Características Gerais dos Heteroptera Aquáticos

A subordem Heteroptera possui sete infraordens com aproximadamente 80 famílias. A maioria ocorre em todos os continentes (exceto Antártica) e algumas ilhas (SCHUH; SLATER, 1995). Dentre estes há os Heteroptera aquáticos e semi-aquáticos que são amplamente distribuídos, e surpreendem por sua capacidade de habitar uma extraordinária variedade de ecossistemas, sendo encontrados em habitats de água doce e marinho, e variada faixa de altitude entre 0 e 4.700 m (MELO, 2009).

Estes insetos possuem ciclo de vida direto (ovos, ninfas e adultos sexualmente maduros). Devido às peculiaridades morfológicas e características comportamentais desses insetos predadores, independentemente do estágio de desenvolvimento, são capazes de subjugar e consumir pequenos peixes e insetos. Isto confere a este grupo evidente relevância para a estrutura trófica e transferência de nutrientes em ambientes de água doce, bem como um potencial eminente para o controle das populações de vetores de doenças (SCHUH; SLATER, 1995; VIANNA et al., 2003).

Dentre todos os Heteroptera, 23 famílias são as representantes aquáticas e semi-aquáticas: Aepophilidae, Aphelocheiridae, Belostomatidae, Corixidae, Gelastocoridae, Gerridae, Hebridae, Helotrephidae, Hermatobatidae, Hydrometridae, Leptopodidae, Macroveliidae, Mesoveliidae, Naucoridae, Nepidae, Notonectidae, Ochteridae, Omaniidae, Paraphrynoveliidae, Pleidae, Potamocoridae, Saldidae e Veliidae.

Os Heteroptera pertencentes à família Belostomatidae, muitas vezes referida como insetos gigantes d'água, estão distribuídos por todo mundo, embora sua maior diversidade esteja nos trópicos, normalmente associados com a vegetação encontrada em águas estagnadas ou de baixo fluxo. São conhecidos pelo comportamento do macho, pois este cuida dos ovos fecundados sem a

cooperação da fêmea (SMITH, 1997; TALLAMY, 2000; INADA et al., 2011; PAPESCHI; BRESSA, 2006; PEREIRA et al., 1993).

Os insetos pertencentes ao gênero *Gelastocoris* (Gelastocoridae) possuem hábito de vida semi-aquático, e são encontrados nas margens dos corpos d'água doce onde o solo é constantemente encharcado (BORROR et al., 1979; PEREIRA et al., 2007). As espécies deste gênero possuem hábito alimentar predador generalista, capturando pequenas presas que se encontram nas margens dos corpos d'água. Como não são adaptados à vida aquática, os gelastocorídeos evitam a submersão (MERRITT; CUMMINS, 1984).

Heteroptera aquáticos pertencentes à família Gerridae, são conhecidos como insetos de passadas largas, pois movimentam-se sobre a água usando simultaneamente as pernas medianas e posteriores. Vivem na superfície das lagoas, de córregos lentos, de pântanos, e de outras águas paradas. Podem mover-se muito rapidamente, até 1,5 m/s, na superfície da água. O comprimento é bastante variável, de 1,6 a 36 mm, possuem pernas compridas e a forma do corpo é muito próxima do arredondado. Eles apresentam dieta insetívora, alimentando-se de pequenos insetos que eventualmente caem sobre a água. Seus ovos são depositados sobre objetos flutuantes (BORROR; DELONG, 1988).

Os insetos da família Notonectidae são comumente conhecidos como nadadores de costas, por nadarem ou saírem em disparada sobre suas costas. Além disso, eles são caracterizados por possuírem pernas posteriores adaptadas para a natação. As espécies da família Vellidae, são pequenas, gregárias e predadoras (UESHIMA, 1979).

2. Aspectos Citogenéticos

Os estudos citogenéticos em Heteroptera datam de 1891 com Henking, que realizou a análise morfológica da espermatogênese na espécie *Pyrrhocoris apterus* Linnaeus (Pyrrhocoridae) (PAPESCHI; BRESSA, 2006). Os Heteroptera possuem como característica geral os cromossomos holocêntricos, ou seja, sem centrômero localizado (BUCK, 1967; COMINGS; OKADA, 1972a;

MOTZOKO; RUTHMAN, 1984; RUFAS; GIMÉNEZ-MARTÍN, 1986; WOLF, 1996); a atividade cinética é restrita aos finais dos cromossomos, mais especificamente, nas regiões teloméricas, sendo então denominados cromossomos telocinéticos (MOTZOKO; RUTHMAN, 1984; SCHRADER, 1935, 1940; HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996), presume-se que ocorra a terminalização dos quiasmas (JOHN; KING, 1985), embora haja trabalhos que discutam esse assunto (JONES, 1987; SOLARI; AGOPIAN, 1987), e a primeira divisão meiótica é reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais.

Os cromossomos por serem holocêntricos conferem a capacidade de divisão aos fragmentos cromossômicos produzidos, por exemplo, por radiação (HUGHES-SCHRADER; SCHRADER, 1961). Os fragmentos originados naturalmente também podem migrar regularmente para os pólos durante a anáfase e sobreviver por muitas gerações celulares. A Fragmentação pode, portanto, levar facilmente a um aumento no número de cromossomos (JACOBS, 2004).

Estes insetos apresentam outras particularidades durante a meiose. No leptóteno-zigóteno o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e está localizado na periferia do núcleo. Após o diplóteno, as células aumentam de tamanho e o núcleo torna-se semelhante ao estado interfásico, sendo este denominado de “difuso”. No final da diacinese o cromossomo X torna-se isopicnótico. Na metáfase I o cromossomo X localiza-se no centro do anel formado pelos autossomos bivalentes. Na anáfase I os autossomos bivalentes dividem-se reducionalmente enquanto o cromossomo X divide-se equacionalmente. A segunda divisão segue-se diretamente após a telófase I, sem os estágios restantes. Na metáfase II os autossomos dispõem-se no plano equatorial formando uma configuração em anel, com o cromossomo X no centro. Após a telófase II, as células filhas formadas, terão como destino o processo de espermição, pela diferenciação dos espermatócitos e alongação dessas células (BRESSA et al., 2002).

Os Heteroptera possuem, além dos autossomos e cromossomos sexuais (sistemas simples ou múltiplos), os m-cromossomos (microcromossomos) e os cromossomos B. O comportamento meiótico desses cromossomos é diferente (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; PAPESCHI; MOLA, 1990; GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1996; SUJA et al., 2000). Como regra, autossomos bivalentes são quiasmáticos (exceto para poucas espécies das famílias Saldidae, NOKKALA; NOKKALA, 1983; Nabidae, NOKKALA; NOKKALA, 1984a; Miridae, NOKKALA; NOKKALA, 1986a; Anthocoridae, NOKKALA; NOKKALA, 1986b e Microphysidae, NOKKALA; GROZEVA, 2000), e os bivalentes em forma de bastão orientam-se axialmente e segregam-se pré-reducionalmente. Por outro lado, os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e comportam-se como univalentes na meiose dos machos (UESHIMA, 1979; GROZEVA; NOKKALA, 2001).

Wilson (1905) introduziu o termo m-cromossomo para descrever o pequeno par de cromossomos em Hemiptera com comportamento diferente dos autossomos e dos cromossomos sexuais durante a meiose. Em Heteroptera, os m-cromossomos foram primeiramente descritos nos Coreidae por Paulmier (1899). Subsequentemente foram encontrados em outras espécies das infraordens Nepomorpha, Leptopodomorpha e Pentatomomorpha (UESHIMA, 1979; GROZEVA; KUZNETSOVA, 1989). Os m-cromossomos, geralmente, não estão pareados durante o início da prófase meiótica I, mas na diacinese eles se juntam. Na metáfase I eles estão sempre associados formando o pareamento “end-to-end” (“touch-and-go”) como um pseudobivalente com segregação reducional na anáfase I. Na metáfase I os autossomos arranjam-se em círculo e o m-pseudobivalente localiza-se no centro e o cromossomo X, geralmente, encontra-se fora do círculo formado pelos autossomos. Os m-cromossomos são aquiasmáticos e segregam-se equacionalmente na segunda divisão meiótica, assemelhando-se aos bivalentes autossômicos (BRESSA et al., 2001; PAPESCHI et al., 2003).

Os cromossomos B são reconhecidos como tais pois aparecem em alguns indivíduos, em algumas populações, de uma determinada espécie causando polimorfismo cromossômico. Eles são supranumerários ou membros

adicionais de um grupo cromossômico, não essencial para a célula ou indivíduo, mas, possivelmente prejudicial, pelo menos se presente em grande número. Cromossomos B foram encontrados em inúmeras espécies de plantas e animais em uma diversidade de grupos. Eles formam um grupo altamente heterogêneo, podem ser de vários tamanhos e variar grandemente no conteúdo de heterocromatina e estabilidade mitótica, e seus efeitos podem ser benéficos, prejudiciais ou neutros. Vários autores consideram os cromossomos B como parasitas ou egoístas (NOKKALA; NOKKALA, 2004).

O número de autossomos em Heteroptera varia de quatro (Belostomatidae) a 80 (Miridae), mas estes números não são típicos para a subordem (UESHIMA, 1979). É difícil dizer qual é o número cromossômico modal para a subordem inteira, pois todas as infraordens (Cimicomorpha, Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha, Nepomorpha e Pentatomorpha) dentro dos Heteroptera não foram estudadas citologicamente na mesma extensão (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Com relação aos sistemas cromossômicos do sexo há os simples XY/XX (74,7% das espécies) e X0/XX (14,8%) e os múltiplos (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente do Y, X_n0/X_nX_n , X_nY/X_nX_n e XY_n/XX , 10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984). Há, ainda, um sistema particular neo-XY (0,2%) (CHICKERING; BACORN, 1933; SCHRADER, 1940; JANDE, 1959).

Espécies da família Belostomatidae não possuem o par de m-cromossomos, o sistema cromossômico do sexo pode ser XY, X_nY ou o sistema neo-XY e o número modal de cromossomos para esta família é de $2n= 26$ (PAPESCHI et al., 2006). Com relação à família Gelastocoridae somente uma espécie foi analisada citogeneticamente, *Gelastocoris oculatus*, com $2n= 30A + X_1X_2X_3X_4Y$, não possuindo, portanto, m-cromossomos (UESHIMA, 1979).

A família Gerridae é caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo X0, disposição cromossômica em anel na metáfase meiótica e ausência de m-cromossomos. Apresentam, ainda, cromossomos holocêntricos, divisão pré-reducional dos autossomos e pós-reducional dos

cromossomos sexuais. O número cromossômico modal é de 21 (20A + X0) ou 23 (22A + X0) (UESHIMA, 1979).

Segundo Ueshima (1979) somente 12 espécies e dois gêneros pertencentes à família Notonectidae, foram analisadas citogeneticamente. O gênero *Anisops* (Anisopinae) é caracterizado por sistema cromossômico do sexo X_1X_20 e apresenta um par de m-cromossomos, sendo o número diplóide de cromossomos de 26 para o macho e 28 para a fêmea. Espécies do gênero *Notonecta* (Notonectidae) analisadas possuem sistemas cromossômicos do sexo X0 e XY e $2n = 24$ (20A+2m+XY) ou $2n = 26$ (22A+2m+XY) cromossomos.

As espécies da família Veliidae, *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, apresentam $2n = 21$ (20A+X0) cromossomos (COBBEN, 1968), e as espécies *Velia currens* (POISSON, 1936) e V. sp. (UESHIMA, 1979) apresentam $2n = 25$ (24A+X0). Apesar de todas as espécies terem sido descritas apresentando sistema cromossômico do sexo X0, Takenouchi e Muramoto (1971) reportaram o sistema cromossômico do sexo XY para *Microvelia douglasi*, mas há necessidade de confirmação (UESHIMA, 1979).

Uma das mais importantes questões relacionadas à evolução do cariótipo em Heteroptera é o problema de diferentes sistemas cromossômicos do sexo. O problema básico relacionado à evolução dos sistemas cromossômicos do sexo em Heteroptera é a questão de qual sistema é ancestral, X0 ou XY. O sistema mais comum em Heteroptera é o XY, mas ao mesmo tempo o táxon ancestral de Heteroptera tem principalmente o X0 (UESHIMA, 1979). O X0 é mais comum em insetos das ordens ancestrais Odonata, Orthoptera e Psocoptera (WHITE, 1973). Este sistema está prevalecendo também na ordem Homoptera juntamente com Heteroptera (HALKKA, 1959; KIRILLOVA, 1986, 1987). Ueshima (1979) acredita que o sistema XY evoluiu do X0 em Heteroptera, mas ele reconhece que a informação disponível é rica nas espécies derivadas e muito pobre, nos táxons ancestrais (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Uma proposta alternativa foi feita por Nokkala (1983) com base na descoberta de um cromossomo Y em uma espécie de *Saldula* (Saldidae) pertencendo a um dos mais ancestrais táxons de Heteroptera. Nokkala e Nokkala

(1984b) observando espécies de Tingidae verificaram que *Dictyonota tricornis* não possui cromossomo Y (X0) e isto é uma indicação de que houve perda desse cromossomo. Portanto, a perda do cromossomo Y em *D. tricornis* deve ter ocorrido posteriormente, pois outras espécies de *Dictyonota* (*D. fuliginosa*) apresentaram o cromossomo Y (NOKKALA; NOKKALA, 1984b).

A presença do sistema neo-XY é uma característica comum em outros insetos com cromossomos holocêntricos tais como Odonata (MOLA; PAPESCHI, 1993), mas ele está quase que ausente em Heteroptera. Até a última revisão em 2003, o sistema neo-XY foi observado somente em *Lethocerus* (Belostomatidae) (CHICKERING; BACORN, 1933; JANDE, 1959), *Rhytidolomia senilis* (Pentatomidae) (SCHRADER, 1940), *Dysdercus albofasciatus* (Pyrrhocoridae) (BRESSA et al., 1999) e *Cacopsylla peregrina* (Frst) (Psylloidea, Homoptera) (NOKKALA et al., 2003). Em Belostomatidae e Pentatomidae foi sugerido que a fusão de ambos os cromossomos X e Y ancestrais com um par de autossomos tenha ocorrido originando um sistema particular neo-XY (BRESSA et al., 1999). O trabalho de Bressa et al. (1999) mantém a hipótese de Ueshima (1979), assim o sistema neo-XY evoluiu do X0 ancestral (BRESSA et al., 1999).

Segundo Nokkala et al. (2003), o sistema neo-XY é derivado do X0 por fusão do cromossomo X com um autossomo, resultando no cromossomo neo-X e o homólogo é transformado em cromossomo neo-Y. A presença do sistema neo-XY é revelado por cromossomo sexual bivalente, quiasma heteromórfico na meiose de machos e uma diminuição no número de autossomos no cariótipo. Estas características são também típicas para o sistema neo-XY em Psylloidea com somente poucas exceções.

3. Morfologia Testicular

Com relação à morfologia testicular de Heteroptera, há poucos trabalhos na literatura. Uma das características comuns entre grande parte dos Heteroptera é que eles possuem testículos formados de lobos, alongados e que

estão sempre um do lado do outro. O número é variável, de três a sete (SOUZA et al., 2007a). Segundo a literatura, o número de lobos na família Lygaeidae é variável, tendo sido encontrados indivíduos com dois, quatro, seis e sete lobos, sendo sete considerado o número ancestral (GROZEVA; KUZNETSOVA, 1992). Ainda segundo a literatura, *L. aduncus* (Gerridae, CASTANHOLE et al., 2008) apresenta dois lobos testiculares, *Mormidae v-luteum* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008) apresenta três lobos testiculares, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008), *Zicca annulata* e *Chariesterus armatus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a) quatro lobos, *Antitheuchus tripterus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2007b) seis lobos, *Nysius californicus* (Lygaeidae, SOUZA et al., 2007c), *Anasa bellator*, *Athaumastus haematicus*, *Dallacoris obscura*, *D. pictus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a) sete lobos. Em relação à morfologia testicular de Heteroptera aquáticos, Castanhole et al. (2010) descrevem que as espécies *Brachymetra albinerva*, *Cylindrostethus palmaris* e *Halobatopsis platensis* possuem testículos envoltos por membrana transparente, formados por dois lobos alongados e localizados na região posterior do abdome.

4. Aspectos Ultraestruturais

4.1. Acrossomo

Na maioria das espécies o acrossomo (Ac) é uma organela fundamental para fecundação (PHILLIPS, 1970). Além da fecundação, o acrossomo também está relacionado com a capacitação do espermatozoide onde suas enzimas podem funcionar para remover o mecanismo de proteção na superfície do espermatozoide e/ou na digestão de barreiras para a migração do espermatozoide dentro do trato reprodutor da fêmea (FAWCETT; ITO, 1965), e sua origem vem a partir do complexo de Golgi (YASUZUMI, 1974; BÁO et al., 1989).

Durante a espermiogênese é observado o aparecimento da vesícula pró-acrossomal, que determina o polo anterior da célula, estando localizada anteriormente ao núcleo, no espermatozoide (STANLEY, 1971; AZEVEDO et al., 1985; BÁO et al., 1989; ARAUJO et al., 2011). As enzimas acrossomais são geralmente armazenadas na forma de pró-enzimas e quando ocorre a reação acrossomal são liberadas e ativadas, participando, assim, do evento da fertilização (YANAGIMACHI, 1988; BACCETTI et al., 1989; TESARIK et al., 1990; GALLO et al., 1991).

Na literatura há poucos trabalhos que discutem a origem e o conteúdo do acrossomo, em Heteroptera. Essa estrutura foi analisada em *Gerris najas* (Gerridae) (WERNER; WERNER, 1993), *Notonecta glauca* (Notonectidae) (WERNER et al., 1988) e *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001), onde foram observadas vesículas acrossomais formadas a partir do complexo de Golgi, que posteriormente formarão o acrossomo que com o alongamento da espermátide determina o pólo anterior desta. Foram observadas mudanças nucleares onde o desenvolvimento do núcleo envolve mudanças na forma e no grau de condensação da cromatina. Inicialmente, a cromatina encontra-se dispersa e com uma eletrodensidade baixa, e ao decorrer da espermatogênese, assume um arranjo fibrilar, compacta e de alta eletrodensidade.

4.2. Axonema

O estudo da organização estrutural do axonema (Ax) recebeu valiosas contribuições provenientes das inúmeras observações realizadas no flagelo do espermatozoide de *Drosophila* (PEROTTI, 1969; KIEFER, 1970; DALLAI; AFZELIUS, 1991). Na maioria dos insetos o padrão organizacional do axonema segue o esquema 9+9+2, que é o arranjo usual de 9+2 microtúbulos circundados por nove microtúbulos acessórios adicionais (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972; FERNANDES, 1999). Em alguns mosquitos é comum o esquema 9+9+1, enquanto em efeméridas predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970). Existem ainda esquemas que são

considerados aberrantes, como por exemplo, em dípteros cecidomídeos em que o esquema é 13+0 (BACCETTI; DALLAI, 1976). Araujo et al. (2011) descreveram um padrão de cauda para algumas espécies da família Pentatomidae, onde o flagelo é composto de um axonema e dois derivados mitocondriais, o axonema segue o padrão de arranjo de microtúbulos de 9+9+2 (9 microtúbulos acessórios, 9 subtúbulos e 2 microtúbulos centrais). O autor descreve também que o axonema é cercado por uma membrana cisterna que na maturação do espermatozoide se reduz a duas pequenas cisternas de lados opostos ao axonema aderindo-o aos derivados mitocondriais. Entre os Heteroptera, a ultraestrutura de espermatozoides foi descrita em espécies da família Pentatomidae (TRANDABURU, 1973; FERNANDES; BÁO, 1998), Reduviidae (DOLDER, 1988; BÁO; DESOUZA, 1994), em Heteroptera aquáticos (AFZELIUS et al., 1985; LEE, 1991; LEE; LEE, 1992), e em insetos pertencentes a infraordem Leptopodomorpha (AFZELIUS et al., 1976), Cimicomorpha, Gerromorpha e Pentatomomorpha (DALLAI; AFZELIUS, 1980; ARAUJO et al., 2011) onde foi observado um padrão flagelar de 9+9+2. O padrão de localização dos derivados mitocondriais estando dispostos bilateralmente em relação ao axonema foi semelhante para todas estas famílias.

4.3. Complexo Mitocondrial e Derivado Mitocondrial

As mitocôndrias durante a espermatogênese assumem diferentes morfologias. Em insetos, a regularidade nas formas da mitocôndria é particularmente notável (PHILLIPS, 1970). No decorrer da espermatogênese as mitocôndrias sofrem metamorfose, onde a estrutura típica da mitocôndria é completamente modificada. Nos estádios iniciais de diferenciação ocorre um complexo processo de fusão e rearranjo das mitocôndrias formando o complexo mitocondrial que é frequentemente denominado “Nebenkern”, especialmente em trabalhos mais antigos (PRATT, 1970; PHILLIPS, 1970; TANDLER; HOPPEL, 1972; BACCETTI, 1972; BACCETTI; AFZELIUS, 1976). Com o prosseguimento da espermatogênese, ocorre a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais (DM), que no processo de alongamento do

espermatozoide posicionam-se bilateramente em relação ao axonema (TOKUYASU, 1974).

Durante o processo de diferenciação os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura de natureza proteica, organizada num padrão paracristalino, e muitas espécies de insetos acumulam estas estruturas nas mitocôndrias durante a espermiogênese (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; ROSATI et al., 1976; BÁO et al., 1992). Esta estrutura paracristalina também é conhecida como cristalóide e é formado por uma proteína rica em prolina, que foi designada de cristalomitina (BACCETTI et al., 1977). Em Heteroptera (famílias Pentatomidae, Reduviidae e Gerridae) foi evidenciado a presença de dois ou três corpos cristalinos no interior dos derivados mitocondriais (ARAUJO, 2011).

Várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, podendo participar no controle e regulação da forma do movimento flagelar e estando relacionados com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a motilidade flagelar (PHILLIPS, 1974; YASUZUMI, 1974; TOKUYASU, 1975). No entanto, Perotti (1973) contraria esta última afirmação, supondo que o material armazenado nos DM podem estar envolvidos na ativação e nutrição do ovócito após a fertilização.

4.4. Corpo Cromatóide

As células germinativas possuem em seu citoplasma o acúmulo de um material denominado corpo cromatóide (CB) ou “nuage” (PARVINEN, 2005). O CB é considerado um complexo macromolecular que, provavelmente, desempenha um papel de coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haploides e, também, funciona como um centro de determinação dos destinos de RNAm (PARVINEN, 2005; KOTAJA et al., 2006; KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007).

Alguns autores acreditam que o CB origina-se a partir de um material existente entre aglomerados de mitocôndrias, presente no citoplasma das

células germinativas (FAWCETT et al., 1970). No entanto trabalhos mais recentes defendem a origem a partir da fragmentação do material nucleolar, durante o processo de espermatogênese, podendo estar relacionado com a formação do corpo cromatóide (COMINGS; OKADA, 1972b; ANDERSON, 1978; ANDONOV, 1990; PERUQUETTI et al., 2008a,b; PERUQUETTI, 2011). Portanto, ainda existem muitas dúvidas em relação à origem e função do corpo cromatóide.

4.5. Espermátides Aberrantes e Elementos Supranumerários

Em insetos já foram descritos trabalhos em que os autores relatam a existência de cistos com células de diferentes estádios da espermatogênese (MESSIAS JR, 1990). Sabe-se que insetos mutantes podem apresentar transtornos a nível de espermiogênese (BÁO, 1987, BÁO; DOLDER, 1991) e que condições ambientais, como a temperatura podem influenciar no desenvolvimento normal da espermiogênese (SZOLLOSI, 1976a,b). A presença de espermátides aberrantes na espermiogênese de insetos não parece ser um evento raro. Caetano (1980), por exemplo, descreveu espermatozoides com elementos constituintes supranumerários em *Atta capigura* e *A. sexdens rubropilosa* (Formicidae).

4.6. Nucléolo

Uma estrutura que vem sendo estudada em Heteroptera é o nucléolo e outras estruturas que são impregnadas pelos íons prata. O tamanho do nucléolo está relacionado com a atividade biossintética da célula, portanto, o tamanho e o número de nucléolos e corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; SOUZA et al., 2007a,b).

Na maioria das espécies de artrópodos, os nucléolos dissociam-se no diplóteno ou diacinese. Portanto, os corpúsculos impregnados pela técnica Ag-NOR, específica para proteínas associadas ao RNAr, não são visíveis da metáfase à telófase I. Essas marcações vão reaparecer no início da formação das espermátides, indicando o reinício das funções transcricionais de RNA ribossomal e, finalmente, desaparecem no final da formação das espermátides (BRESSA et al., 2003). Entretanto, a literatura relata algumas exceções como por exemplo em *Asellus aquaticus* (isopoda), corpúsculos Ag-NOR foram visualizados durante todo o processo de espermatogênese (DI CASTRO et al., 1983), em *Callicrania seoanei* (Orthoptera), as Ag-NORs foram observadas da intercinese até a pró-metáfase II (SANTOS et al., 1987) e em *Triatoma infestans* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), as marcações Ag-NORs estavam presentes até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Finalmente em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) a semi-persistência nucleolar (presença de corpúsculos nucleolares durante as metáfases) foi observada até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus* (Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae), os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátócitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

Em Heteroptera aquáticos temos a descrição do comportamento nucleolar em *Limnogonus aduncus* (Gerridae) sendo encontrada marcações em autossomos, e um corpúsculo nucleolar em células em fase de anáfase, na espermiogênese observa-se os corpúsculos nucleolares em, praticamente, todas as fases (CASTANHOLE et al., 2008) e em *Brachymetra albinerva*, *Halobatopsis platensis*, *Cylindrostethus palmaris* (Gerridae) foi observado células com um ou vários corpúsculos, que ao se desorganizarem esse material é observado ao redor da bainha pericromossômica ou no final da metáfase I, as espermátides arredondadas apresentaram dois corpúsculos próximos um ao outro, mas que com o alongamento um desses corpúsculos permanece na região da cabeça e o outro migra para a parte inicial da cauda, ao final do processo de espermiogênese essas marcações não são mais visualizadas (CASTANHOLE et al., 2010).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Devido à grande variabilidade das características citogenéticas dos Heteroptera e ao conhecimento ainda escasso das mesmas, o objetivo geral do presente trabalho foi o de contribuirmos para ampliarmos essas informações.

Os nossos objetivos específicos foram:

- a) Analisar os testículos com relação à morfologia e o número de lobos;
- b) Analisar, detalhadamente, o comportamento meiótico e a espermiogênese de *Belostoma anurum* e *B. micantulum* (Belostomatidae), *Gelastocoris angulatus* e *G. flavus flavus* (Gelastocoridae), *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (Gerridae), *Buenoa amnigenus*, *B. unguis*, *Martarega brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis* (Notonectidae), *Rhagovelia tenuipes* e *R. zela* (Veliidae);
- c) Caracterizar aspectos ultraestruturais da espermatogênese de *G. f. flavus* e *M. uruguayensis*.

III. CAPÍTULO

Descrição da espermatogênese de espécies aquáticas das famílias Belostomatidae, Gelastocoridae, Gerridae, Notonectidae e Veliidae (Heteroptera)

Pereira, LLV¹; Castanhole, MMU¹; Moreira, FFF²; Barbosa, JF²; Itoyama, MM¹.

¹UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética e Molecular de Insetos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil; ²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Entomologia, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Os Heteroptera possuem cromossomos holocêntricos, atividade cinética restrita aos finais dos cromossomos, primeira divisão meiótica reducional para os autossomos e equacional para os sexuais, mas apesar destas diversidades de características, poucas espécies foram analisadas até o momento. Verificamos, no presente trabalho, que os testículos possuem morfologia arredondada na região distal e alongada na região proximal para as espécies da família Belostomatidae, alongados e espiralados na extremidade distal para Gelastocoridae, alongado/espiralado ou arredondado para Notonectidae e arredondado para Veliidae e Gerridae. Com relação aos dados citogenéticos, os Heteroptera aquáticos analisados possuem características semelhantes às das outras espécies de Heteroptera, descritas na literatura, como por exemplo: a) prófase I com corpúsculo heteropicnótico que persiste até o final do paquíteno, ou sem corpúsculo e com algumas regiões de heteropicnose na cromatina; b) células em diplóteno/diacinese com cromossomos com morfologia bem definida e cromossomos com associações teloméricas; c) quiasmas terminais ou intersticiais únicos ou duplos; d) células metafásicas I com os autossomos dispondo-se em anel e os m-cromossomos e o sexual no seu centro; e) células em anáfase II com migração tardia de apenas um cromossomo sexual; f) células telofásicas II na qual apenas uma das células em formação possui cromossomo sexual, para as espécies X0; g) espermátides arredondadas com coloração uniforme; h) espermátides em alongamento com a região da cromatina em forma de bastão ou em forma de foice, localizada na região anterior da cabeça da espermátide, e presença de vesícula; i) espermátides elípticas com cromatina distribuída uniformemente pela célula, com exceção da região central em que há uma vesícula; j) espermátides em fase final de alongamento com cabeça bastante alongada e

cromatina homogeneamente distribuída. Com relação aos complementos cromossômicos verificamos a presença de $2n=16$ (14A+XY, *Belostoma micantulum* e *Gelastocoris angulatus*); **21** (20A+X0, *R. c. crassifemur*); **23** (22A+X0, *R. zela* e *R. tenuipes*); **25** (24A+X0, *B. amnigenus* e *B. unguis*; 22A+2m+X0, *M. membranacea*); **27** (24A+2m+X0, *M. brasiliensis* e *M. uruguayensis*); **29** (26A+X₁X₂Y, *B. anurum*) e **35** (30A+X₁X₂X₃X₄Y, *G. f. flavus*). Com relação à morfometria das células em prófase, *B. micantulum* e *R. zela* foram as que apresentaram as menores células, *G. f. flavus* foi a que apresentou maior tamanho e *R. c. crassifemur* e *M. brasiliensis* apresentaram tamanho intermediário. A avaliação da espermatogênese, nos permitiu concluir que as características observadas são semelhantes às das outras espécies de Heteroptera, descritas na literatura, diferindo apenas com relação à morfologia dos testículos, o número de cromossomos e o sistema cromossômico do sexo.

Palavras Chave: Citogenética, lobos testiculares, meiose, espermiogênese

Introdução

Os Heteroptera aquáticos e semi-aquáticos são amplamente distribuídos, e habitam todos os tipos de habitats de água doce. Os insetos aquáticos pertencentes à subordem Heteroptera têm um ciclo de vida direto (ovos, ninfas e adultos sexualmente maduros). Devido às peculiaridades morfológicas e características comportamentais, esses insetos predadores, independentemente do estágio de desenvolvimento, são capazes de subjugar e consumir insetos e pequenos peixes. Isto confere, a este grupo, evidente relevância para a cadeia alimentar e transferência de nutrientes em ambientes de água doce, bem como um potencial eminente para o controle das populações de vetores de doenças (SCHUH; SLATER, 1995; VIANNA et al., 2003).

Os aspectos meióticos dos Heteroptera são os seguintes: no leptóteno-zigóteno o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e localiza-se na periferia do núcleo; no zigóteno e paquíteno, os cromossomos estão emaranhados. O paquíteno é seguido por um proeminente estágio difuso observado em todas as espécies selvagens, mas não nas espécies inter cruzadas. Durante este estágio, bivalentes autossomos não se descondensam completamente, apresentando, dessa maneira, várias regiões heterocromáticas, enquanto que o cromossomo X permanece heteropicnótico e associado ao núcleo. Além disso, o tamanho das células aumenta e o núcleo assemelha-

se com o estado interfásico, sendo denominado de estágio difuso após o diplóteno. No final da diacinese o cromossomo X torna-se isopicnótico. Na metáfase I, o cromossomo X localiza-se no centro do anel formado pelos autossomos bivalentes. Na anáfase I os autossomos bivalentes dividem-se reducionalmente enquanto o cromossomo X divide-se equacionalmente. A segunda divisão segue-se diretamente após a telófase I, sem os estágios restantes. Na metáfase II os autossomos dispõem-se no plano equatorial formando uma configuração em anel, com o cromossomo X no centro (BRESSA et al., 2002). Após a telófase II, as células filhas formadas terão como destino o processo de espermiacção, pela diferenciação dos espermátócitos e alongação dessas células.

Os sistemas cromossômicos do sexo já descritos são os seguintes: simples XY/XX (74,7% das espécies), X0/XX (14,8%) e múltiplos (originados por fragmentação do cromossomo X e, menos frequentemente, do cromossomo Y, X_n0/X_nX_n , X_nY/X_nX_n e XY_n/XX) (10,3%) (UESHIMA, 1979; MANNA, 1984; CASTANHOLE et al., 2008, 2010). Há, ainda, um sistema particular neo-XY (0,2%) (CHICKERING; BACORN, 1933, SCHRADER, 1940; JANDE, 1959).

Espécies da família Belostomatidae não possuem o par de m-cromossomos, o sistema cromossômico do sexo pode ser XY, X_nY ou o sistema neo-XY, e o número modal de cromossomos para esta família é de $2n = 26$ cromossomos (PAPESCHI et al., 2006). Com relação à família Gelastocoridae, somente uma espécie foi analisada citogeneticamente, *Gelastocoris oculatus*, com $2n = 30A + X_1X_2X_3X_4Y$, não possuindo, portanto, m-cromossomos (UESHIMA, 1979). A família Gerridae é caracterizada por possuir sistema cromossômico do sexo X0, disposição cromossômica em anel na metáfase meiótica e ausência de m-cromossomos. Apresentam, ainda, cromossomos holocêntricos, divisão pré-reducional dos autossomos e pós-reducional dos sexuais. O número cromossômico modal para Gerridae é de 21 ($20A + X0$) ou 23 ($22A + X0$) cromossomos (UESHIMA, 1979; CASTANHOLE et al., 2008, 2010).

Segundo Ueshima (1979), somente 12 espécies e dois gêneros pertencentes à família Notonectidae foram analisadas citogeneticamente. O gênero *Anisops* (Anisopinae) é caracterizado por sistema cromossômico do sexo X_1X_20 e apresenta um par de m-cromossomos, sendo o número diplóide de cromossomos de 26 para o macho e 28 para a fêmea. Espécies do gênero *Notonecta* (Notonectidae) analisadas possuem sistema cromossômico do sexo X0 e XY e $2n = 24$ ($20A + 2m + XY$) ou 26 ($22A + 2m + XY$) cromossomos. As espécies da família Veliidae, *Hebrovelia* sp. e *Microvelia reticulata*, apresentam $2n = 21$ ($20A + X0$) cromossomos (COBBEN, 1968), e as espécies *Velia currens* (POISSON, 1936) e *Velia* sp.

(UESHIMA, 1979) apresentam $2n= 25$ ($24A + X0$) cromossomos. Embora todas as espécies descritas tenham sistema cromossômico do sexo $X0$, foi observado XY para *Microvelia douglasi*, mas há necessidade de confirmação (UESHIMA, 1979).

Pelas características anteriormente mencionadas de número variável de cromossomos e poucos trabalhos relacionados com a citogenética, o objetivo do presente trabalho foi o de descrever a morfologia testicular e o número de lobos, e analisar detalhadamente a espermatogênese (comportamento meiótico e espermiogênese) de espécies pertencentes a cinco famílias de Heteroptera aquáticos.

Material e Métodos

No presente trabalho foram analisadas 12 espécies de Heteroptera aquáticos, pertencentes a cinco famílias assim distribuídas: Belostomatidae (*Belostoma anurum* e *B. micantulum*), Gelastocoridae (*Gelastocoris angulatus* e *G. f. flavus*), Gerridae (*Rheumatobates crassifemur crassifemur*), Notonectidae (*Buenoa amnigenus*, *B. unguis*, *Martarega brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis*) e Veliidae (*Rhagovelia tenuipes* e *R. zela*).

Para as análises foram utilizados 20 machos adultos, de cada espécie, coletados na região de São José do Rio Preto ($20^{\circ}47'32''S$, $49^{\circ}21'37''W$), São Paulo, Brasil. Após a coleta foram esterilizados e dissecados, já que a espermatogênese em Heteroptera não se encerra no estágio de ninfa. Os testículos extraídos foram analisados com relação à sua morfologia, à bainha peritoneal que os reveste e à quantidade de lobos que os formam, com auxílio do estereomicroscópio LEICA MZ 16. Posteriormente, os testículos foram colocados em lâminas histológicas, dilacerados e corados com orceína lacto-acética. As melhores imagens foram capturadas no microscópio ZEISS AXIO SCOPE A1 utilizando o programa de análise de imagens AXIO VISION LE versão 4.8.

Para comparação morfométrica das células em prófase meiótica inicial, fizemos as análises a partir de um representante de cada família: *B. micantulum* (Belostomatidae), *G. f. flavus* (Gelastocoridae), *R. c. crassifemur* (Gerridae), *M. brasiliensis* (Notonectidae) e *R. zela* (Veliidae) para cada uma das espécies foram analisadas 50 células utilizando a ferramenta “measure” do programa Axio Vision 4.8 e escala em μm^2 , para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA utilizando o programa Minitab® 16.1.0. O grau de confiabilidade foi altamente significativo, pois obtivemos um valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Morfologia dos testículos

As 12 espécies analisadas apresentam testículos envoltos por bainha peritoneal transparente e morfologia variável (arredondadas, arredondadas/espiraladas ou alongadas/espiraladas) e semelhante quando comparadas espécies da mesma família. Uma exceção ocorre na família Notonectidae, na qual encontramos testículos com morfologia arredondada/espiralada para o gênero *Buenoa* ou alongada/espiralada para o gênero *Martarega*.

Os testículos das espécies da família Belostomatidae (*B. anurum* e *B. micantulum*) apresentam-se enovelados na região distal do ducto ejaculatório, formando uma estrutura arredondada (Figura 1a) e com cinco lobos testiculares que estão individualizados na região proximal do ducto ejaculatório (Figura 1b). Em Gelastocoridae (*G. angulatus* e *G. f. flavus*) os testículos são formados por dois lobos alongados e intimamente pareados na região proximal do ducto ejaculatório e na região distal eles estão separados e espiralados, com aproximadamente cinco voltas (Figura 1c).

Os testículos das espécies *B. amnigenus* e *B. unguis* da família Notonectidae também apresentam morfologia arredondada, porém são altamente espiralados (Figura 1d). No entanto em *M. brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis* os testículos são alongados e espiralados, apesar de pertencerem, também, à família Notonectidae (Figura 1e). O número de voltas é de aproximadamente três, e pode-se verificar, ainda, que os testículos são formados de dois lobos (Figura 1e).

Observamos testículos arredondados nas famílias Gerridae (*R. c. crassifemur*, Figura 1f) e Veliidae (*R. tenuipes* e *R. zela*, Figura 1g,h, respectivamente), sendo que a espécie da família Gerridae apresentam dois lobos testiculares, ambos arredondados e separados (Figura 1f) e as espécies da família Veliidae apresentaram um único lobo (Figura 1g,h) (Tabela 1).

Espermiogênese

O comportamento das células durante a prófase I meiótica é variável entre as espécies analisadas. As células de *R. c. crassifemur*, não apresentam corpúsculo heteropicnótico evidente, sendo que em algumas células pode-se observar uma pequena região heteropicnótica alongada próximo ao corpúsculo nucleolar (Figura 2a), em *G. f. flavus* observa-se vários corpúsculos heteropicnóticos pequenos ao longo do cromossomo (Figura 2b), diferente das células de *B. micantulum* com um único corpúsculo heteropicnótico grande, fortemente corado e arredondado (Figura 2c) e de *M. brasiliensis* em que o corpúsculo não apresenta morfologia definida (Figura 2d).

Durante a prófase I observa-se, ainda, que as espécies podem apresentar quiasma intersticial que confere ao cromossomo morfologia em forma de cruz, e/ou quiasma terminal ou duplo terminais, conferindo aos cromossomos a morfologia arredondada, como observado em *G. f. flavus* e *B. anurum* (Figura 2e,f, respectivamente).

Nesta fase, todas as espécies apresentam cromossomos com morfologia definida. Algumas espécies apresentam, ainda, associações teloméricas entre os autossomos como em *M. uruguayensis* (Figura 2g).

Com relação aos complementos cromossômicos verificamos a presença de $2n=16$ (14A+XY, *B. micantulum* e *G. angulatus*); **21** (20A+X0, *R. c. crassifemur*); **23** (22A+X0, *R. zela* e *R. tenuipes*); **25** (24A+X0, *B. amnigenus* e *B. unguis*; 22A+2m+X0, *M. membranacea*); **27** (24A+2m+X0, *M. brasiliensis* e *M. uruguayensis*); **29** (26A+X₁X₂Y, *B. anurum*) e **35** (30A+X₁X₂X₃X₄Y, *G. f. flavus*) (Figura 3a-l) (Tabela 2).

Durante a metáfase I, em visão polar, a disposição dos cromossomos é variável, principalmente, com relação aos cromossomos sexuais. Os autossomos de todas as espécies, geralmente, estão dispostos circularmente. Com relação aos cromossomos sexuais, a localização depende do sistema cromossômico do sexo. Quando o sistema for X0 o cromossomo X está localizado fora do anel formado pelos autossomos (Figura 3g). Se for X0, mas com a presença de m-cromossomos, na maioria das vezes, os autossomos se dispõem circularmente com os m-cromossomos no seu centro e o X fora do anel (Figura 3i), quando for XY, o X, está dentro do anel formado pelos autossomos e o Y está localizado junto com os autossomos (Figura 3b), já se for X₁X₂Y, os X e o Y estão dentro do anel (Figura 3a), e se for X₁X₂X₃X₄Y, os X estão no

centro do anel formado pelos autossomos e o Y faz parte do anel juntamente com os autossomos (Figura 3d).

Durante as anáfases observamos que as espécies apresentam migração regular dos cromossomos, com exceção das espécies *M. brasiliensis*, *M. membranace* e *M. uruguayensis* em que é observado cromossomo com migração tardia, tanto na primeira como na segunda divisão (Figura 4a-d), sendo possivelmente o cromossomo sexual. Na telófase I podemos observar os m-cromossomos no centro do anel formado pelos autossomos e o cromossomo sexual X, fora, com migração tardia (Figura 4a).

O comportamento das células durante a espermiogênese é diferente entre as famílias, apesar de algumas características serem semelhantes como, por exemplo, a morfologia das espermátides iniciais. Todas são arredondadas, mas a localização do material heteropicnótico variou. Por exemplo, em Belostomatidae (Figura 4e-h) está presente em apenas um dos lados da célula, mas não se apresenta tão evidente como em Gelastocoridae (Figura 4k-m) em que o material heteropicnótico é arredondado e fortemente corado. Nas demais famílias as espermátides também são arredondadas, mas o material cromatínico está homogeneamente distribuído, porém mais fortemente corado, como por exemplo, nas famílias Gerridae (Figura 5a), Notonectidae (Figura 5h) e Veliidae (Figura 5n).

As espermátides em alongamento podem ter forma elíptica como em Belostomatidae (Figura 4g-i) e Gelastocoridae (Figura 4p-q) ou forma de bastão como apresentada em Gerridae (Figura 5c-e), Notonectidae (Figura 5i) e Veliidae (Figura 5t-v). Entre a fase arredondada e a inicial de bastão ou elíptica, verificamos que algumas famílias apresentam vesículas grandes como em Gelastocoridae (Figura 4l-o) e Gerridae (Figura 5b) ou vesículas pequenas como em Veliidae (Figura 5o-s). Nas espécies com vesícula grande o material heteropicnótico está localizado na região posterior da célula (Figura 4m e Figura 5b) enquanto que nas células com vesícula pequena o material heteropicnótico está localizado na região anterior inicialmente com morfologia semelhante a uma foice (Figura 5o-q), com o desenvolvimento torna-se arredondada (Figura 5r-s) e, posteriormente, em forma de bastão (Figura 5t-v).

Nas espécies que não apresentam vesículas (Belostomatidae e Notonectidae) o comportamento destas células, nesta fase, foi igual. Em Belostomatidae, inicialmente as espermátides são arredondadas (Figura 4e-f), posteriormente, a forma fica semelhante a um pingo d'água (Figura 4g-h) e na sequência vai tornando-se elíptica (Figura 4i-j). Em Notonectidae, inicialmente a forma é arredondada (Figura 5h,k) e, posteriormente, se torna em forma de bastão (Figura 5i).

Apesar de Belostomatidae e Notonectidae não terem apresentado uma vesícula nesta fase, observa-se que as espermátides elípticas apresentam duas vesículas pequenas (Belostomatidae) (Figura 4i) ou uma única grande (Notonectidae) (Figura 5l-m).

Durante o alongamento final, todas as espécies mantiveram as características, ou seja, as que apresentam a cromatina em forma elíptica continuam com esta morfologia, assim como as que apresentam a cromatina em forma de bastão (Figuras 4j,p,q e 5f,g,v) com exceção da espécie *Martarega uruguayensis* em que a região posterior da cauda está em forma de V (Figura 5j).

Morfometria das células em prófase I

A análise das 50 células em prófase meiótica inicial, de *B. micantulum* (Belostomatidae), *G. f. flavus* (Gelastocoridae), *R. c. crassifemur* (Gerridae), *M. brasiliensis* (Notonectidae) e *R. zela* (Veliidae) permitiu-nos verificar que as espécies *B. micantulum* e *R. zela* são as que apresentam as menores células (Tabela 3), sendo a área média de 396 e 596 μm^2 , respectivamente (Tabela 4). *G. f. flavus* é a espécie que apresenta a maior área celular (Tabela 4), e também a maior variabilidade no tamanho. Foram observadas células de 2.154,37 a 27.154,04 μm^2 (Tabela 3) com área média de 10.641 μm^2 (Tabela 4). *R. c. crassifemur*, e *M. brasiliensis* apresentam tamanho celular intermediário, quando comparado com *B. micantulum*, *G. f. flavus* e *R. zela*, com área média de 3.800 e 3.651 μm^2 , respectivamente (Tabela 4). *R. c. crassifemur*, também apresentou células de tamanhos muito diferentes, variando de 1.165,64 a 10.500,48 μm^2 , assim como *G. f. flavus*. Segundo o teste ANOVA do programa Minitab® 16.1.0, *B. micantulum* e *R. zela* apresentam tamanhos celulares semelhantes, sendo agrupadas juntas, assim como *R. c. crassifemur* e *M. brasiliensis*, não apresentando diferenças significativas entre as espécies e entre os dois grupos. Entretanto *G. f. flavus* foi colocada separadamente e as diferenças entre as quatro outras espécies foram significativas (Figuras 6 e 7).

Discussão

A investigação da pigmentação da bainha peritoneal que reveste os testículos e os lobos testiculares é uma característica ainda pouco explorada em Heteroptera. As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram bainha peritoneal transparente. Outras espécies descritas na literatura apresentaram bainha avermelhada, como por exemplo, *Hyalymenus* sp. e *Neomegalotomus pallescens* (Alydidae) (SOUZA et al., 2009), amarelada como em *Zicca annulata* (SOUZA et al., 2007a) ou sem coloração como em *Limnogonus aduncus* (Gerridae) (CASTANHOLE et al., 2008). Comparando-se os nossos resultados com os poucos dados da literatura observa-se que não há um padrão que possa ser relacionado com a cor da bainha, como por exemplo a família à qual as espécies pertencem, pois, na família Coreidae, observou-se bainha avermelhada, amarelada ou sem coloração. Porém, todos os Heteroptera aquáticos descritos na literatura, até o momento, apresentam bainha peritoneal transparente, possivelmente esta é uma característica comum para os Heteroptera aquáticos.

Uma característica semelhante entre os Heteroptera é que eles possuem testículos formados de lobos, que são alongados e estão sempre um do lado do outro. O número é variável, de três a sete (SOUZA et al., 2007a). Segundo a literatura o número de lobos na família Lygaeidae varia, tendo sido encontrados indivíduos com dois, quatro, seis e sete lobos, sendo sete considerado o número ancestral (GROZEVA; KUZNETSOVA, 1992). Segundo a literatura *L. aduncus* (Gerridae, CASTANHOLE et al., 2008) apresenta dois lobos testiculares, *Mormidae v-luteum* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008) três lobos, *Oebalus poecilus* e *O. ypisilongriseus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2008), *Zicca annulata* e *Chariesterus armatus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a) quatro lobos, *Antitheuchus tripterus* (Pentatomidae, SOUZA et al., 2007b) seis lobos, *Nysius californicus* (Lygaeidae, SOUZA et al., 2007c), *Anasa bellator*, *Athaumastus haematicus*, *Dallacoris obscura*, *D. pictus*, *Leptoglossus gonagra*, *L. zonatus* e *Sphictyrtus fasciatus* (Coreidae, SOUZA et al., 2007a) sete lobos.

As espécies aquáticas analisadas no presente trabalho apresentaram morfologia do testículo diferente dos terrestres, ou seja arredondada na região distal e alongada na região proximal para a família Belostomatidae, alongados e espiralados na extremidade distal para Gelastocoridae, alongado/espiralado ou arredondado para Notonectidae e arredondado para Veliidae e Gerridae. O número de lobos foi de um único, dois ou cinco, indicando que nas espécies aquáticas a morfologia mais comum dos testículos seja a arredondada com os lobos dispostos lado a lado. Contudo, a análise

de um maior número de espécies e famílias será de extrema importância para o entendimento desta característica.

Os Heteroptera possuem cromossomos holocêntricos (UESHIMA, 1979; SOUZA et al., 2007a; COSTA et al., 2008; CASTANHOLE et al., 2010), no leptóteno-zigóteno o cromossomo X é heteropicnótico e localiza-se na periferia do núcleo; no zigóteno e paquíteno, os cromossomos estão emaranhados. No final da diacinese o cromossomo X torna-se isopicnótico (BRESSA et al., 2002). As espécies analisadas no presente trabalho, também apresentaram estas características, mostrando que isto deva ser um padrão para os Heteroptera. Mas segundo a literatura, nem sempre o cromossomo sexual é o que se apresenta heteropicnótico, pois foram observados em *Belastoma dentatum* autossomos bivalentes em condensação contínua, enquanto ambos os cromossomos sexuais estavam descondensados e negativamente heteropicnóticos durante a diacinese (PAPESCHI; BIDAÚ, 1985).

As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram, durante a prófase I, quiasmas terminais ou intersticiais, simples ou duplos, características já observadas em Coreidae (SOUZA et al., 2007a). Portanto, esta característica deve ser comum para a maioria das espécies.

O comportamento dos autossomos, durante a metáfase, nas espécies analisadas, sempre foi o de formar um anel. A disposição dos demais cromossomos (X, Y e m-cromossomos) é que variou: se a espécie só possuía o sistema cromossômico do sexo X0, o X estava fora do anel semelhante a outras espécies de Coreidae descritas na literatura (SOUZA et al., 2007a); quando o sistema era o X0 com m-cromossomos, na maioria das vezes, o X estava fora do anel, e os m-cromossomos estavam no centro do anel, assim como os observados em espécies de Coreidae (SOUZA et al., 2007a).

Quando o sistema era XY ou $X_1X_2X_3X_4Y$, o cromossomo X estava dentro do anel e o Y estava junto com os autossomos formando o anel, diferentemente de outras espécies descritas, como por exemplo em Pentatomidae, que os dois cromossomos sexuais estavam dentro do anel formado pelos autossomos (SOUZA et al., 2008), sendo semelhante ao sistema X_1X_2Y em que os cromossomos sexuais estavam dentro do anel.

Com relação ao número de autossomos, em Heteroptera ele varia de quatro (Belostomatidae) a 80 (Miridae), mas estes números não são típicos para a subordem (UESHIMA, 1979). É difícil dizer qual é o número cromossômico modal para a subordem inteira, pois todas as oito infraordens maiores dentro dos Heteroptera

não foram estudadas citologicamente na mesma extensão (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Na literatura, discute-se que a origem dos complementos cromossômicos constituídos de maior número de cromossomos, seja a partir do menor número por duplicação ou fragmentação de um dos pares de autossomos (UESHIMA; ASHLOCK, 1980).

Segundo Jacobs (2004), pelo fato dos Heteroptera apresentarem cromossomos holocêntricos, a fragmentação é o processo mais provável, porque origina segmentos que podem migrar regularmente para os polos durante a anáfase e perdurar por muitas gerações celulares. Da mesma maneira, a fusão cromossômica é também teoricamente mais fácil em organismos com cromossomos holocêntricos, segundo o mesmo autor.

Seguindo esse raciocínio, e considerando a variação observada nas espécies analisadas, para as espécies da família Belostomatidae temos *B. micantulum* com $2n=16$ e *B. anurum* com $2n=29$, para a família Gelastocoridae temos *G. angulatus* com $2n=16$ e *G. f. flavus* com $2n=35$ e para a família Notonectidae temos as espécies *B. amnigenus*, *B. unguis* e *M. membranacea* com $2n=25$ e as espécies *M. brasiliensis* e *M. uruguayensis* com $2n=27$, possivelmente as espécies com maior número de cromossomos devem ter se originado de uma espécie com menor número por fragmentação de autossomos e/ou cromossomos sexuais.

As informações sobre a evolução destes cromossomos na literatura são escassas, pois devido à falta de um centrômero morfológicamente diferenciado e a falta de diferenciação cromossômica longitudinal há dificuldade de detectar a variação estrutural. Por estas razões os rearranjos cromossômicos, tais como inversões e translocações recíprocas são raramente relatadas nesses organismos dificultando as conclusões. Portanto, um maior número de espécies deverão ser avaliadas, assim como outras técnicas deverão ser utilizadas para melhor compreensão deste grupo tão pouco estudado e com muitas características, ainda, a serem elucidadas, como por exemplo, qual a família, número de lobos ou sistema cromossômico do sexo ancestral.

Com relação à área das células em prófase I, as análises foram feitas, a partir de um representante de cada família. A espécie *G. f. flavus* que é uma espécie semi-aquática, que vive tanto em ambiente aquático quanto terrestre foi a que apresentou maior divergência na área das células, mas não podemos afirmar que o ambiente esteja influenciando o tamanho das células, pois *B. micantulum* que também é semi-aquática mostrou uma área de células em prófase I semelhante ao de *R. zela* que é

uma espécie que vive na superfície d'água. Já a espécie *R. c. crassifemur* que também vive na superfície, apresentou média semelhante à *M. brasiliensis* que é uma espécie subaquática. Provavelmente o ambiente não esteja interferindo na área das células, sendo necessários mais estudos para confirmação. Esta é uma questão interessante do ponto de vista evolutivo, que deve ser analisada com novas abordagens.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliografia

BRESSA, M.J.; FUMAGALLI, E.; ITUARTE, S.; FRASSA, M.V.; LARRAMENDY, M.L. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence on variations of the diffuse stage between wild and laboratory-inbred populations of *Dysdercus chaquency* Freiberg, 1948. **Hereditas**, v. 137, p. 125-131, 2002.

CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1398-1407, 2008.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M.. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1343-1356, 2010.

CHICKERING, A.M. AND BACORN, B. Spermatogenesis in the Belatomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus*. **Michigan Academy of Science, Arts, & Letters**, 17: 529-534, 1933.

COBBEN, R.H. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I. Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. **Centre for Agricultural Publishing and documentation**, Wageningen, 475 p, 1968.

COSTA, L.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. de; TARTAROTTI, E. Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 438-444, 2008.

GROZEVA, S.M.; KUZNETSOVA, V.G. The reproductive system of the some primitive families of pentatomomorphan bugs (Heteroptera). In: **Advances in regulation of insect reproduction (Bennettova B, Gelbic I and Soldan T, eds.)** Institute of Entomology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 97-102, 1992.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosomes and their behaviour in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). **Hereditas**, v. 125, p. 31-36, 1996.

JACOBS, D.H. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae: Carventinae). **Chromosome Research**, v. 12, p. 175-191, 2004.

JANDE, S.S. An analysis of the chromosomes in four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocera). **Research bulletin of the Panjab University. Science**. 10: 25-34, 1959.

MANNA, G.K. Chromosomes in Evolution in Heteroptera. In: **Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups (Sharma Ak, ed.)**. CRC Press, Boca Raton, 189-225, 1984.

PAPESCHI, A.G.; BIDAU, C.J. Chromosome complement and male meiosis in four species of Belostoma Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). **Revista Brasileira de Genética**. VIII: 249-261, 1985.

PAPESCHI, A. G.; BRESSA M. J.; Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of Biological Research** 5: 3 – 21, 2006

POISSON, R. Nouvelles observations sur le processus espermatogénétique dans les éléments sexuels d' Hemipteres aquatiques. **Archives the Zoologie Experimentale et Generale**, v.78, p. 133-194, 1936.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of Rhytidolomia senilis Say (Hemiptera, Heteroptera). **Journal of Morphology**. 67: 123-141, 1940.

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.

SOUZA, H. V. ; ARAKAKI, R. L. M. ; DIAS, L. N. ; LIMA, A. S. M. ; COSTA, L. A. A. ; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M.. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family. **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007a.

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

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M. M.. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of Nysius californicus (Heteroptera:Lygaeidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 33-40, 2007c.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M.. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and

nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of some Pentatomidae (Heteroptera). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 686-691, 2008.

SOUZA, H.V.; SOUZA, F.B.; MARUYAMA, S.R.C. ; CASTANHOLE, M.M.U. ; ITOYAMA, M.M. Meiosis, spermatogenesis and nucleolar behavior in the seminiferous tubules of Alydidae, Coreidae and Rhopalidae (Heteroptera) species. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1383-1396, 2009.

UESHIMA, N. Hemiptera II: Heteroptera. In: **Animal Cytogenetics. Vol. 3. Insecta**, 6. Gebruder Borntraeger, Berlin, 1-117, 1979

UESHIMA, N and ASHLOCK, P.D. Cytotaxonomy of the Lygaeidae (Heteroptera). Univ. Kans. Sci. Bull. v. 51, p. 717-801, 1980

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

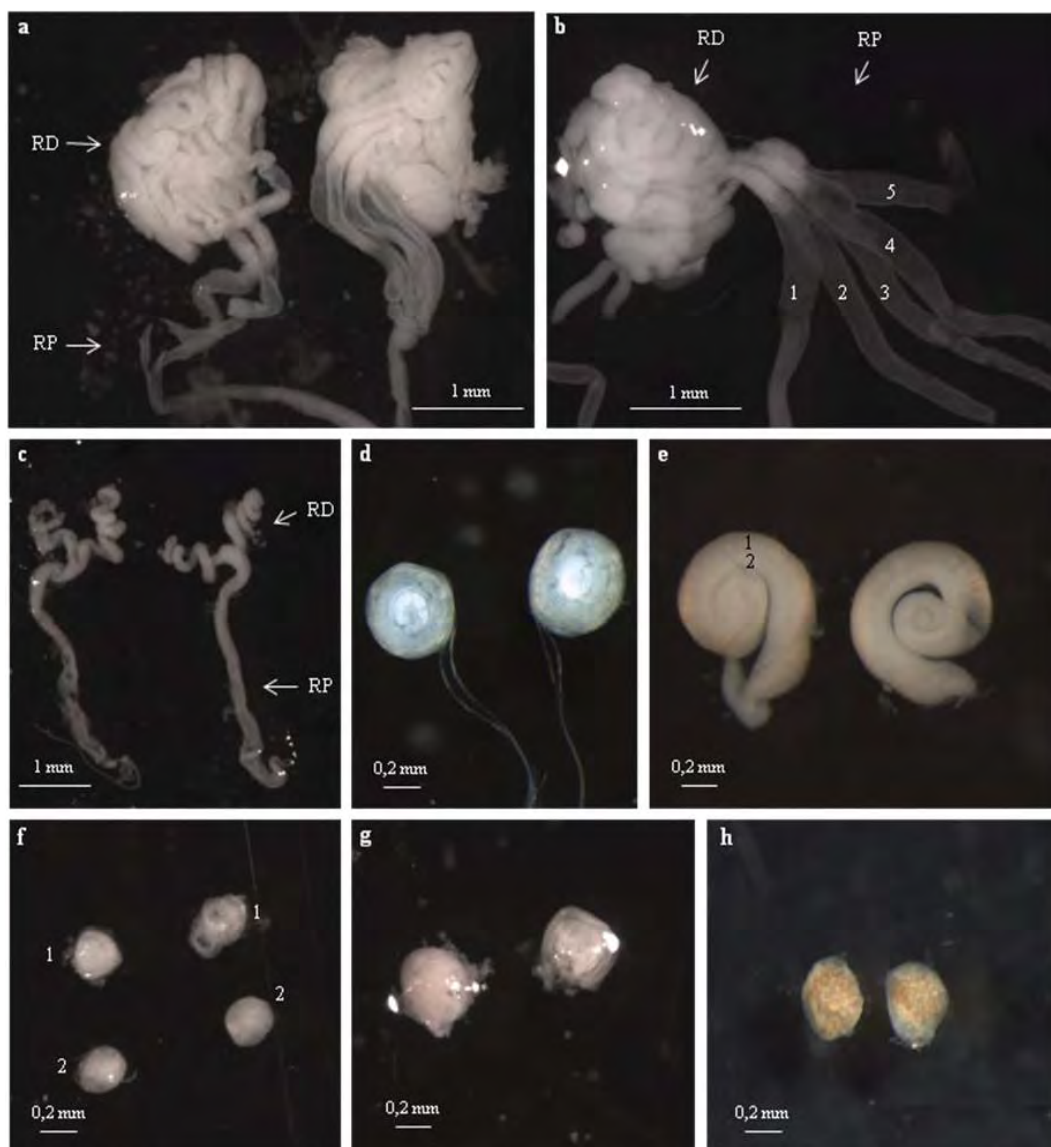


Figura 1. Testículos de *Belostoma anurum* (a) e *Belostoma micantulum* (b) apresentando região distal (RD) arredondada e região proximal (RP) alongada. Observar em b os cinco lobos testiculares; em c testículos de *Gelastocoris flavus flavus* mostrando que são alongados com extremidade distal espiralada e constituídos de dois lobos; em d testículos de *Buena unguis* caracterizados por serem arredondados e altamente espiralados; em e de *Martarega membranacea* formados por dois lobos alongados e espiralados; em f de *Rheumatobates crassifemur crassifemur*, em g de *Rhagovelia tenuipes* e em h de *Rhagovelia zela* mostrando que são arredondados e formados por dois (f) ou um único lobo (g,h). Barras: 0,2 mm e 1 mm

Tabela 1. Características dos testículos das 12 espécies analisadas.

Família	Espécie	Morfologia dos Testículos	Morfologia dos Lobos	Nº. Lobos
Belostomatidae	<i>Belostoma anurum</i>	Arredondados na região distal e alongados na região proximal	Enovelados na região distal e alongados na região proximal	5
	<i>Belostoma micantulum</i>	Arredondados na região distal e alongados na região proximal	Enovelados na região distal e alongados na região proximal	5
Gelastocoridae	<i>Gelastocoris angulatus</i>	Alongados e espiralados na extremidade distal	Alongados com os lobos espiralados individualmente	2
	<i>Gelastocoris flavus flavus</i>	Alongados e espiralados na extremidade distal	Alongados com os lobos espiralados individualmente	2
Gerridae	<i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i>	Arredondados	Arredondados	2
Notonectidae	<i>Buenoa amnigenus</i>	Arredondados	Altamente espiralados	1
	<i>Buenoa unguis</i>	Arredondados	Altamente espiralados	1
	<i>Martarega brasiliensis</i>	Alongados/espiralados	Espiralados	2
	<i>Martarega membranacea</i>	Alongados/espiralados	Espiralados	2
	<i>Martarega uruguayensis</i>	Alongados/espiralados	Espiralados	2
Veliidae	<i>Rhagovelia tenuipes</i>	Arredondados	Arredondados	1
	<i>Rhagovelia zela</i>	Arredondados	Arredondados	1

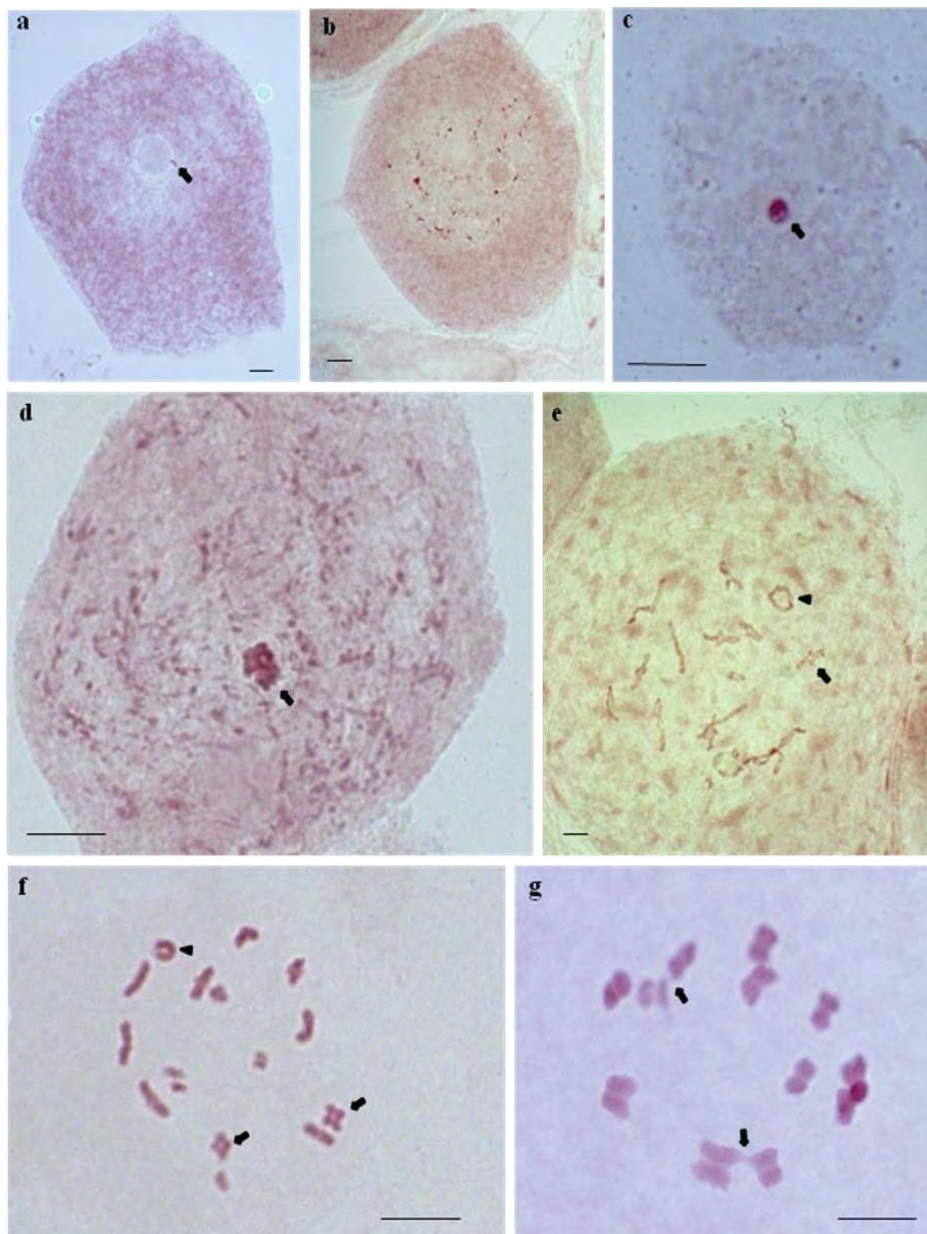


Figura 2. Células dos túbulos seminíferos de *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (a), *Gelastocoris flavus flavus* (b,e), *Belostoma micantulum* (c), *Martarega brasiliensis* (d), *Belostoma anurum* (f), *Martarega uruguayensis* (g) coradas com orceína lacto-acética. a) Prófase I com um pequeno corpúsculo heteropicnótico próximo ao nucléolo (seta); b) prófase I com vários corpúsculos heteropicnóticos pequenos; c) prófase I com corpúsculo heteropicnótico evidente (seta); d) prófase I com corpúsculo heteropicnótico grande, arredondado e sem morfologia definida (seta); e-f) diplóteno/diacinese com quiasmas intersticiais que conferem ao cromossomo morfologia em forma de cruz (setas) ou quiasmas duplo terminais, conferindo aos cromossomos a morfologia arredondada (cabeças de seta); g) diplóteno/diacinese com associações teloméricas entre os autossomos (setas). Barras: 10 μ m

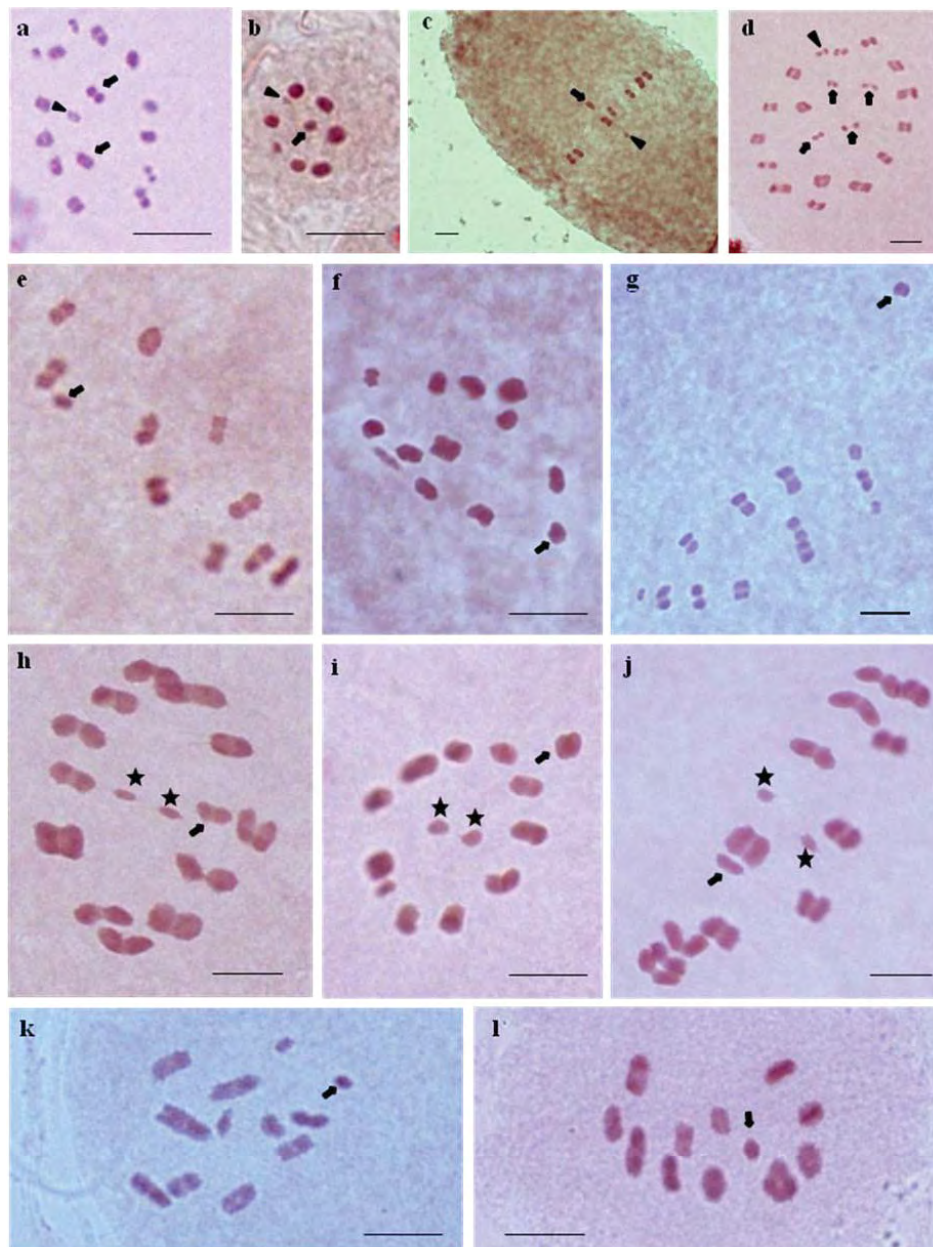


Figura 3. Células dos túbulos seminíferos, em metáfase I, coradas com orceína lacto-acética, mostrando os complementos cromossômicos de: **a)** *Belostoma anurum*, $2n= 29$ ($26A+X_1X_2Y$); **b)** *Belostoma micantulum* $2n= 16$ ($14A+XY$); **c)** *Gelastocoris angulatus* $2n= 16$ ($14A+XY$); **d)** *Gelastocoris flavus flavus* $2n= 35$ ($30A+X_1X_2X_3X_4Y$); **e)** *Rheumatobates crassifemur crassifemur* $2n= 21(20A+X0)$; **f)** *Buenoa amnigenus* $2n= 25$ ($24A+X0$); **g)** *Buenoa unguis* $2n= 25$ ($24A+X0$); **h)** *Martarega brasiliensis* $2n= 27$ ($24A+2m+X0$); **i)** *Martarega membranacea* $2n= 25$ ($22A+2m+X0$); **j)** *Martarega uruguayensis* $2n= 27$ ($24A+2m+X0$); **k)** *Rhagovelia tenuipes* $2n= 23$ ($22A+X0$); **l)** *Rhagovelia zela* $2n= 23$ ($22A+X0$). Setas (cromossomos X), cabeças de setas (cromossomos Y) e asteriscos (m-cromossomos). Barras: 10 μm

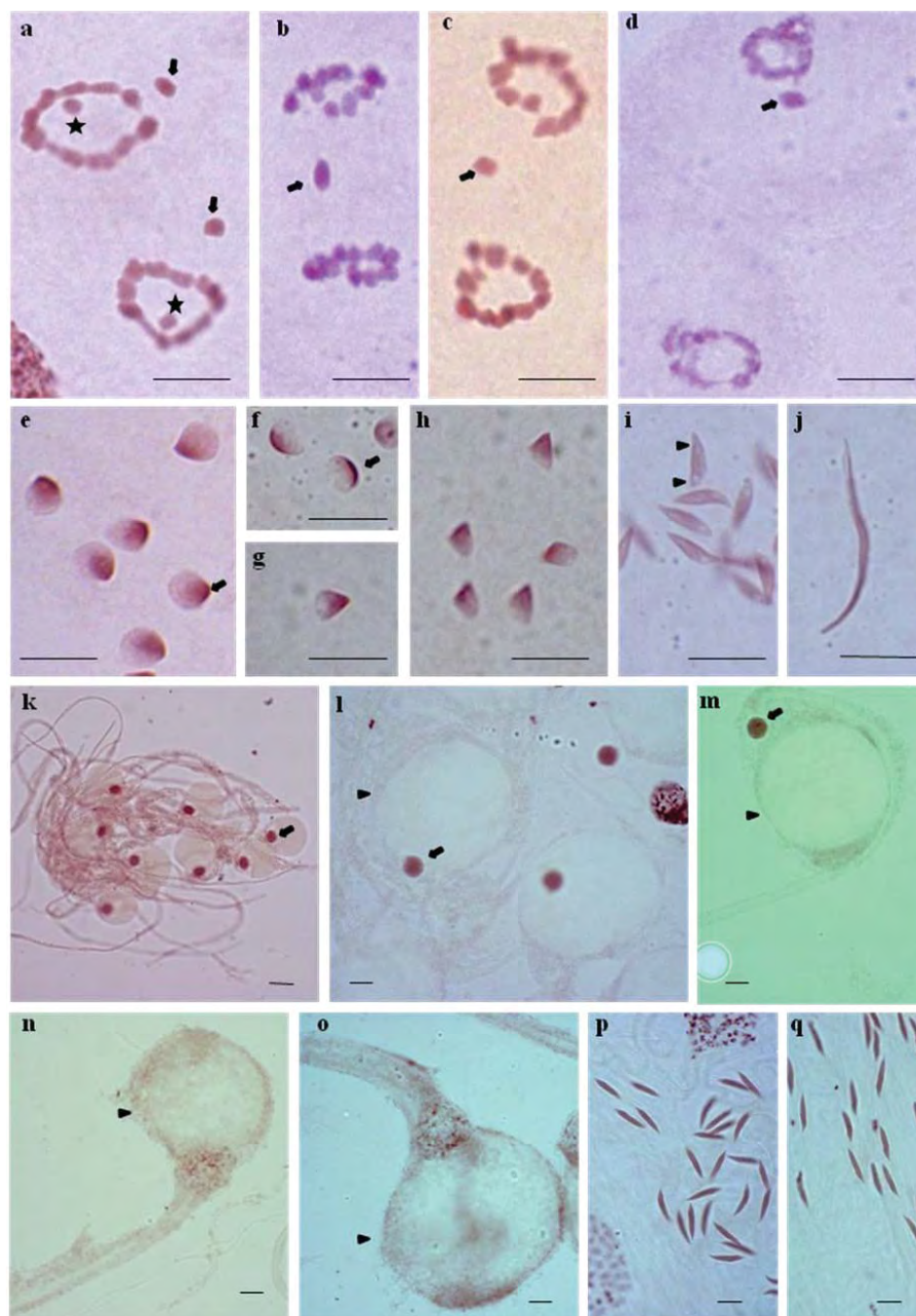


Figura 4. Células dos túbulos seminíferos de: *Martarega membranacea* (a,c); *Martarega brasiliensis* (b,d); *Belostoma anurum* (e); *Belostoma micantulum* (f-j); *Gelastocoris flavus flavus* (k,n,o); *Gelastocoris angulatus* (l,m,p,q) coradas com orceína lacto-acética. a) anáfase I/telófase I com migração tardia dos cromossomos sexuais X (setas) e os m-cromossomos no centro do anel (asteriscos); b,c) anáfase II/telófase II com migração tardia do cromossomo X (setas); d) telófase II com o cromossomo X em apenas uma das células (seta); e,f) espermatídes arredondadas com o material heteropicnótico em apenas um dos lados da espermatíde (setas); g,h) espermatídes em forma de gota d'água; i) espermatídes elípticas com vesículas pequenas (cabeças de seta); j) espermatíde em fase final de alongamento; k-m) espermatídes arredondadas com material heteropicnótico evidente (setas) e uma vesícula grande (cabeças de seta); n,o) espermatídes em alongamento com uma vesícula grande na região anterior (cabeças de seta); p,q) espermatídes elípticas. Barras: 10 μm

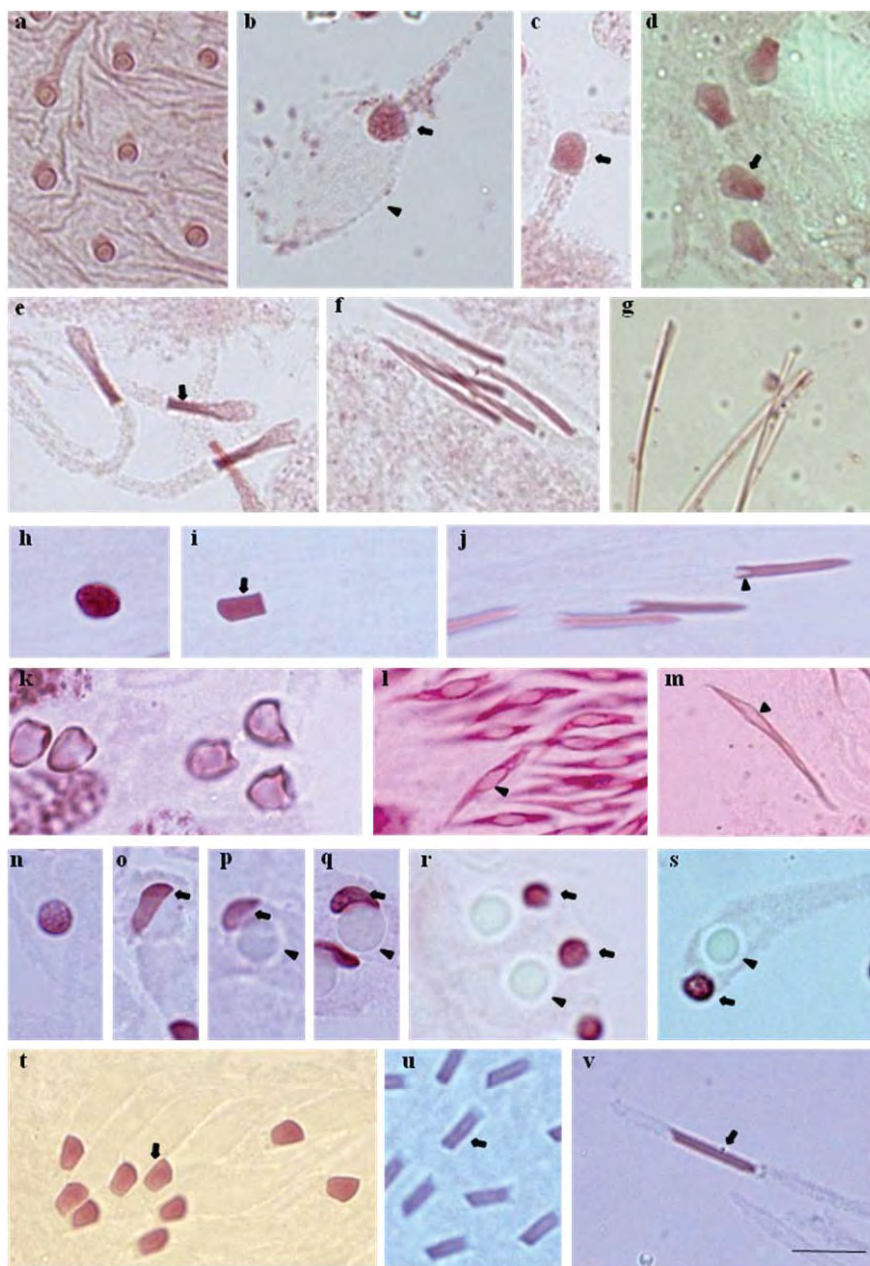


Figura 5. Células dos túbulos seminíferos de: *Rheumatobates crassifemur crassifemur* (a-g); *Martarega uruguayensis* (h-j); *Buenoa unguis* (k-m); *Rhagovelia zela* (n,o,p,q,t,v); *Rhagovelia tenuipes* (r,s,u) coradas com orceína lacto-acética. a) espermátides arredondadas; b) espermátide em alongamento com material heteropolar na região posterior (seta) e uma vesícula grande na região anterior (cabeça de seta); c-e) espermátides em alongamento com material heteropolar em forma de bastão (setas); f,g) espermátides em alongamento; h) espermátide arredondada; i) espermátide em alongamento com material heteropolar em forma de bastão (seta); j) espermátides em alongamento com a região posterior da cauda em forma de v (cabeça de seta); k) espermátides com morfologia irregular e material heteropolar distribuído na periferia; l,m) espermátides em alongamento com uma vesícula pequena no seu interior (cabeças de seta); n) espermátide arredondada; o-q) espermátides arredondadas com material heteropolar em forma de foice (setas) e vesícula pequena (cabeças de seta); r,s) espermátides em alongamento com material heteropolar na região anterior (setas) e vesícula na região posterior (cabeças de seta); t-v) espermátides em alongamento com material heteropolar em forma de bastão (setas). Barra: 10 μ m

Tabela 2. Complemento cromossômico das 12 espécies analisadas.

Família	Espécie	2n
Belostomatidae	<i>Belostoma anurum</i>	29 (26A+X ₁ X ₂ Y)
	<i>Belostoma micantulum</i>	16 (14A+XY)
Gelastocoridae	<i>Gelastocoris angulatus</i>	16 (14+XY)
	<i>Gelastocoris flavus flavus</i>	35 (30A+X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ Y)
Gerridae	<i>Rheumatobates crassifemur crassifemur</i>	21 (20A+X0)
Notonectidae	<i>Buenoa amnigenus</i>	25 (24A+X0)
	<i>Buenoa unguis</i>	25 (24A+X0)
	<i>Martarega brasiliensis</i>	27 (24A+2m+X0)
	<i>Martarega membranacea</i>	25 (22A+2m+X0)
	<i>Martarega uruguayensis</i>	27 (24A+2m+X0)
Veliidae	<i>Rhagovelia tenuipes</i>	23 (22A+X0)
	<i>Rhagovelia zela</i>	23 (22A+X0)

Tabela 3. Número de células em prófase I observadas dentro de cada intervalo de área das cinco espécies de Heteroptera que foram utilizadas para análise morfométrica.

	<i>B. micantulum</i>	<i>G. f. flavus</i>	<i>R. c. crassifemur</i>	<i>M. brasiliensis</i>	<i>R. zela</i>
Intervalo de área (μm^2)					
200 a 300	9				3
300 a 500	34				15
500 a 700	5				23
700 a 2000	2		16		9
2000 a 4000		1	15	37	
4000 a 6000		10	9	13	
6000 a 10000		22	9		
10000 a 30000		17	1		

Tabela 4. Médias e Desvio padrão obtidos a partir das análises morfológicas de 50 células em prófase I das cinco espécies de Heteroptera aquáticos.

Espécie	N	Média(μm^2)	Desvio Padrão
<i>B. micantulum</i>	50	396	126
<i>G. f. flavus</i>	50	10641	6333
<i>R. c. crassifemur</i>	50	3800	2427
<i>M. brasiliensis</i>	50	3651	483
<i>R. zela</i>	50	596	275

Figura 6. Agrupamento das espécies com relação ao tamanho das células em prófase I, segundo o teste Anova do programa Minitab® (áreas em μm^2).

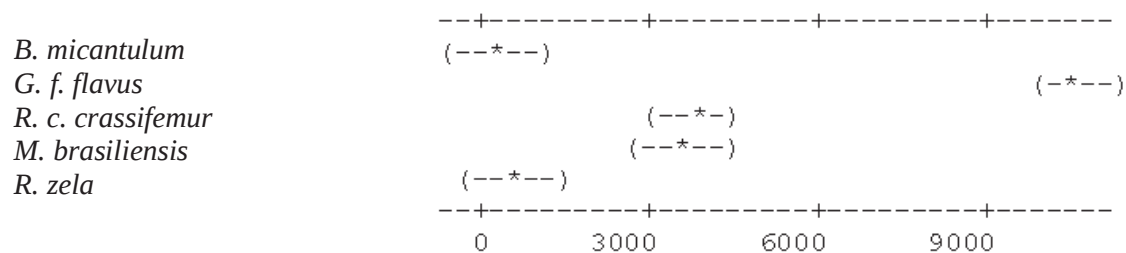
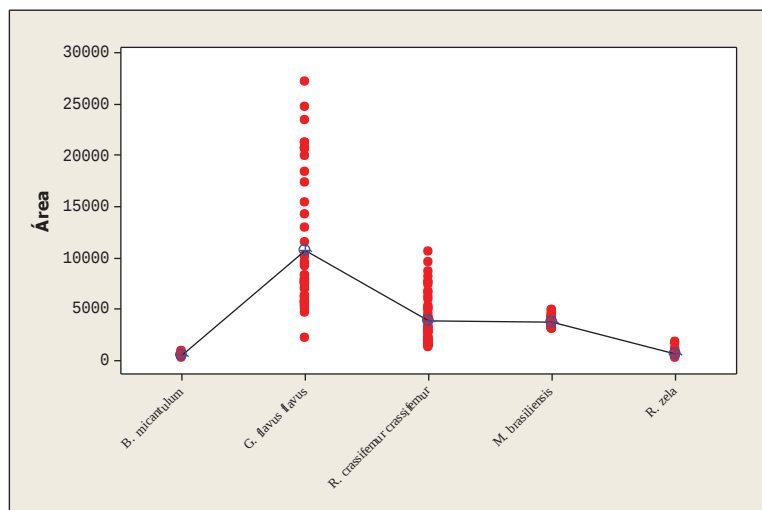


Figura 7. Gráfico da distribuição das áreas celulares em prófase I das cinco espécies de Heteroptera analisadas (áreas em μm^2).



Ultraestrutura da espermatogênese de *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* (Heteroptera)

Pereira, LLV¹; Taboga, SR¹; Castanhole, MMU¹; Moreira, FFF²; Barbosa, JF²; Itoyama, MM¹.

¹UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP, Brasil;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

A análise ultraestrutural observadas durante a espermatogênese de *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* mostrou a presença de várias mitocôndrias pequenas e uniformemente distribuídas pelo citoplasma em células em profase I, em ambas espécies, que foram se unindo formando estruturas maiores e em menor número que foram se direcionando para apenas uma região da célula, formando o complexo mitocondrial que possui no seu interior as mitocôndrias enoveladas. Posteriormente, este complexo mitocondrial se divide em duas estruturas denominadas derivados mitocondriais, que se dispõem bilateralmente ao axonema. O axonema dessas espécies possui o padrão de 9+9+2. A formação do acrossomo inicia-se nos primeiros estágios da espermiogênese sendo composto de muitas vesículas acrossomais que se unem formando uma única estrutura, sendo observadas regiões e algumas estruturas mais coradas em seu interior. Basicamente, o processo de espermiogênese não difere entre as duas espécies analisadas.

Palavras Chave: Acrossomo, derivado mitocondrial, axonema, nucléolo.

Introdução

Nos vertebrados e invertebrados, os trabalhos abordando aspectos ultraestruturais da espermatogênese e, especificamente, a estrutura do espermatozoide perfazem uma literatura vasta e sempre crescente. Em insetos, o estudo de aspectos ultraestruturais da espermiogênese e do espermatozoide iniciaram na década de 70, praticamente desde a otimização dos métodos de microscopia eletrônica para material biológico (PHILIPS, 1970; BACCETTI, 1972; MESSIAS JR., 1990), mas em Heteroptera os trabalhos ainda são escassos. Algumas são as ultraestruturas descritas na literatura durante a espermatogênese, como por exemplo, o acrossomo, axonema, mitocôndrias e corpo cromatóide.

Na maioria das espécies o acrossomo (Ac) é uma organela fundamental para fecundação (PHILLIPS, 1970). Além da fecundação, o acrossomo também está relacionado com a capacitação do espermatozoide onde suas enzimas podem funcionar para remover o mecanismo de proteção na superfície do espermatozoide e/ou na digestão de barreiras para a migração do espermatozoide dentro do trato reprodutor da fêmea (FAWCETT; ITO, 1965), sendo sua origem a partir do complexo de Golgi (YASUZUMI, 1974; BÃO et al., 1989).

O estudo da organização estrutural do axonema (Ax) recebeu valiosas contribuições provenientes das inúmeras observações realizadas no flagelo do espermatozoide de *Drosophila* (PEROTTI, 1969; KIEFER, 1970; DALLAI; AFZELIUS, 1991). Na maioria dos insetos o padrão organizacional do axonema segue o esquema 9+9+2, que é o arranjo usual de 9+2 microtúbulos circundados por nove microtúbulos acessórios adicionais (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; BACCETTI, 1972). Em alguns mosquitos é comum o esquema 9+9+1, enquanto em efeméridas predomina o esquema 9+9+0 (PHILLIPS, 1970). Existem ainda esquemas que são considerados aberrantes, como por exemplo, em dípteros cecidomídeos em que o esquema é 13+0 (BACCETTI; DALLAI, 1976).

Outra ultraestrutura bastante analisada durante a espermatogênese são as mitocôndrias. Durante a espermatogênese assumem diferentes morfologias. Em insetos, a regularidade nas formas da mitocôndria é particularmente notável (PHILLIPS, 1970). No decorrer da espermatogênese as

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

Durante o processo de diferenciação os derivados mitocondriais são preenchidos ao longo de sua extensão por uma estrutura de natureza proteica, organizada num padrão paracristalino, e muitas espécies de insetos acumulam estas estruturas nas mitocôndrias durante a espermiogênese (PHILLIPS, 1970; WARNER, 1971; ROSATI et al., 1976; BÁO et al., 1992). Esta estrutura paracristalina também é conhecida como cristalóide e é formado por uma proteína rica em prolina, que foi designada de cristalomitina (BACCETTI et al., 1977). Em Heteroptera (famílias Pentatomidae, Reduviidae e Gerridae) foi evidenciado a presença de dois ou três corpos cristalinos no interior dos derivados mitocondriais (ARAUJO, 2011).

Várias são as funções sugeridas aos derivados mitocondriais dos espermatozoides de insetos, podendo participar no controle e regulação da forma do movimento flagelar e estando relacionados com o processo de estocagem e liberação de energia necessária para a motilidade flagelar (PHILLIPS, 1974; YASUZUMI, 1974; TOKUYASU, 1975). No entanto, Perotti (1973) contraria esta última afirmação, relacionando os derivados mitocondriais a uma herança citoplasmática paterna e supondo que o material armazenado nos Dm podem estar envolvidos na ativação e nutrição do ovócito após a fertilização.

Além das estruturas mencionadas anteriormente, as células germinativas possuem em seu citoplasma o acúmulo de um material denominado corpo cromatóide (CB) ou “nuage” (PARVINEN, 2005). O CB é considerado um complexo macromolecular que, provavelmente, desempenha um papel de coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células

germinativas masculinas haploides e, também, funciona como um centro de determinação dos destinos de RNAm (PARVINEN, 2005; KOTAJA et al., 2006; KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007).

Alguns autores acreditam que o CB origina-se a partir de um material existente entre aglomerados de mitocôndrias, presente no citoplasma das células germinativas (FAWCETT et al., 1970). No entanto, trabalhos mais recentes defendem a origem a partir da fragmentação do material nucleolar, durante o processo de espermatogênese, podendo estar relacionado com a formação do corpo cromatóide (COMINGS; OKADA, 1972; ANDERSON, 1978; ANDONOV, 1990; PERUQUETTI et al., 2008a,b; PERUQUETTI, 2011).

Uma estrutura que vem sendo estudada é o nucléolo e outras estruturas que são impregnadas pelos íons prata. O tamanho do nucléolo está relacionado com a atividade biossintética da célula, portanto, o tamanho e o número de nucléolos e corpos pré-nucleolares dependem das características funcionais das células e podem refletir, então, em diferenças metabólicas e funcionais (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; SOUZA et al., 2007a,b; CASTANHOLE et al., 2008; CASTANHOLE et al., 2010).

Na maioria das espécies de artrópodos, os nucléolos dissociam-se no diplóteno ou diacinese. Portanto, os corpúsculos impregnados pela técnica Ag-NOR, específica para proteínas associadas ao RNAr, não são visíveis da metáfase à telófase I. Essas marcações vão reaparecer no início da formação das espermátides, indicando o reinício das funções transcricionais de RNA ribossomal e, finalmente, desaparecem no final da formação das espermátides (BRESSA et al., 2003). Entretanto, a literatura relata algumas exceções como por exemplo em *Asellus aquaticus* (isopoda), corpúsculos Ag-NOR foram visualizados durante todo o processo de espermatogênese (DI CASTRO et al., 1983), em *Callicrania seoanei* (Orthoptera), as Ag-NORs foram observadas da intercinese até a pró-metáfase II (SANTOS et al., 1987) e em *Triatoma infestans* e *T. sordida* (Heteroptera, Reduviidae), as marcações Ag-NORs estavam presentes até a metáfase I (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997). Finalmente em *Carlisis wahlbergi* (Heteroptera, Coreidae) a semi-persistência nucleolar (presença de corpúsculos nucleolares durante as metáfases) foi observada até a metáfase II (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995), enquanto em *Acanthocoris sordidus*

(Heteroptera, Coreidae) e *Coptosoma punctissimum* (Heteroptera, Plataspidae), os nucléolos foram detectados nas placas metafásicas de espermátocitos primários e secundários (YOSHIDA, 1947).

Com o objetivo de ampliarmos as informações relacionadas às ultraestruturas da espermatogênese de Heteroptera, analisamos as espécies *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis*.

Material e Métodos

Testículos de espécimes machos de *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* foram extraídos e imediatamente fixados em solução de Karnovsky de 3 a 48 horas. Foram submetidos a duas lavagens em tampão Millonig em seguida foi efetuada a 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 atingindo 100% de concentração. Foi feita a pré-infiltração em araldite:acetona (1:1) *overnight* em temperatura ambiente. Posteriormente fez-se a infiltração em araldite por 2 horas a 37°C, em seguida foi feita a inclusão do material em araldite por 48 horas a 60°C. Foram obtidos cortes semifinos e ultra-finos, em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Os cortes semifinos foram submetidos a coloração com azul de toluidina pH4,0 (MELLO; VIDAL, 1980) ou Impregnação por íons prata (AgNOR) (HOWELL; BLACK, 1980, com alterações); os cortes ultra-finos foram coletados em *grids* e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e, depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1N, por 6 minutos (VENABLE; COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas no microscópio eletrônico de transmissão CM100 da Philips do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu UNESP – IBB Campus Botucatu.

Resultados

Gelastocoris flavus flavus

As imagens obtidas dos cortes semifinos e ultramicrografias mostraram que na prófase I podemos observar vários corpos cromatóides (CB) arredondados, de diferentes tamanhos (Figuras 1a e 2a,b), localizados próximos aos complexos de poros do envoltório nuclear (Figura 2d,e). Além do CB podemos observar várias mitocôndrias pequenas e dispersas uniformemente pelo citoplasma (Figuras 1a e 2a-c). Essas mitocôndrias começam a se unir formando estruturas maiores (Figura 1c) e se deslocam para apenas um dos lados da célula (Figuras 1c-e e 2c) formando o complexo mitocondrial (CM). O CM, inicialmente, é uma estrutura única, arredondada e no seu interior as mitocôndrias estão enoveladas (Figuras 1h,i). Durante o alongamento das espermátides os CM se dividem em dois formando os derivados mitocondriais (DM) que inicialmente estão muito próximos e dispostos bilateralmente ao axonema (Ax) (Figuras 1l, 2f,g). Em uma fase posterior os DM estão separados e entre eles está o Ax (Figuras 1n-p e 2 f-i). No final do processo os DM envolvem totalmente o Ax (Figura 2j). Pode-se observar, ainda, no interior dos DM a presença de estruturas paracristalinas ou cristaloides (Figura 2f,g). Na Figura 2k observamos elementos supranumerários, isto é, presença de quatro Ax e dois pares de derivados mitocondriais em uma mesma cauda.

Outra estrutura observada no núcleo da célula em prófase I foi o nucléolo (Figura 2a,b) que apresenta-se arredondado e mais eletrodensso que as outras estruturas e com regiões menos eletrodensas em seu interior. Na Figura 3a-b observamos, também, uma célula em Prófase I com várias marcações prata positivas, pequenas, arredondadas e dispersas pelo citoplasma.

A formação do acrossomo inicia-se nos primeiros estágios da espermiogênese com a presença de muitas vesículas acrossomais, fortemente coradas e de diferentes tamanhos (Figura 1f,g) que começam a se unir formando uma única estrutura arredondada e fortemente corada (Figura 1h,k).

Em células impregnadas por íons prata, observamos também estruturas arredondadas, de diferentes tamanhos e fortemente impregnadas que

vão se unindo formando uma única estrutura, também, arredondada e localizada próximo ao CM denominada de vesícula acrossomal (Figura 3c-h). Verificamos, ainda nos cortes impregnados pela prata, que no interior da vesícula acrossomal há uma região mais impregnada (Figura 3h-m). Nas Figuras 1q,r e 3n,o observamos o núcleo e o acrossomo. Em azul de toluidina (AT) observamos que o interior do acrossomo apresenta filamentos que se apresentam intensamente corados e com morfologia irregular (Figura 1m,r).

Com relação ao padrão organizacional do axonema foi possível verificar em microscopia eletrônica de transmissão o padrão 9+9+2 (Figura 2j).

Na Figura 1s-v é possível observar cistos contendo espermatozóides em diferentes estágios de desenvolvimento.

Martarega uruguayensis

Células testiculares coradas com azul de toluidina evidenciaram Profase I com presença de várias mitocôndrias pequenas, distribuídas homogeneamente pelo citoplasma, e um nucléolo grande, arredondado e intensamente corado (Figura 4a). Essas mesmas estruturas foram observadas nas imagens de eletromicrografias, mostrando que o nucléolo é mais eletrodenso do que as outras estruturas (Figura 5a). Na Figura 5b podemos observar as mitocôndrias em maiores detalhes.

Com o desenvolvimento da espermatogênese as mitocôndrias começam a se agrupar diminuindo em quantidade e aumentando em relação ao tamanho (Figuras 4b,c e 5a,b). Uma outra característica é que as mitocôndrias começam a se concentrar em apenas um dos lados da célula (Figura 4c). Em seguida, as mitocôndrias se unem formando um único CM (Figura 4d-h). O CM se divide em dois DM (Figura 5d) e esses DM ficam em lados opostos em relação ao Ax que posteriormente vão aumentando de tamanho e abraçando o Ax (Figura 5e) até que ambos se encontram (Figura 5f). Os DM de *M. uruguayensis* apresentaram-se com morfologias diferentes (Figura 5f). Nas eletromicrografias podemos, ainda, observar o padrão de 9+9+2 para o Ax (Figura 5d, destaque).

Observou-se nas lâminas impregnadas por íons prata que a formação do acrossomo inicia-se na prófase I, com várias vesículas arredondadas

e fortemente impregnadas distribuídas uniformemente pelo citoplasma (Figura 6a,b). Podendo além das vesículas acrossomais, em algumas células, observar o nucléolo arredondado e fortemente corado (Figura 6b). No início da espermiogênese a quantidade de vesículas acrossomais são menores, mas maiores em relação ao tamanho (Figuras 4d,e e 6c), quando comparados na fase de prófase I (Figuras 4a,b e 6a,b).

Podemos verificar que no início da espermiogênese estas vesículas acrossomais estão ao redor do CM (Figura 4d,e). Com o desenvolvimento, estas vesículas se unem, podendo-se observar esta união na Figura 6 d-h. No final do processo há a formação de uma única estrutura arredondada e fortemente corada (Figuras 4f,g e 6i) que está localizada ao lado do CM (Figura 4f,g) e com o desenvolvimento passa a se localizar na região anterior da espermátide (Figura 4h,i) estando posteriormente localizado o núcleo e o CM (Figuras 4j e 6l,m).

Podemos observar nos materiais corados com AT uma região mais fortemente corada no acrossomo (Figura 4f). Com impregnação por íons prata evidencia-se também, uma região mais corada nesta estrutura (Figura 6j,k) que é observada até no final do alongamento (Figura 6n). Podemos observar, ainda, que os acrossomos apresentam duas vesículas sendo uma mais impregnada (Figura 6l,m). Durante o alongamento da espermátide o acrossomo se alonga ficando com a região anterior pontiaguda (Figuras 4j e 6n). Podemos verificar ainda na Figura 4k cistos contendo espermatozoides.

Discussão

Literatura relacionada aos aspectos ultraestruturais da espermatogênese de Heteroptera são extremamente raras e de fundamental importância para o entendimento de aspectos observados, por exemplo, em material preparado por esmagamento. Outras estruturas não são possíveis de serem analisadas em microscopia de luz. O acrossomo, por exemplo, foi analisado em *Gerris najas* (Gerridae) (WERNER; WERNER, 1993), *Notonecta glauca* (Notonectidae) (WERNER et al., 1988) e *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001), onde foram observadas vesículas acrossomais que são formadas a partir do

complexo de Golgi, que posteriormente formarão o acrossomo, e com o alongamento da espermátide determina o pólo anterior desta. Foram observadas também, mudanças na forma e no grau de condensação da cromatina. Inicialmente a cromatina encontra-se dispersa e com uma eletrodensidade baixa, e ao decorrer da espermatogênese, assume um arranjo fibrilar, compacta e de alta eletrodensidade. As duas espécies analisadas no presente trabalho também apresentaram vesículas acrossomais próximas do complexo mitocondrial que foram se unindo formando uma única estrutura. *G. f. flavus* e *M. uruguayensis* apresentaram algumas diferenças observadas principalmente quando impregnadas pelos íons prata, as diferenças relacionam-se ao padrão de impregnação. Portanto mais estudos deverão ser realizados para o esclarecimento da composição e função.

Como mencionado anteriormente durante o início da espermiogênese há o aparecimento das vesículas acrossomais que se unem em uma única estrutura, determinando o polo anterior da célula, estando localizada anteriormente ao núcleo, no espermatozoide (STANLEY, 1971; AZEVEDO et al., 1985; BÁO et al., 1989; ARAUJO et al., 2011). As enzimas acrossomais são geralmente armazenadas na forma de pró-enzimas e quando ocorre a reação acrossomal são liberadas e ativadas, participando, assim, do evento da fertilização (YANAGIMACHI, 1988; BACCETTI et al., 1989; TESARIK et al., 1990; GALLO et al., 1991). O acrossomo em *G. f. flavus* e *M. uruguayensis*, também foi observado na região anterior da cabeça da espermátide.

Com relação ao axonema, o padrão flagelar observado para *G. f. flavus* e *M. uruguayensis* foi de 9+9+2. Araujo et al. (2011) descreve um padrão de cauda para algumas espécies da família Pentatomidae, onde o flagelo é composto de um axonema e dois derivados mitocondriais, o axonema segue o padrão de arranjo de microtúbulos de 9+9+2 (9 microtúbulos acessórios, 9 subtúbulos e 2 microtúbulos centrais). Esse padrão também foi descrito para outras espécies de Heteroptera (Pentatomidae, TRANDABURU, 1973; FERNANDES; BÁO, 1998; Reduviidae, DOLDER, 1988; BÁO; DESOUSA, 1994; Heteroptera aquáticos, AFZELIUS et al., 1985; LEE, 1991; LEE; LEE, 1992; Leptopodomorpha, AFZELIUS et al., 1976; Cimicomorpha, Gerromorpha,

e Pentatomomorpha, DALLAI; AFZELIUS, 1980; ARAUJO et al., 2011) sendo portanto o padrão para esta subordem.

Sabe-se que insetos mutantes podem apresentar transtornos a nível de espermiogênese (BÁO, 1987; BÁO; DOLDER, 1991) e que condições ambientais, como a temperatura podem influenciar no desenvolvimento normal da espermiogênese (SZOLLOSI, 1976a,b). A presença de espermátides aberrantes na espermiogênese de insetos não parece ser um evento raro. Caetano (1980), por exemplo, descreveu espermatozoides com elementos constituintes supranumerários em *Atta capigura* e *A. sexdens rubropilosa* (Formicidae). Com relação à presença de elementos supranumerários encontrados na espécie *G. f. flavus* podemos atribuir a um possível estresse na coleta, a condição do ambiente onde foram coletados, ou até mesmo a uma questão natural, mais faz-se necessário mais estudos para podermos afirmar com certeza o que está ocorrendo.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e aos técnicos Sr. Luiz Roberto Falleiros Júnior e Dr^a. Rosana Silistino de Souza pela orientação e auxílio nas análises ultraestruturais.

Referências Bibliográficas

AFZELIUS, B.A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of Notonecta. Journal of Submicroscopic *Cytology* and *Pathology*, v. 8 p. 149–161, 1976.

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

ANDERSON, K. Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). **Acta Veterinaria Scandinavica** (Denmark), v. 19(2), p. 229-242, 1978.

ANDONOV, M. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v. 104, p. 46-54, 1990.

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.

AZEVEDO, C.; LOBO-DA-CUNHA, A.; OLIVEIRA, E. Ultrastructure of the spermatozoon in *Gibbula umbilicalis* (Gastropoda, Prosobranchia), with special reference to acrosomal formation. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 17 p. 609-614, 1985.

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

BACCETTI, B.; AFZELIUS, B.A. The biology of the sperm cell. Basel, New York, Karger, 254p., 1976.

BACCETTI, B.; DALLAI, R. The spermatozoan of arthropoda. XXVII. Uncommon axoneme patterns in different species of the cecidomyid flies. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 55 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.; BURRINI, A.G.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P.; RENIERI, T.; SENSINI, C. Localization of acrosomal enzymes in Arthropoda, Echinodermata and Vertebrata. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 21 p. 385-389, 1989.

BÁO, S.N. Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante “olho-róseo” comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Campinas, Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 94p 1987.

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.; DOLDER, J. Abnormal characteristics observed in spermatogenic cells during spermiogenesis in the Ra mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 14 n. 2 p. 287-297, 1991

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

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

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; FUMAGALLI, E.; VAN DOESBURG, P.H.; LARRAMENDY, M.L. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Krakow), v. 51, p. 135-141, 2003.

CAETANO, F.H. Ultraestrutura dos espermatozóides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). **Naturalia**, v. 5 p. 105-111, 1980.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; BICUDO, H.E.M.C.; COSTA, L.A.A.; ITOYAMA, M.M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a marked RON revealing aspect of the chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 9 p. 1343-1356, 2010.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. **Journal Ultrastructure Research**, v. 39 n.1 p. 15-23, 1972

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

DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Diptera). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.20 p. 215-222, 1991.

DI CASTRO, M.; PRANTERA, G.; CIPRIANI, L.; ROCCHI, A. Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). **Genetica**, v. 60, p. 163-166, 1983.

DOLDER, H. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v. 101 p. 159–164, 1988.

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.

FERNANDES, A.P.; BÁO, S.N. Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera: Pentatomidae): an ultrastructural study. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 30 n. 4 p. 485-493, 1998.

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

FOSSEY, A.; LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Cartisia wahlbergi* Stal (Coreidae: Heteroptera) *Cytobios*, v.81, p. 7-15, 1995.

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

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

KIEFER, R.G. Development, organization and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. *Journal of Cell Science*, v. 6 p. 177-194, 1970.

KOTAJA N.; BHATTACHARYYA S.N.; JASKIEWICS L.; KIMMINS S.; PARVINEN M.; FILIPOWICZ W.; SASSONE-CORSI P. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103 n. 8 p. 2647-2652, 2006.

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cell specific RNA processing centre. *Nature reviews – Molecular Cell Biology*, v.8, p. 85-90, 2007.

LEE, C.E. Morphological and phylogenetic studies on the true water bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Journal of Natural History Society of Korea*, v. 21 p. 1-183, 1991.

LEE, Y.H.; LEE, C.E. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in *Nepomorpha* (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. *Zoological Science*, v. 9 p. 971-981, 1992.

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

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.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 189-201, 2005

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

PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. **Journal of Ultrastructure Research**, v.44 p. 181-198, 1973.

PERUQUETTI, R.L.; ASSIS, I.M.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v. 39, p. 419-425, 2008a.

PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x, 2008b.

PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: Is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? **Micron**, v. 42 p. 87-96, 2011.

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

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

PRATT, S. Formation and differentiation of the Nebenkern in spermatids of a hemipteran insect, *Murgantia histrionica*. In: BACCETTI, B. Comparative Spermatology. Academic, London, p. 301-310, 1970.

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

SANTOS, J.; SENTIS, C.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J. Pattern of nucleolar organizer region activity during male meiosis in *Callicrania seoanei* (Orthoptera) as analyzed by silver staining: evidences for a possible reactivation in the period between the two meiotic divisions. **Genome**, v. 29, p. 516-518, 1987.

SOUZA, H.V.; BICUDO, H.E.M.C.; COSTA L.A.A.; ITOYAMA, M.M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus*

tripterus (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007a.

SOUZA, H.V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M.M. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2007b.

STANLEY, H.P. Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi* I. Acrosome formation, nuclear elongation and differentiation of the midpiece axis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 36 p. 86-102, 1971.

SZOLLOSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* I. Abnormalities in differentiation of cytoplasmic organelles. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 54 p. 202-214, 1976a.

SZOLLOSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* II. Abnormalities in differentiation of the nucleus. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 54 p. 215-223, 1976b.

TANDLER, B.; HOPPEL, C. Mitochondria in spermatogenesis. In: TANDLER, B.; HOPPEL, C. Mitochondria, 1^a Ed., New York and London, Academic Press, p. 36-39, 1972.

TAVARES, M.G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.J.V. Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera: Reduviidae) as analysed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

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

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

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

TRANDABURU, V. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptera, Pentatomidae). **Travaux Du Muséum National D'Histoire Naturelle Grigore Antipa**, v. 13 p. 137-145, 1973.

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

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

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

WERNER G.; AFZELIUS, B.A.; MOSLER B. Acrosome formation during spermiogenesis in *Notonecta glauca* L. (Heteroptera). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 20 n. 1 p. 123-35, 1988.

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E; NEILL, J. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, p. 135-185, 1988.

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

YOSHIDA, T. Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. **Journal of the Faculty of Science- Hokkaido University**. (Zool.), v. 9, p. 243-249, 1947.

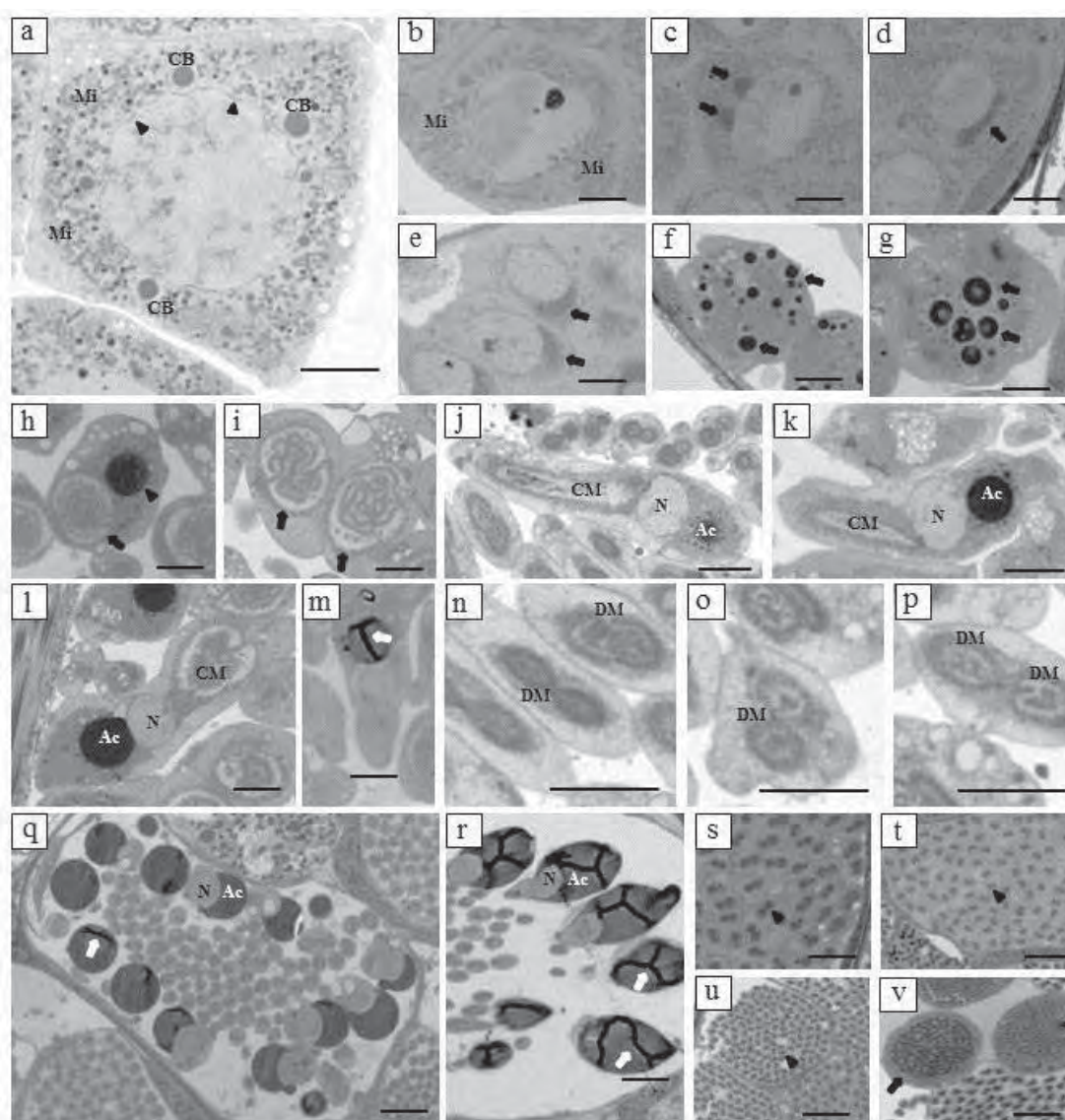


Figura 1. Corte semifino do testículo de *Gelastocoris flavus flavus* corado com Azul de Toluidina. **a)** Prófase I evidenciando os corpos cromatóides arredondados e de diferentes tamanhos (CB), observar próximo ao CB os complexos de poros (cabeças de seta) e mitocôndrias (Mi); **b-e)** formação do complexo mitocondrial; em b mitocôndrias pequenas, isoladas e dispersas por todo citoplasma (Mi), em c as mitocôndrias estão começando a se unir em apenas um dos lados da célula (setas), **d,e)** formação do complexo mitocondrial (setas); **f,g)** Espermátides iniciais com várias vesículas acrossomais de diferentes tamanhos (setas) que se unem formando uma única (h, cabeça de seta); **h,i)** espermátides com complexo mitocondrial (setas) e vesícula (cabeça de seta); **j-l)** espermátides em alongamento mostrando o acrossomo (Ac), o núcleo (N) e complexo mitocondrial (CM); **m)** acrossomo com região mais intensamente corada (seta); **n-p)** corte transversal da cauda evidenciando o derivado mitocondrial (DM); **q-r)** corte longitudinal da cabeça, observar o núcleo (N), acrossomo (Ac) e regiões mais coradas no acrossomo (setas); **s-u)** corte transversal de diferentes regiões da cauda mostrando o derivado mitocondrial (cabeças de seta); **v)** cisto com espermatozoides (seta). Barras: 10 μ m

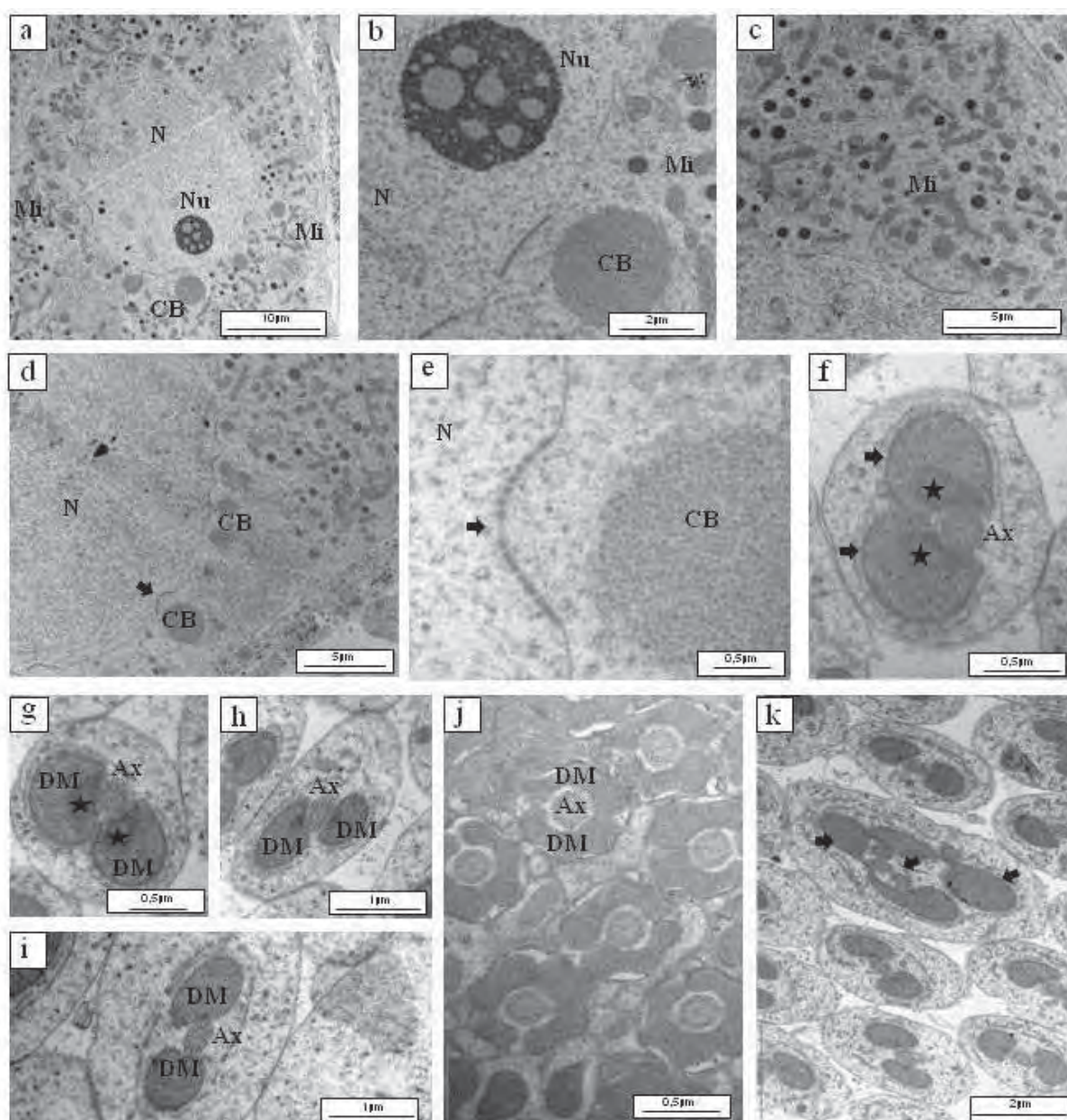


Figura 2. Eletromicrografia das células testiculares de *Gelastocoris flavus flavus*. **a)** Célula em prófase I evidenciando o nucléolo (Nu) mais eletrodensso que as demais estruturas e com regiões menos eletrodensas em seu interior (observar em maiores detalhes essa região na Figura b); **a-c)** mitocôndrias (Mi) em diferentes tamanhos e ampliações. Observar em c que as mitocôndrias estão localizadas preferencialmente em um dos lados da célula, CB: corpo cromatóide, N: núcleo, Nu: Nucléolo; **d,e)** observar os corpos cromatóides (CB) e os complexos de poro (setas). Em e verificar estas estruturas em maior aumento; **f)** corte transversal da cauda evidenciando os derivados mitocondriais (setas) e no seu interior a presença de cristaloides (asteriscos), e o axonema (Ax); **g-j)** processo de formação da cauda em relação ao derivado mitocondrial (DM) e o axonema (Ax). Em g os derivados mitocondriais estão próximos e o axonema ainda se deslocando para a região central da cauda, presença de cristaloides (asteriscos); **j)** derivado mitocondrial envolvendo o axonema; **k)** evidenciar elementos supranumerários (setas).

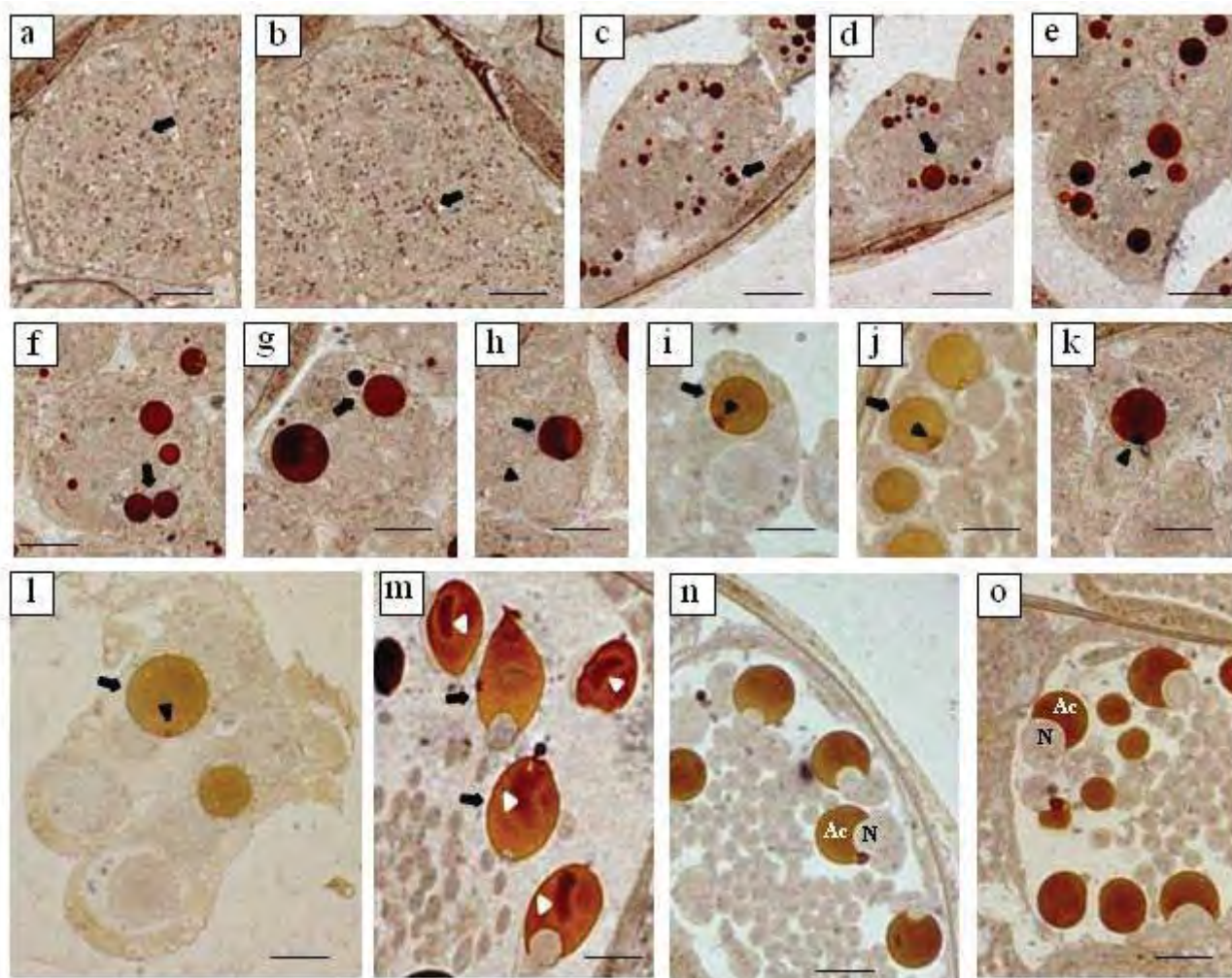


Figura 3. Corte semifino do testículo de *Gelastocoris flavus flavus* impregnado pelos íons prata. **a,b**) Prófases I mostrando várias marcações prata positivas (setas); **c-e**) espermátides inicialmente com várias vesículas acrossomais prata positivas (setas); **f,g**) espermátides inicialmente evidenciando a união das vesículas acrossomais prata positivas, formando estruturas arredondadas e maiores; **h**) espermátide com acrossomo (seta) e complexo mitocondrial (cabeça de seta); **i-m**) vesícula acrossomal (setas), observar marcação mais forte no interior do acrossomo que se interioriza com o alongamento da espermátide (cabeças de seta); **n,o**) espermátides com acrossomo (Ac) e núcleo (N). Barras: 10 µm

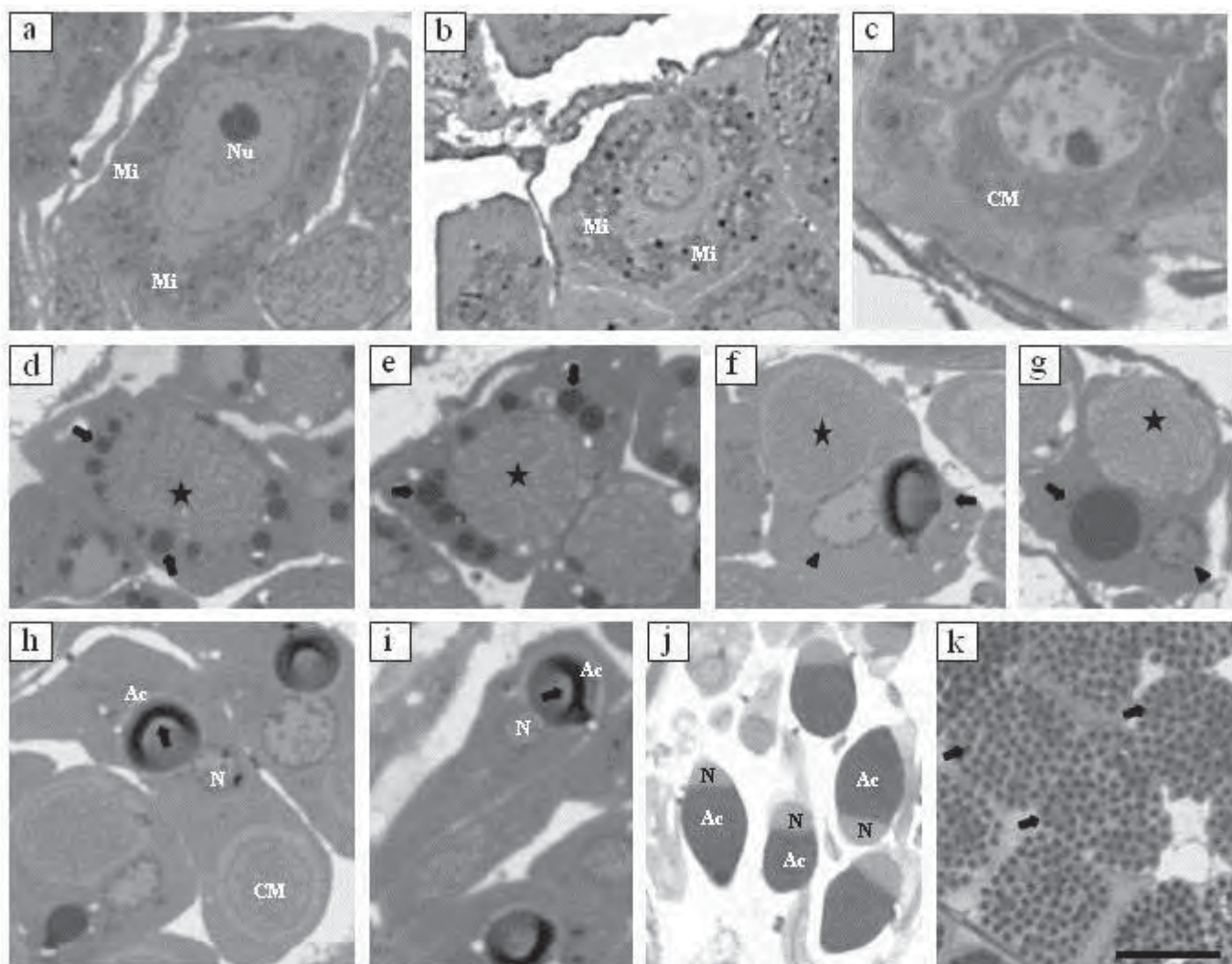


Figura 4. Corte semifino do testículo de *Martarega uruguayensis* corado com Azul de Toluidina. **a,b)** Prófase I onde se pode observar as mitocôndrias dispersas por todo citoplasma (Mi) e nucléolo arredondado e fortemente corado (a, Nu); **c)** início da formação do complexo mitocondrial (CM); **d,e)** Espermátides iniciais com várias vesículas acrossomais de diferentes tamanhos (setas), localizadas ao redor do complexo mitocondrial (asteriscos); **f,g)** espermátides com complexo mitocondrial (asteriscos), vesícula acrossomal (setas) e núcleo (cabeças de seta); **h,i)** espermátide em alongamento mostrando o acrossomo (Ac) na região anterior, o núcleo (N) e complexo mitocondrial (CM), observar região mais intensamente corada no interior do acrossomo (setas); **j)** corte longitudinal da cabeça, evidenciando o núcleo (N) e o acrossomo (Ac); **k)** cisto com espermatozoides (seta). Barra: 10 μ m

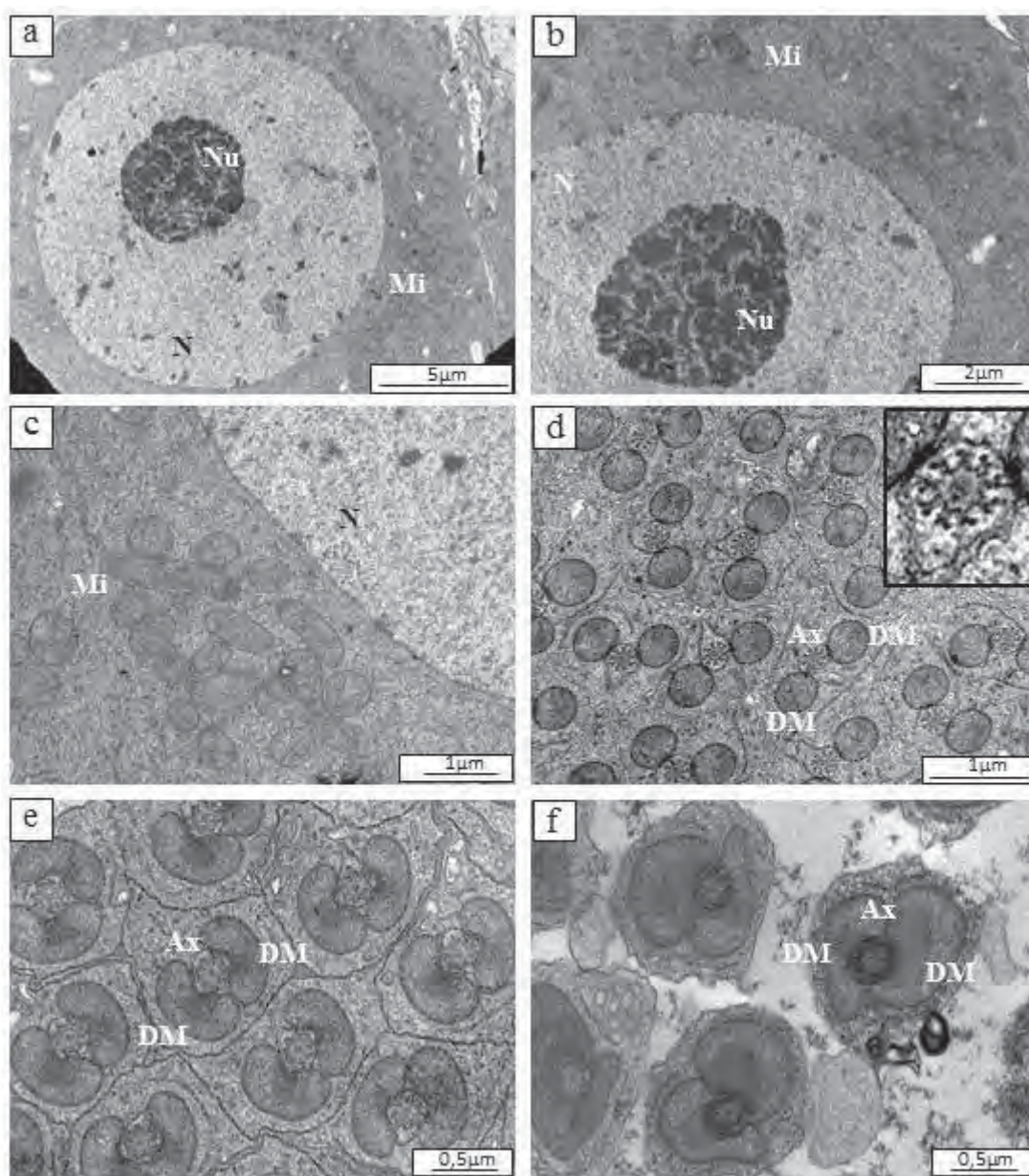


Figura 5. Eletromicrografia das células testiculares de *Martarega uruguayensis*. **a,b)** Célula em prófase I evidenciando o nucléolo (Nu) mais eletrodenso que as outras estruturas, e as mitocôndrias (Mi) migrando para um dos lados da célula; observar maiores detalhes na figura b; **c)** agrupamento das mitocôndrias (Mi) para o início da formação do complexo mitocondrial; **d)** derivados mitocondriais (DM) dispostos bilateralmente em relação ao axonema (Ax), em destaque o axonema, evidenciando um padrão 9+9+2; **e)** derivados mitocondriais (DM) envolvendo o axonema (Ax); **f)** derivados mitocondriais (DM) de morfologia irregular envolvendo o axonema (Ax) localizado no centro da cauda.

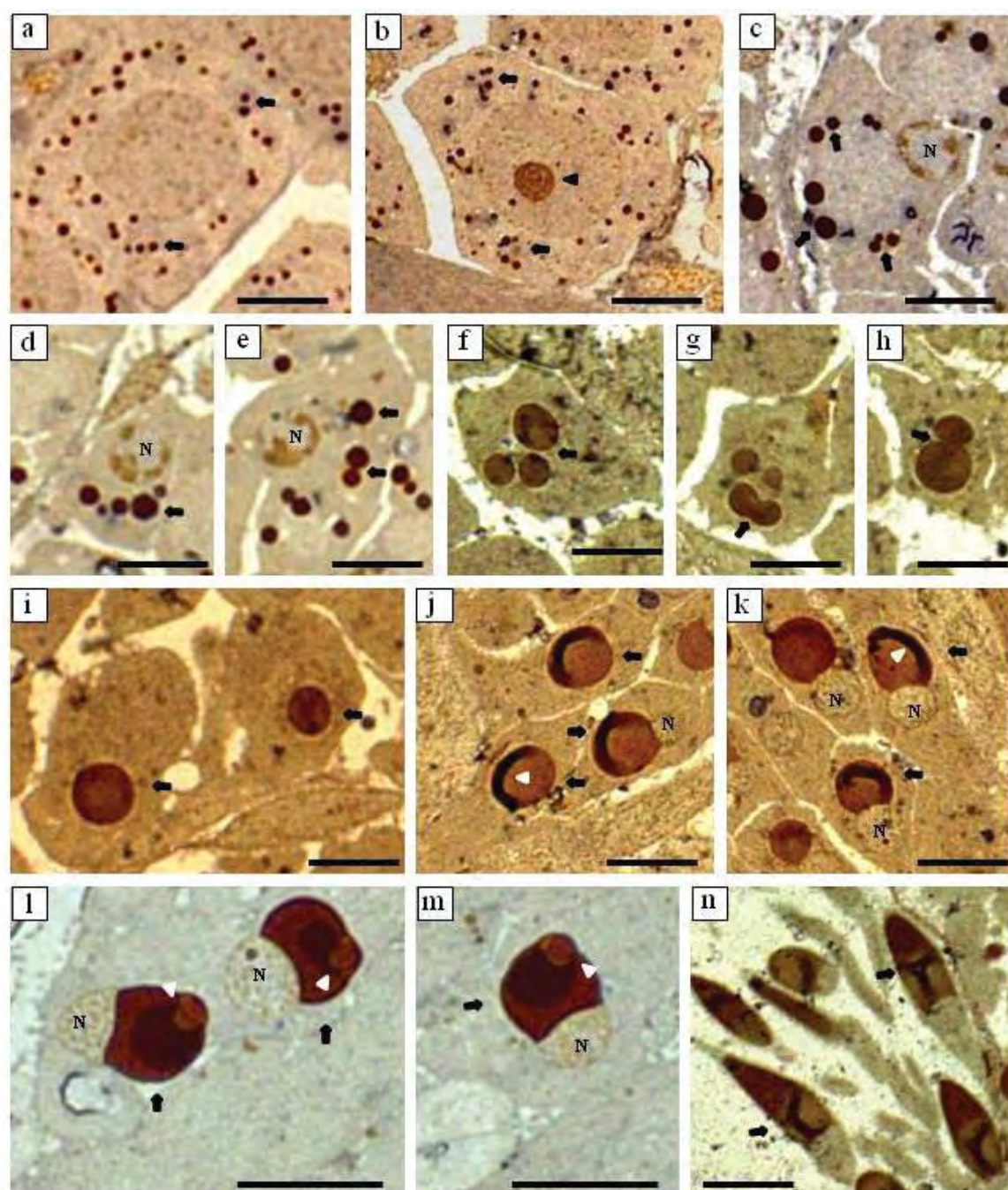


Figura 6. Corte semifino do testículo de *Martarega uruguayensis* impregnado pelos íons prata. **a,b**) Prófasas I mostrando várias marcações prata positivas distribuídas uniformemente pelo citoplasma (setas), observar na figura b o nucléolo com morfologia arredondada (cabeça de seta); **c-e**) espermátides inicialmente com várias vesículas acrossomais prata positivas (setas) e núcleo (N); **f,h**) espermátides inicialmente evidenciando a união das vesículas acrossomais prata positivas (setas); **i-k**) espermátide com vesícula acrossomal (setas) com uma marcação mais intensa evidente em seu interior (cabeças de seta), e núcleo (N); **l,m**) espermátides com acrossomo (setas) onde se observa duas vesícula, sendo uma mais impregnada (cabeças de seta) e núcleo (N); **n**) espermátides evidenciando o acrossomo com região mais impregnada em seu interior (setas). Barras: 10 μ m

IV. DISCUSSÃO GERAL

IV. DISCUSSÃO GERAL

Os testículos dos Heteroptera são formados por números variáveis de lobos e recobertos por membrana de diferentes colorações. Espécies de Coreidae analisadas por Souza et al. (2007c) apresentaram sete lobos recobertos por membrana avermelhada. *Antiteuchus tripterus* (Pentatomidae), também, possui testículo recoberto por membrana avermelhada, mas é constituído de seis lobos alongados, sendo o sexto interno ao quinto (SOUZA et al., 2007a), *Mormidae quinqueluteum*, *Oebalus poecilus* e *O. ypsilongriseus* (Pentatomidae) possuem, também, membrana avermelhada recobrindo o testículo, mas o número de lobos alongados encontrado foi de 3, 4, e 4, respectivamente (SOUZA et al., 2008), *Nysius californicus* (Lygaeidae) apresenta sete lobos alongados de tamanhos similares e recobertos com membrana avermelhada (SOUZA et al., 2007b). *Limnogonus aduncus* (Gerridae) apresentou testículos alongados, constituídos de 2 lobos cada e envolvidos por bainha peritoneal transparente (CASTANHOLE et al., 2008). As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram bainha peritoneal transparente, e número variável de lobos, podendo ser um único, dois ou cinco.

Com relação à morfologia testicular, as espécies aquáticas, analisadas no presente trabalho apresentaram morfologia do testículo diferente dos terrestres conhecidos, ou seja, arredondada na região distal e alongada na região proximal para a família Belostomatidae, alongados e espiralados na extremidade distal para Gelastocoridae, alongado/espiralado ou arredondado para Notonectidae e arredondado para Veliidae e Gerridae. Tudo indica que, nas espécies aquáticas, a morfologia mais comum dos testículos seja a arredondados com os lobos dispostos lado a lado; todavia, a análise de um maior número de espécies e famílias será de grande importância para o entendimento desta característica.

Com relação ao número de autossomos, em Heteroptera ele varia de quatro (Belostomatidae) a 80 (Miridae), mas estes números não são típicos para a subordem (Ueshima, 1979). É difícil dizer qual é o número cromossômico modal para a subordem inteira, pois todas as oito infraordens

maiores dentro dos Heteroptera não foram estudadas citogeneticamente na mesma extensão (GROZEVA; NOKKALA, 1996).

Na literatura, discute-se a origem dos complementos cromossômicos constituídos de maior número de cromossomos a partir do menor número por duplicação ou fragmentação de um dos pares de autossomos (UESHIMA; ASHLOCK, 1980). Segundo Jacobs (2004), pelo fato dos Heteroptera apresentarem cromossomos holocêntricos, a fragmentação é o processo mais provável, porque origina segmentos que podem migrar regularmente para os polos durante a anáfase e sobreviver por muitas gerações celulares. Da mesma maneira, a fusão cromossômica é também teoricamente mais fácil em organismos com cromossomos holocêntricos, segundo o mesmo autor.

Seguindo esse raciocínio, para as espécies da família Belostomatidae temos a espécie *B. micantulum* com $2n=16$ e *B. anurum* com $2n=29$, para a família Gelastocoridae temos *G. angulatus* com $2n=16$ e *G. f. flavus* com $2n=35$ e para a família Notonectidae temos as espécies *B. amnigenus*, *B. unguis* e *M. membranacea* com $2n=25$ e as espécies *M. brasiliensis* e *M. uruguayensis* com $2n=27$, analisadas no presente trabalho, possivelmente as espécies com $2n$ maior devem ter se originado de uma espécie com $2n$ menor, por fragmentação de autossomos e cromossomos sexuais.

Uma característica dos Heteroptera, é que no leptóteno-zigóteno o cromossomo X é positivamente heteropicnótico e localiza-se na periferia do núcleo; no zigóteno e paquíteno, os cromossomos estão emaranhados. No final da diacinese o cromossomo X torna-se isopicnótico (BREZZA et al., 2002). As espécies analisadas no presente trabalho, também, apresentaram estas características, mostrando que isto deva ser um padrão para os Heteroptera. Mas segundo a literatura, nem sempre o cromossomo sexual é o que se apresenta heteropicnótico, pois foram observados em *Belostoma dentatum* autossomos bivalentes em condensação contínua, enquanto ambos os cromossomos sexuais estavam descondensados e negativamente heteropicnóticos durante a diacinese (PAPESCHI; BIDAÚ, 1985).

As espécies analisadas no presente trabalho apresentaram durante a prófase I quiasmas terminais ou intersticiais, simples ou duplos,

características já observadas em Coreidae (SOUZA et al., 2007a). Portanto esta característica deve ser comum para a maioria das espécies descritas.

O comportamento dos autossomos, durante a metáfase, nas espécies analisadas no presente trabalho, sempre foi o de formar um anel. A disposição dos demais cromossomos (X, Y e m-cromossomos) é que variou: se a espécie só possuía o sistema cromossômico do sexo X0, o X sempre estava fora do anel semelhante a outras espécies de Coreidae descritas na literatura (SOUZA et al., 2007a), quando o sistema é o X0 com m-cromossomos, o X continua fora do anel, e o m-cromossomo está no centro do anel, assim como os observados em espécies de Coreidae (SOUZA et al., 2007a).

Quando o sistema era XY ou com múltiplos X, nas espécies analisadas, o cromossomo X estava dentro do anel e o Y estava junto com os autossomos formando o anel, diferentemente de outras espécies descritas, como por exemplo em Pentatomidae em que os dois cromossomos sexuais estavam dentro do anel formado pelos autossomos (SOUZA et al., 2008).

Com relação ao tamanho das células em prófase, fizemos as análises, a partir de um representante de cada família. A espécie *G. f. flavus* que é uma espécie semi-aquática, que vive tanto em ambiente aquático quanto terrestre foi o que apresentou maior divergência no tamanho de células, mas não podemos afirmar que o ambiente está influenciando o tamanho das células, pois *B. micantulum* que também é semi-aquático mostrou o tamanho de células em prófase semelhante ao de *R. zela* que é uma espécie que vive na superfície d'água. Já a espécie *R. c. crassifemur* que também vive na superfície, mostrou a média semelhante à de *M. brasiliensis* que é uma espécie subaquática. Provavelmente o ambiente não está interferindo no tamanho das células, sendo necessários mais estudos para confirmação. Esta é uma questão interessante do ponto de vista evolutivo, que deve ser analisada com novas abordagens.

Com relação aos aspectos ultraestruturais da espermatogênese de Heteroptera, eles são extremamente raros e de fundamental importância para o entendimento de aspectos observados, por exemplo, em material preparado por esmagamento. Outras estruturas não são possíveis de serem analisadas em nível de microscopia de luz. O acrossomo, por exemplo, foi analisado em *Gerris najas* (Gerridae) (WERNER; WERNER, 1993), *Notonecta glauca* (Notonectidae)

(WERNER et al., 1988) e *Euchistus heros* (FERNANDES et al., 2001), onde foram observadas vesículas acrossomais que são formadas a partir do complexo de Golgi, que posteriormente formarão o acrossomo, e com o alongamento da espermátide determina o pólo anterior desta. As duas espécies analisadas no presente trabalho, também, apresentaram vesículas acrossomais próximas do complexo mitocondrial que foram se unindo formando uma única estrutura. *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* apresentaram algumas diferenças observadas principalmente quando impregnadas pelos íons prata, as diferenças relacionam-se ao padrão de impregnação. Portanto mais estudos deverão ser realizados para o esclarecimento da composição e função.

Como mencionado anteriormente durante o início da espermiogênese há o aparecimento das vesículas acrossomais que se unem em uma única estrutura, determinando o polo anterior da célula, estando localizada anteriormente ao núcleo, no espermatozoide (STANLEY, 1971; AZEVEDO et al., 1985; BÁO et al., 1989; ARAUJO et al., 2011). As enzimas acrossomais são geralmente armazenadas na forma de pró-enzimas e quando ocorre a reação acrossomal são liberadas e ativadas, participando, assim, do evento da fertilização (YANAGIMACHI, 1988; BACCETTI et al., 1989; TESARIK et al., 1990; GALLO et al., 1991). O acrossomo em *G. f. flavus* e *M. uruguayensis*, também foi observado na região anterior da cabeça da espermátide.

Com relação ao axonema, o padrão flagelar para *G. f. flavus* e *M. uruguayensis* foi de 9+9+2. Araujo et al. (2011) descreve um padrão de cauda para algumas espécies da família Pentatomidae, onde o flagelo é composto de um axonema e dois derivados mitocondriais, o axonema segue o padrão de arranjo de microtúbulos de 9+9+2 (9 microtúbulos acessórios, 9 subtúbulos e 2 microtúbulos centrais). Esse padrão também foi descrito para outras espécies de Heteroptera (Pentatomidae TRANDABURU, 1973; FERNANDES; BÁO, 1998; Reduviidae DOLDER, 1988; BÁO; DESOUZA, 1994; Heteroptera aquáticos AFZELIUS et al., 1985; LEE, 1991; LEE; LEE, 1992; Leptopodomorpha AFZELIUS et al., 1976; Cimicomorpha, Gerromorpha, e Pentatomomorpha DALLAI; AFZELIUS, 1980; ARAUJO et al., 2011) sendo portanto o padrão para esta subordem.

Sabe-se que insetos mutantes podem apresentar transtornos a nível de espermiogênese (BÁO, 1987; BÁO; DOLDER, 1991) e que condições

ambientais, como a temperatura podem influenciar no desenvolvimento normal da espermiogênese (SZOLLOSI, 1976a,b). A presença de espermátides aberrantes na espermiogênese de insetos não parece ser um evento raro. Caetano (1980), por exemplo, descreveu espermatozoides com elementos constituintes supranumerários em *Atta capigura* e *A. sexdens rubropilosa* (Formicidae). Com relação à presença de elementos supranumerários encontrados na espécie *Gelastocoris flavus flavus* podemos atribuir a um possível stress na coleta, a condição do ambiente onde foram coletados, ou até mesmo a uma questão natural, mas faz-se necessário mais estudos para podermos afirmar com certeza o que está ocorrendo.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

O trabalho citogenético realizado com 12 espécies de Heteroptera aquáticos, pertencentes às famílias Belostomatidae (*Belostoma anurum* e *B. micantulum*), Gelastocoridae (*Gelastocoris angulatus* e *G. f. flavus*), Gerridae (*Rheumatobates crassifemur crassifemur*), Notonectidae (*Buenoa amnigenus*, *B. unguis*, *Martarega brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis*) e Veliidae (*Rhagovelia tenuipes* e *R. zela*) permitiu-nos concluir que:

- Todas as espécies analisadas apresentaram testículos envoltos por bainha peritoneal transparente;
- A morfologia dos testículos foi variável (arredondados, arredondados/espiralados, alongados/espiralados) e semelhantes quando comparadas espécies da mesma família, com exceção da família Notonectidae que encontramos testículos com morfologia arredondado/espiralado ou alongado/espiralado;
- Com relação ao número de lobos testiculares, Belostomatidae (*Belostoma anurum* e *B. micantulum*) apresentam cinco, Gelastocoridae (*Gelastocoris angulatus* e *G. f. flavus*), Notonectidae (*Martarega brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis*) e Gerridae (*Rheumatobates crassifemur crassifemur*) apresentam dois, Notonectidae (*Buenoa amnigenus* e *B. unguis*) e Veliidae (*Rhagovelia tenuipes* e *R. zela*) possuem um lobo testicular. A família Notonectidae foi a única que apresentou espécies com um ou dois lobos testiculares;
- Segundo as análises referente ao tamanho das células em prófase I, *B. micantulum* e *R. zela* foram as espécies que apresentaram as menores células, *G. f. flavus* foi a que apresentou maior tamanho e *R. c. crassifemur* e *M. brasiliensis* apresentaram tamanho intermediário;
- Os complementos cromossômicos verificados foram: $2n=16$ ($14A+XY$, *B. micantulum* e *Gelastocoris angulatus*); 21 ($20A+X0$, *R. c. crassifemur*); 23 ($22A+X0$, *R. zela* e *R. tenuipes*); 25 ($24A+X0$, *B. amnigenus* e *B. unguis*); $22A+2m+X0$, *M. membranacea*); 27 ($24A+2m+X0$, *M. brasiliensis* e *M.*

uruguayensis); **29** (26A+X₁X₂Y, *B. anurum*) e **35** (30A+X₁X₂X₃X₄Y, *G. f. flavus*);

- Com relação aos cromossomos sexuais, a localização depende do sistema cromossômico do sexo. Em sistema do tipo X0 o cromossomo X está localizado fora do anel formado pelos autossomos. Se for X0 mas com a presença de m-cromossomos, os autossomos se dispõem circularmente com os m-cromossomos no seu centro e o X fora do anel, quando o sistema de determinação do sexo é XY, o X, está dentro do anel formado pelos autossomos e o Y está junto com os autossomos, se for X₁X₂Y, os X e o Y estão dentro do anel, e se o sistema for X₁X₂X₃X₄Y, os X estão no centro do anel formado pelos autossomos e o Y faz parte do anel juntamente com os autossomos;
- Todas as espécies apresentaram espermátides iniciais arredondadas com variação apenas do material heteropicnótico;
- As espermátides em alongamento podiam ser em forma elíptica como em Belostomatidae e Gelastocoridae ou em forma de bastão como apresentada em Gerridae, Notonectidae e Veliidae. Algumas famílias apresentaram vesículas de diferentes tamanhos;
- Durante o alongamento final das espermátides, todas apresentaram as mesmas características, ou seja, as que apresentavam a cromatina em forma elíptica, continuaram com esta morfologia assim como as que apresentavam a cromatina em forma de bastão com exceção da espécie *Martarega uruguayensis* em que a região posterior da cauda está em forma de V.

As análises ultraestruturais de *G. f. flavus* e *M. uruguayensis* permitiram concluir que:

- O padrão fagelar é de 9+9+2;
- As mitocôndrias se agrupam formando um complexo mitocondrial, que posteriormente se divide em dois derivados mitocondriais que se dispõem bilateralmente ao axonema;
- O início da formação do acrossomo ocorre no início da espermiogênese com a presença de vesículas acrossomais que se unem formando uma única estrutura;
- O acrossomo está localizado na região anterior da cabeça da espermátide;
- O flagelo pode apresentar elementos supranumerários.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZELIUS, B.A.; BACCETTI, B.; DALLAI, R. The giant spermatozoon of Notonecta. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 8 p. 149–161, 1976.

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

ANDERSON, K. Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). **Acta Veterinaria Scandinavica** (Denmark), v. 19(2), p. 229-242, 1978.

ANDONOV, M. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v. 104, p. 46-54, 1990.

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.

AZEVEDO, C.; LOBO-DA-CUNHA, A.; OLIVEIRA, E. Ultrastructure of the spermatozoon in *Gibbula umbilicalis* (Gastropoda, Prosobranchia), with special reference to acrosomal formation. **Journal of submicroscopic cytology**, v. 17 p. 609-614, 1985.

CAETANO, F.H. Ultraestrutura dos espermatozóides de *Atta capiguara* e *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae). **Naturalia**, v. 5 p. 105-111, 1980.

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

BACCETTI, B.; AFZELIUS, B.A. The biology of the sperm cell. Basel, New York, Karger, 254p., 1976.

BACCETTI, B.; DALLAI, R. The spermatozoan of arthropoda. XXVII. Uncommon axoneme patterns in different species of the cecidomyid flies. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 55 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.; BURRINI, A.G.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P.; RENIERI, T.; SENSINI, C. Localization of acrosomal enzymes in Arthropoda, Echinodermata and Vertebrata. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 21 p. 385-389, 1989.

BÁO, S.N. Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante “olho-róseo” comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera, Tephritidae). Campinas, Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 94p 1987.

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.; DOLDER, J. Abnormal characteristics observed in spermatogenic cells during spermiogenesis in the Ra mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 14 n. 2 p. 287-297, 1991

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

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

BORROR, D.J., DE LONG, M.D. TRIPLEHORN, A.C. An **Introduction to the Study of Insects**. Saunders College Publishing, Philadelphia. 1979.

BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo, Brasil: Ed. Edgard Blucher LTDA., 653 pp., 1988.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; LARRAMENDY, M.L. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). I. Neo-XY in *Dysdercus albofasciatus* Berg 1878, a new sex chromosome determining system in Heteroptera. **Chromosome Research**, v. 7, p. 503-508, 1999.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G., MOLA, L.; LARRAMENDY, M.L. Autossomal univalents as a common meiotic feature in *Jadera haematoloma* and *Jadera sanguinolenta* (Heteroptera: Rhopalidae: Serinethinae). **European Journal of Entomology**, v. 98, p. 151-157, 2001.

BRESSA, M.J.; FUMAGALLI, E.; ITUARTE, S.; FRASSA, M.V.; LARRAMENDY, M.L. Meiotic studies in *Dysdercus* Guérin Méneville 1831 (Heteroptera: Pyrrhocoridae). II. Evidence on variations of the diffuse stage between wild and laboratory-inbred populations of *Dysdercus chaquency* Freiberg, 1948. **Hereditas**, v. 137, p. 125-131, 2002.

BRESSA, M.J.; PAPESCHI, A.G.; FUMAGALLI, E.; VAN DOESBURG, P.H.; LARRAMENDY, M.L. Cytogenetic and nucleolar meiotic cycle analyses in *Dysdercus imitator* Blöte, 1931 (Pyrrhocoridae, Heteroptera) from Argentina. **Folia Biologica** (Krakow), v. 51, p. 135-141, 2003.

BUCK, R.C. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and difuse kinetochore. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 18, p. 489-501, 1967.

CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a marked RON revealing aspect of the chromosomal behavior. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p.1398-1407, 2008.

CASTANHOLE, M.M.U.; PEREIRA, L.L.V.; SOUZA, H.V.; ITOYAMA, M.M.. Spermatogenesis and karyotypes of three species of water striders (Gerridae, Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1343-1356, 2010.

CASTANHOLE, M. M. U.; PEREIRA, L. L. V.; SOUZA, H. V.; ITOYAMA, M. M. Spermatogenesis of riffle bugs, *Rhagovelia whitei* and *Rhagovelia* sp. (Veliidae), and backswimmers *Martarega* sp. (Notonectidae). **Journal of Biological Research**. Submetido.

CHICKERING, A.M.; BACORN, B. Spermatogenesis in the Belatomatidae. IV. Multiple chromosomes in *Lethocerus*. **Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters**, v. 17, p. 529-534, 1933.

COBBEN, R.H. Evolutionary trends in Heteroptera. Part I. Eggs, architecture of the shell, gross embryology and eclosion. **Centre for Agricultural Publishing and documentation**, Wageningen, 475 p, 1968.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. **Chromosoma** (Berl.), v. 37, p. 177-192, 1972a.

COMINGS, D.E.; OKADA, T.A. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. **Journal Ultrastructure Research**, v. 39 n.1 p. 15-23, 1972b.

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

DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) (Diptera). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.20 p. 215-222, 1991.

DI CASTRO, M.; PRANTERA, G.; CIPRIANI, L.; ROCCHI, A. Silver staining analysis of nucleolar-organizer activity during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). **Genetica**, v. 60, p. 163-166, 1983.

DOLDER, H. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v. 101 p. 159–164, 1988.

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.

FERNANDES, A.P.; BÁO, S.N. Spermiogenesis in phytophagous bug (Hemiptera: Pentatomidae): an ultrastructural study. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30 n. 4 p. 485-493, 1998.

FERNANDES, A.P. Estudo ultraestrutural e citoquímico da espermiogênese de percevejos da família pentatomidae (Hemiptera). Campinas, Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 109p., 1999.

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

FOSSEY, A.; LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Cartisia wahlbergi* Stal (Coreidae: Heteroptera) **Cytobios**, v.81, p. 7-15, 1995.

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

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.

GROZEVA, S.M.; KUZNETSOVA, V.G. Karyotypes and some structural properties of the reproductive system of bugs of the subfamily Artheneinae (Heteroptera, Pentatomorpha, Lygaeidae). **Entomologicheskoye Obozreniye**, n. 4, p. 700-709, 1989.

GROZEVA, S.M. and KUZNETSOVA, V.G. The reproductive system of the some primitive families of pentatomomorph bugs (Heteroptera). In: **Advances in regulation of insect reproduction (Bennettova B, Gelbic I and Soldan T, eds.)** Institute of Entomology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 97-102, 1992.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosomes and their behaviour in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). **Hereditas**, v. 125, p. 31-36, 1996.

GROZEVA, S.; NOKKALA, S. Chromosome numbers, sex determining systems, and patterns of the C-heterochromatin distribution in 13 species of Lace Bugs (Heteroptera, Tingidae). **Folia Biologica** (Krakow), v. 49, n. 1-2, p. 29-41, 2001.

HALKKA, O. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera Auchenorrhyncha. **Annales Academiae Scientiarum Fennicae**, v. 43, p. 1-71, 1959.

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.

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

INADA, K., KITADE, O., MORINO, H. Paternity analysis in an egg-carrying aquatic insect *Appasus major* (Hemiptera: Belostomatidae) using microsatellite DNA markerse.v. 14, p. 43–48. 2011.

JACOBS, D.H. The evolution of a neo-XY1Y2 sex chromosome system by autosome sex chromosome fusion in *Dundocoris nodulicarius* Jacobs (Heteroptera: Aradidae: Carventinae). **Chromosome Research**, v. 12, p. 175-191, 2004.

JANDE, S.S. An analysis of the chromosomes in four species of the family Belostomatidae (Heteroptera, Cryptocerata). **Research Bulletin (NS) Panjab University**, v. 10, p. 25-34, 1959.

JOHN, B.; KING, M. Pseudoterminalization, terminalization and non-chiasmate modes of terminal association. **Chromosoma**, v. 92, p. 89-99, 1985.

JONES, G.H. Chiasmata. In: Monees PB, ed., **Meiosis**. Orlando: Academic Press, p. 213-244, 1987.

KIEFER, R.G. Development, organization and degeneration of the *Drosophila* sperm flagellum. **Journal of Cell Science**, v. 6 p. 177-194, 1970.

KIRILLOVA, V.I. Chromosome numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea. **Entomologiceskoe obozrenie**, v. 65, p. 115-125, 1986.

KIRILLOVA, V.I. Chromosomes numbers of leafhoppers (Homoptera, Auchenorrhyncha) of the world fauna. I. Karyotype peculiarities of the leafhoppers of the superfamilies Fulgoroidea, Cercopoidea, Cicadoidea . **Entomologicheskoe obozrenie**, v. 66, p. 321-337, 1987.

KOTAJA N.; BHATTACHARYYA S.N.; JASKIEWICS L.; KIMMINS S.; PARVINEN M.; FILIPOWICZ W.; SASSONE-CORSI P. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 103 n. 8 p. 2647-2652, 2006.

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cell specific RNAprocessing centre. **Nature reviews – Molecular Cell Biology**, v.8, p. 85-90, 2007.

LEE, C.E. Morphological and phylogenetic studies on the true water bugs (Hemiptera: Heteroptera). **Journal of Natural History Society of Korea**, v. 21 p. 1–183, 1991.

LEE, Y.H.; LEE, C.E. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special reference to phylogeny. **Zoological Science**, v. 9 p. 971–981, 1992.

MANNA, G.K. **Chromosomes in evolution in Heteroptera**. In: SHARMA, A.K., ed. Chromosomes in evolution of Eukaryotic groups. Boca Raton Florida USA: CRCPress, p. 189-225, 1984.

MELO, M.C. Biodiversidad de Heteroptera (Hemiptera) acuáticas y semiacuáticas de la Patagonia argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 68 (1-2), p. 177-185, 2009.

MOLA, L.M.; PAPESCHI, A.G. Meiotic studies in *Largus rufipennis* (Castelnau) (Largidae, Heteroptera): frequency and behaviour of ring bivalents, univalents and B-chromosomes. **Heredity**, v. 71, p. 33-40, 1993.

MERRITT, R.W., CUMMINS, K.W. An **Introduction to the Aquatic Insects of North America**. Kendall/Hunt, Iowa 1984.

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.

NOKKALA, S.; GROZEVA, S. Aquiasmatic male meiosis in *Myrmedobia coleoptrata* (Fn.) (Heteroptera, Microphysidae). **Caryologia**, v. 53, n. 1, p. 5-8, 2000.

NOKKALA, S., GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V.; MARYANSKA-NADACHOWSKA, A. The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 119, p. 327-332, 2003.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in two species of *Saldula* (Saldidae, Hemiptera). **Hereditas**, v. 99, n. 1, p. 131-134, 1983.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in the Heteropteran genus *Nabis* (Nabidae, Heteroptera), **Hereditas**, v. 101, p. 31-35, 1984a.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. The occurrence of the XO sex chromosome system in *Dictyonota tricornis* (Schr.) (Tingidae, Hemiptera and its significance for concepts of sex chromosome system evolution in Heteroptera. **Hereditas**, v. 100, p. 299-301, 1984b.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis of collochore type in the heteropteran family Miridae. **Hereditas**, v. 105, p. 193-297, 1986a.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Achiasmatic male meiosis in *Anthocoris nemorum* (Hemiptera, Anthocoridae). **Hereditas**, v. 105, p. 287-289, 1986b.

NOKKALA, S.; NOKKALA, C. Interaction of B chromosomes with A or B chromosomes in segregation in insects. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 106, p. 394-397, 2004.

PAPESCHI, A.G.; BIDAU, C.J. Chromosome complement and male meiosis in four species of *Belostoma* Latreille (Heteroptera-Belostomatidae). **Revista Brasileira de Genética**. VIII: 249-261, 1985.

PAPESCHI A.G., BRESSA, M.J., Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of Biological Research**. v. 5 p. 3 – 21, 2006.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M. Meiotic studies in *Acanonicus hahni* (Coreidae, Heteroptera). I. Behaviour of univalents in desynaptic individuals. **Genetica**, v. 80, p. 31-38, 1990.

PAPESCHI, A.G.; MOLA, L.M.; BRESSA, M.J.; GREIZERSTEIN, E.J.; LÍA, V.; POGGIO, L. Behaviour of ring bivalents in holocentric systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 11, p. 725-733, 2003.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 189-201, 2005

PAULMIER, F.C. The spermatogenesis of *Anasa tristis*. **Journal of Morphology**, v. 15 suppl., p. 224-272, 1899.

PEREIRA, D.L.V., MELO, A.L., HAMADA, N. Keys to families and genera of gerromorpha and nepomorpha (Insecta: Heteroptera) in the central Amazonia, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 36(2) p. 210-228, 2007.

PEREIRA, M.H., SILVA, R.E., AZEVEDO, A.M.S., MELO, M.L., PEREIRA, L.H. Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35 n 5 p. 405-409, 1993.

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

PEROTTI, M.E. The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. **Journal of Ultrastructure Research**, v.44 p. 181-198, 1973.

PERUQUETTI, R.L.; ASSIS, I.M.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron*, v. 39, p. 419-425, 2008a.

PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x, 2008b.

PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: Is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? **Micron**, v. 42 p. 87-96, 2011.

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

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

POISSON, R. Nouvelles observations sur le processus espermatogénétique dans les éléments sexuels d' Hémipteres aquatiques. **Archives the Zoologie Experimentale et Generale**, v.78, p. 133-194, 1936.

PRATT, S. Formation and differentiation of the Nebenkern in spermatios of na hemipteran insect, *Murgantia iristionia*. In: BACCETTI, B. Comparative Spermatology. Academic, London, p. 301-310, 1970.

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

RUFAS, J.S.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Ultrastructure of the kinetochore in *Graphosomaitalicum* (Hemiptera: Heteroptera). **Protoplasma**, v. 32, p. 142-148, 1986.

SANTOS, J.; SENTIS, C.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J. Pattern of nucleolar organizer region activity during male meiosis in *Callicrania seoanei* (Orthoptera) as analyzed by silver staining: evidences for a possible reactivation in the period between the two meiotic divisions. **Genome**, v. 29, p. 516-518, 1987.

SCHRADER, F. Notes on the mitotic behaviour of long chromosomes. **Cytologia** (Tokio), v. 6, p. 422-430, 1935.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitoses in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **Journal of Morphology**, v. 67, p. 123-141, 1940.

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.

SMITH, R.L. Evolution of paternal care in the giant waterbugs (Hemiptera: Belostomatidae). In: Choe JC, Crespi BJ (eds) **The Evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids Sociality**, Cambridge UniversityPress, Cambridge pp 116–149, 1997.

SOLARI, A.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microscopia Eletrônica y Biología Celular**, v. 11, p. 179-195, 1987.

SOUZA, H. V.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA L. A. A.; ITOYAMA, M. M. A study of meiosis and spermatogenesis in different testicular lobes of *Antiteuchus tripterus* (Heteroptera, Pentatomidae). **European Journal of Entomology**, v. 104, p. 353-362, 2007a.

SOUZA, H.V.; BICUDO, H. E. M. C.; ITOYAMA, M.M. Study of chromosomal and nucleolar aspects in testes of *Nysius californicus* (Heteroptera: Lygaeidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 1, p. 33-40, 2007b.

SOUZA, H.V.; ARAKAKI, R.L.M.; DIAS, L.; MURAKAMI, A.S.; COSTA, L.A.A.; BICUDO, H.E.M.C.; ITOYAMA, M.M. Cytogenetical Aspects of Testicular Cells in Economically Important Species of Coreidae Family (Heteroptera). **Cytologia**, v. 72, p. 49-56, 2007c.

SOUZA, H. V.; CASTANHOLE, M. M. U.; BICUDO, H. E. M. C.; COSTA, L. A. A.; ITOYAMA, M. M. Morphological patterns of the heteropycnotic chromatin and nucleolar material in meiosis and spermiogenesis of *Mormidea quinqueluteum*, *Oebalus poecilus* and *Oebalus ypsilon-griseus* (Heteroptera, Pentatomidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n. 3, p. 686-691, 2008.

STANLEY, H.P. Fine structure of spermiogenesis in the elasmobranch fish *Squalus suckleyi* I. Acrosome formation, nuclear elongation and differentiation of the midpiece axis. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 36 p. 86-102, 1971.

SZOLLOSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* I. Abnormalities in differentiation of cytoplasmic organelles. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 54 p. 202-214, 1976a.

SZOLLOSI, A. Influence of infra-optimal breeding temperature on spermiogenesis of locust *Locusta migratoria* II. Abnormalities in differentiation of the nucleus. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 54 p. 215-223, 1976b.

SUJA, J.A.; DEL CERRO, A.L.; PAGE, J.; RUFAS, J.S.; SANTOS, J.L. Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. **Chromosoma**, v. 109, p. 35-43, 2000.

TAKENOUCHI, Y.; MURAMOTO, N. A study of the chromosomes in three species of heteropteran insects (Anthocoridae and Veliidae: Heteroptera). (In Japanese). **Journal of Hokkaido University of Education**, IIB, v. 22, p. 23-25, 1971.

TALLAMY, D. W. Sexual selection and the evolution of exclusive paternal care in arthropod. **Animal Behaviour**, v. 60 p. 559-567, 2000.

TANDLER, B.; HOPPEL, C. Mitochondria in spermatogenesis. In: TANDLER, B.; HOPPEL, C. Mitochondria, 1^a Ed., New York and London, Academic Press, p. 36-39, 1972.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.J.V. Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera: Reduviidae) as analysed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

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

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

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

TRANDABURU, V. The acrosome and the centriole adjunct in *Eurydema ventralis* Kol. (Heteroptra, Pentatomidae). **Travaux Du Muséum National D'Histoire Naturelle Grigore Antipa**, v. 13 p. 137-145, 1973.

UESHIMA, N. **Animal cytogenetics**, Insecta 6, Hemiptera: Heteroptera. Gebruder Borntraeger: Berlin, Stuttgart, 117 pp., 1979.

UESHIMA, N and ASHLOCK, P.D. Cytotaxonomy of the Lygaeidae (Heteroptera). Univ. Kans. Sci. Bull. v. 51, p. 717-801, 1980

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

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

WERNER G.; AFZELIUS, B.A.; MOSLER B. Acrosome formation during spermiogenesis in *Notonecta glauca* L. (Heteroptera). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 20 n. 1 p. 123-35, 1988.

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

WHITE, M.J.D., **Animal Cytology and Evolution**. 3rd ed. Cambridge University Press, London, 961 pp., 1973.

WILSON, E.B. Studies of chromosomes II. The paired microchromosomes, idiochromosomes and heterotrophic chromosomes in Hemiptera. **The Journal of Experimental Zoology.** , v. 2, p. 507-545, 1905.

WOLF, K.W. Acetylation of α -tubulin in male meiotic spindles of *Pyrrhocoris apterus*, an insect with holocentric chromosomes. **Protoplasma**, v. 191, p. 148-157, 1996.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E; NEILL, J. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, p. 135-185, 1988.

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

YOSHIDA, T. Unusual type of the nucleolus observed in a bug, *Acanthocoris sordidus*. **Journal of the Faculty of Science- Hokkaido University.** (Zool.), v. 9, p. 243-249, 1947.

VII. RESUMO

No presente trabalho verificamos que os testículos possuem morfologias diferentes podendo ser arredondados, arredondados/espiralados ou alongados/espiralados. Com relação à morfometria das células em prófase I, *B. micantulum* e *R. zela* foram as que apresentaram as menores células, *G. f. flavus* foi a que apresentou maior tamanho e *R. c. crassifemur* e *M. brasiliensis* apresentaram tamanho intermediário. A avaliação da espermatogênese nos permitiu concluir que as características observadas são semelhantes às das outras espécies de Heteroptera, descritas na literatura, diferindo apenas com relação à morfologia dos testículos, o número de cromossomos e o sistema cromossômico do sexo. A análise das ultraestruturas observadas durante a espermatogênese de *Gelastocoris flavus flavus* e *Martarega uruguayensis* mostraram a presença de várias mitocôndrias pequenas e uniformemente distribuídas pelo citoplasma em células em profase I, de ambas espécies, que foram se unindo formando o complexo mitocondrial, que possui no seu interior as mitocôndrias enoveladas, posteriormente este complexo mitocondrial se divide em duas estruturas denominadas derivados mitocondriais, que se dispõem bilateralmente ao axonema. O axonema dessas espécies possui o padrão de 9+9+2. A formação do acrossomo inicia-se nos primeiros estágios da espermiogênese sendo composto de muitas vesículas acrossomais que se unem formando uma única estrutura, sendo observada regiões e algumas estruturas mais coradas em seu interior. Basicamente o processo de espermiogênese não diferiu entre as duas espécies analisadas.

Palavras-Chave: Citogenética de Heteroptera, lobos testiculares, meiose, espermiogênese, acrossomo, derivado mitocondrial, axonema, nucléolo.

VIII. ABSTRACT

In this study, we found different morphologies for testes of the Heteroptera species *Belostoma anurum*, *B. micantulum*, *Gelastocoris angulatus*, *G. flavus flavus*, *Rheumatobates crassifemur crassifemur*, *Buenoa amnigenus*, *B. unguis*, *Martarega brasiliensis*, *M. membranacea*, *M. uruguayensis*, *Rhagovelia tenuipes* and *R. zela*. They can be round, round/spiral and elongated/spiral. The size of prophase I cells also varied, being the smallest ones detected in *B. micantulum* and *R. zela*, the largest in *G. f. flavus*, and the intermediate in *R. c. crassifemur* and *M. brasiliensis*. The analyses of spermatogenesis allowed us to conclude that, in the studied species, the features are similar to those of other previously described Heteroptera species, differing only as to the testicular morphology, the chromosome number, and the sex chromosome system. Ultrastructural analysis of the spermatogenesis showed several small mitochondria evenly distributed throughout the cytoplasm, in cells at prophase I of *G. f. flavus* and *M. uruguayensis*. The small mitochondria joined to form the mitochondrial complex. Later, this mitochondrial complex divided into two structures called mitochondrial derivatives, located bilaterally to the axoneme. The axoneme of these species showed the flagellar pattern 9+9+2. The acrosome started to be formed in the early stages of spermiogenesis, being composed of many acrosome vesicles that join to form a single structure. Some regions within this structure were more strongly stained. Basically the process of spermiogenesis did not differ between the species *G. f. flavus* and *M. uruguayensis*.

Keywords: Cytogenetics of Heteroptera, testicular lobes, meiosis, spermiogenesis, acrosome, mitochondrial derivative, axoneme, nucleolus.