

MICHELLE CARVALHO MAIA

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES EM TRIATOMINAE
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

MICHELLE CARVALHO MAIA

**MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES EM TRIATOMINAE
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 28 DE AGOSTO DE 2009

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof. José Eduardo Serrão
(Co-orientador)

Prof. Vinícius Albano Araújo

Prof^a Karina Carvalho Mancini

Prof. José Lino Neto
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa vitória! Obrigada por me iluminar e proteger sempre.

Aos meus pais Miguel e Cornélia pelo amor, dedicação e esforço. Essa conquista seria impossível sem vocês.

A minha irmã Giselle pelo incentivo, apoio e preocupação.

Ao Rogério pelo companheirismo, amor e dedicação. Seu incentivo e apoio foram fundamentais nessa conquista.

A todos familiares e amigos que sempre estiveram presentes me incentivando nos momentos de dificuldades. Aos meus avós pelas orações, onde quer que estejam.

Ao meu orientador Prof José Lino Neto pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

Ao professor José Eduardo Serrão pela co-orientação e ensinamentos durante o curso.

Ao professor Clóvis Andrade Neves pela co-orientação, pelo exemplo de profissionalismo, muito obrigada pelo apoio e disponibilidade.

Aos professores Sérgio da Matta, Izabel Maldonado e Adilson Zacaro do laboratório de Biologia Estrutural pela convivência.

As Prof^a Sílvia Pompolo e Tânia Salomão pelos ensinamentos e convivência durante o curso.

Ao Prof Gustavo Martins e Prof^a Denilce Lopes pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Ao Vinícius Araújo por aceitar participar da banca, pela disponibilidade, grandes ensinamentos e paciência que foram essenciais para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

A Prof^a Karina Carvalho Mancini por aceitar participar da banca, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento e aprendizado.

Um agradecimento especial a Cláudia, Max, Gláucia e Lamara pela grande ajuda, disponibilidade, apoio e amizade. Muito obrigada.

A Rita de Cássia e Ana Vitta da Fundação Oswaldo Cruz (René Rachou) por disponibilizar os barbeiros. Muito obrigada.

Alex, sempre disponível a ajudar, muito obrigada. A todos os colegas pela troca de experiências e ensinamentos: Ana Paula, Luis, Rejane, Maria Inês, Patrícia, Edson, Katiane, Sirlene, Marcília, Arlete, Sílvia, Reggiani, Jane, Kenner, Filipe, Fernando e todos que estiveram presentes no trabalho, nos estudos, nos momentos de descontração. Obrigada especialmente pela amizade, pela ajuda no experimento, pelos conselhos e pela alegria.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização dessa pesquisa. A todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte desse projeto, o meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Michelle Carvalho Maia, filha de Miguel Ferreira Maia e Cornélia Carvalho Maia, nasceu em Ipatinga, Minas Gerais, em 02 de agosto de 1973.

Em julho de 1999, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Durante a graduação foi estagiária do laboratório de Zoologia de Invertebrados e lecionava em escolas públicas da região.

Em fevereiro de 2002 concluiu o mestrado em Comportamento e Ecologia Animal pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). No ano de 2003 começou a lecionar no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UNILESTE-MG) na cidade de Ipatinga – MG. No ano de 2005 iniciou o doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em agosto de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução Geral.....	01
1.1. Sistemática em Insetos.....	01
1.2. Ordem Hemiptera (Subordem Heteroptera).....	02
1.3. Morfologia dos espermatozóides	04
1.4. Referências Bibliográficas.....	06
2. Objetivos.....	09
3. Capítulos.....	10
3.1. Capítulo 1: Polimorfismo de espermatozóides em Triatominae (Reduviidae: Hemiptera).....	10
3.2. Capítulo 2: Morfologia dos espermatozóides de <i>Triatoma vitticeps</i> Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae), com ênfase na transição núcleo- flagelo.....	23
4. Conclusões Gerais.....	39

RESUMO

MAIA, Michelle Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009.
Morfologia dos espermatozóides em Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).
Orientador: José Lino Neto. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e José Eduardo Serrão.

A sistemática é a ciência que estuda a diversidade de forma dos organismos propiciando um resgate de informações e fornecendo um prognóstico da distribuição das características existentes entre eles. Os espermatozóides possuem diversidades morfológicas que podem ser usadas na distinção de táxons e em análises filogenéticas, pois estas células podem variar na forma, tamanho e ultra-estrutura, principalmente, entre os diferentes táxons. Quando tais variações ocorrem na mesma espécie, trata-se de um fenômeno conhecido como polimorfismo. Neste trabalho, verificou-se a ocorrência de espermatozóides polimórficos em *Triatoma brasiliensis*, *T. vitticeps*, *Rhodnius nasutus* e *R. neglectus* e descreveu-se a ultra-estrutura dos espermatozóides de *T. vitticeps*. Para isso, utilizamos as microscopias de luz e eletrônica de transmissão. Nos Triatominae aqui estudados foram encontrados dois tipos de espermatozóides, diferenciando nos comprimentos total e nuclear. A análise ultra-estrutural dos espermatozóides de *Triatoma vitticeps* aponta vários caracteres sinapomórficos para Heteroptera, como: (1) o axonema parcialmente envolvido por dois derivados mitocondriais, (2) presença de duas estruturas em forma de âncora, ligando cada derivado mitocondrial ao material intertubular e (3) ocorrência de dois corpos paracristalinos em cada derivado mitocondrial. Essas características certamente poderão ser usadas na sistemática da ordem Hemiptera.

ABSTRACT

MAIA, Michelle Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2009.
Morphology of spermatozoa in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Advisor:
José Lino-Neto. Co-advisors: Clóvis Andrade Neves and José Eduardo Serrão.

Systematics is a science which studies the diversity of organism forms promoting the collection of information and providing a prognosis of the distribution of traits among organisms. The spermatozoa possess diverse morphologies which can be used for distinction of taxa and in phylogenetic analyses since these cells can vary in form, size and ultrastructure, principally between different taxa. When these variations occur within the same species, it is treated as a phenomenon called polymorphism. In this study, the occurrence of polymorphic spermatozoa was verified in the *Triatoma brasiliensis*, *T. vitticeps*, *Rhodnius nasutus* e *R. neglectus* and the ultrastructure of spermatozoa from *T. vitticeps* were characterized. For this procedure, optical microscopy and transmission electron microscopy were utilized. In the Triatominae studied here, two types of spermatozoa were encountered, differentiated by their total and nuclear lengths. The ultrastructural analysis of spermatozoa from *Triatoma vitticeps* indicates various synapomorphic traits for Hemiptera such as: (1) the axoneme partially covered by two mitochondrial derivatives, (2) the presence of two anchor shaped structure, connecting each mitochondrial derivatives to the intertubular material and (3) the occurrence of two paracrystalline bodies in each mitochondrial derivatives. These characteristics can certainly be used for phylogenetic studies of the order Hemiptera.

1. Introdução Geral

1.1. Sistemática em Insetos

A sistemática é a ciência que estuda a diversidade de forma dos organismos e envolve tanto as questões de classificação das espécies (taxonomia) quanto as suas relações de parentesco (filogenia). Trabalhos envolvendo sistemática propiciam um resgate de informações e refletem as relações entre os organismos, fornecendo um prognóstico da distribuição das características existentes entre eles (Triplehorn & Jonhson, 2005). Há vários trabalhos envolvendo a sistemática dos insetos, organismos de indiscutível importância para os ecossistemas em especial por constituírem o grupo mais diverso da fauna atual. Cerca de um milhão de espécies já foram descritas e estimativas apontam para aproximadamente cinco milhões de espécies atuais (Gaston, 1991).

As principais características atribuídas ao grande sucesso evolutivo dos insetos são: a longevidade de suas linhagens, o número de espécies, a diversidade de suas adaptações e seu impacto ecológico. O grande desafio dos entomologistas sistematistas é reconstruir a história evolutiva e explicar o sucesso adaptativo desses organismos em uma esfera de existência de cerca de 400 milhões de anos (Grimaldi & Engel, 2005). Atualmente, a reconstrução da filogenia é baseada em teste de congruência entre identidades topológicas que são, preferencialmente, homologias morfológicas, comportamentais ou moleculares (Grimaldi & Engel, 2005). As homologias observadas são analisadas cladisticamente e divididas em apomorfias (características derivadas) e plesiomorfias (características ancestrais). Caracteres derivados compartilhados pelos membros do grupo são chamados sinapomorfias (Triplehorn & Jonhson, 2005).

Existem vários modelos computacionais para reconstrução da filogenia, elaborados para resolver problemas particulares de análises baseadas em caracteres específicos (proteínas, morfologia, seqüências de DNA). Embora a análise de dados morfológicos e/ou moleculares tenha resolvido muitas questões sistemáticas de vários grupos de insetos, ainda existem várias questões não elucidadas. Novos caracteres estão sendo usados e inferidos nas análises como, por exemplo, aqueles obtidos em estudos morfológicos do sistema reprodutor interno e dos espermatozóides (Baccetti & Dallai, 1978; Sivinski, 1984; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999).

1.2. Ordem Hemiptera: Subordem Heteroptera

A ordem Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos que variam consideravelmente em tamanho, forma do corpo e hábitos alimentares. Atualmente são descritas cerca de 67.500 espécies distribuídas por todo o mundo (Triplehorn & Johnson, 2005). Compreende um grupo monofilético que se distingue dos outros insetos por possuírem peças bucais adaptadas à perfuração e sucção, alojadas em uma longa tromba ou bico, tanto na forma adulta como em ninfas (Schuh & Slater, 1995).

Atualmente quatro subordens de Hemiptera são aceitas: Heteroptera, Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha (Bourgoin et al., 1997). A diversidade da ordem é relacionada à radiação das angiospermas. A eficiência na alimentação em plantas é atribuída à estrutura das partes bucais, a qual também possui algumas pré-adaptações para a predação.

Os Heteroptera abrange cerca de 25.000 espécies conhecidas como percevejos. A maioria das espécies são fitófagas, alimentando de seiva e outros

sucos produzidos pelas plantas, mas existem algumas espécies hematófagas (alimentam-se de sangue) ou entomófagas (predadores de outros insetos) (Triplehorn & Jonhson, 2005). Dentre os Reduviidae, os Triatominae tem 137 espécies descritas e estas apresentam hábito hematófago (Galvão et al., 2003) de interesse médico, já que são potenciais vetores do parasito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas (Schmunis, 1999).

A doença de Chagas é considerada um dos mais importantes problemas de saúde na América Latina, afetando 16 milhões de indivíduos e cerca de 20.000 caso/ano em 18 países da América do Sul e Central (W.H.O., 1991; Schmunis, 1999). Essa enfermidade está relacionada a fatores ambientais e sociopolíticos (migrações, moradia, educação e ação antrópica sobre a natureza). Sua transmissão depende basicamente da domiciliação do vetor originário de ecótopos silvestres ou introduzido na casa por ação humana. A doença de chagas pode apresentar conseqüências graves e um tratamento difícil, mas boas possibilidades de controle. Como afeta indivíduos e regiões pobres, necessita de ação do Estado que envolva educação, participação e políticas públicas de modo a assegurar atenção médica e prevenção (Dias, 2001).

A provável linha de evolução dos triatomíneos vem há muito tempo sendo pesquisada, existindo ainda importantes questões sistemáticas e filogenéticas que permanecem sem respostas. Uma das teorias propõe uma origem monofilética para o grupo, pressupondo que os triatomíneos provêm de um único ancestral predador (Hypsa et al., 2002; Lent & Wygodzinsky, 1979); enquanto que outra teoria, polifilética, acredita que os triatomíneos teriam se originado de diferentes linhagens de reduvídeos predadores que convergiram para hábito hematofágico, em diferentes períodos evolutivos (Schofield, 2000).

1.3. Morfologia dos espermatozóides

Os espermatozóides estão entre os tipos celulares cuja morfologia tem sido usada para distinguir táxons e analisar relações filogenéticas (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999; Lino-Neto et al., 2008; Zama et al., 2007). Estas células podem apresentar variações quanto à forma, o comprimento e às características ultra-estruturais. Maiores variações têm sido observadas nos invertebrados, principalmente nos insetos (Sivinski, 1984; Jamieson et al., 1999). Na maioria dos insetos, praticamente não há diferenças morfológicas entre os espermatozóides de uma mesma espécie. Entretanto, cada vez mais se tem encontrado espécies apresentando dois ou mais tipos morfológicos de espermatozóides (polimorfismo). As diferenças podem ser na estrutura e/ou comprimento, sendo este último o mais comum (Jamieson et al, 1999).

No Chalcidoidea *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera) foi observado a produção de cinco diferentes tipos de espermatozóides (Lee & Wilkes, 1965). Nos Diptera, *Drosophila obscura* (Snock & Karr, 1998), *D. teissieri* e *D. yakuba* são produzidos dois tipos de espermatozóides. Snock & Karr (1998) observaram que em *D. obscura* apenas o tipo longo participa da fertilização do ovócito. Em Lepidoptera são produzidos dois tipos de espermatozóides, um nucleado (eupirene) e outro anucleado (apirene), os quais possuem morfologia e funções diferentes (Hamon & Chauvin, 1992). Dentro dos Hemiptera, apenas algumas espécies de Auchenorrhyncha (Cicadidae) (Kato, 1956; Kubo-Irie et al, 2003; Chawanji et al., 2005, 2006) e Heteroptera (Pentatomidae, Largidae) (Schrader & Leuchtenberger, 1950; Araújo, 2009) tiveram seus espermatozóides descritos, nas quais, esses mesmos autores, verificaram a ocorrência de polimorfismo de espermatozóides referente ao comprimento da célula. Em Pentatomidae, algumas espécies produzem

espermatozóides de três tamanhos (Schrader & Leuchtenberger, 1950). Em *Largus rufipennis* (Largidae) e na espécie *Graptopsaltria nigrofuscata* (Kato, 1956) (Cicadidae) foi observado a produção de espermatozóides de dois tamanhos (Kubori et al., 2003; Araújo, 2009).

Embora ainda seja desconhecido se o polimorfismo de espermatozóides tenha algum papel, há autores que atribuem a ele a competição entre estas células pela fertilização (Swallow and Wilkinson, 2002). Em Lepidoptera é proposto um mecanismo de eliminação do espermatozóide precedente pela retirada dele do órgão de estoque. A morfologia muito simplificada dos espermatozóides apyrene e o predomínio sobre os espermatozóides eupyrenes, sua ativação imediata durante a ejaculação e conseqüente rápida migração para a espermateca, sugerem que eles podem agir desarmando algum espermatozóide de acasalamentos anteriores (Silberglied et al., 1984; Otronen, 1997; Cordola-Aguilar, 1999). O polimorfismo implica em espermatozóides com diferentes custos de produção, sendo que as células inférteis de baixo investimento serviriam para encher a espermateca da fêmea e, dessa forma, impedir a entrada do ejaculado de machos em cópulas subsequentes (Sugawara, 1979; Silberglied et al., 1984; Otronen, 1997).

Nos Heteroptera, os espermatozóides exibem morfologia similar àquela observada na maioria dos insetos que são: alongados, têm diâmetro reduzido e duas regiões distintas: a cabeça e o flagelo (Jamieson et al., 1999). A cabeça é constituída pelo acrossomo e o núcleo ambos alongados. O flagelo possui um axonema, com padrão de 9+9+2 microtúbulos, flanqueado geralmente por dois corpos acessórios e dois derivados mitocondriais. Estes últimos podem ser simétricos ou assimétricos e conter uma região de matriz paracristalina (Phillips, 1970; Baccetti, 1972). Entretanto, os espermatozóides em Heteroptera apresentam

algumas sinapomorfias que não são observadas nos outros insetos, como por exemplo, dois ou três regiões paracristalinas nos derivados mitocondriais e pontes entre estes e dois dos microtúbulos axonemais (Dallai & Afzelius, 1980; Bão & De Souza, 1994; Mercati et al., 2009).

1.4. Referências Bibliográficas

- Araújo, V.A. 2009. *Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de Hymenoptera e Hemiptera (Insecta) e suas possíveis contribuições para a sistemática*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 133p.
- Bacetti, B. 1972. Insect Sperm Cells. *Advances in Insect Physiology*, **9**: 315–397.
- Bacetti, B. and Dallai, R. 1978. The evolution of myriapod spermatozoa. *Abh. Verh. Naturwiss. Ver Hamburg* 21: 203-217.
- Bão, S.N. and DeSouza, W. 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Tissue & Cell* 26: 299-308.
- Bourgoin, T.J. Steffan-Campbell, D. and Campbell, B.C. 1997. Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Auchenorrhyncha). The enigmatic Tettigometridae: Evolutionary affiliation and historical biogeography. *Cladistics* 13: 207-224.
- Chawanji, A.S. Hodgson, A.N. and Villet, M.H. 2005. Sperm morphology in four species of African platyleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue & Cell* 37: 257–267.
- Chawanji, A.S. Hodgson, A.N. and Villet, M.H. 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38: 373–388.
- Cordola-Aguilar, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266: 779-784.
- Dallai, R. and Afzelius B.A. 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *Journal of Morphology* 164: 301-309.
- Dias, J.C.P. 2001. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. *Caderno Saúde Pública* 17: 165-169.

- Galvão, C. Carcavallo, R. Roche, D.S. and Jurberg, J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gaston, K. L. 1991. The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology* 5: 283-296.
- Grimaldi, D.A. and Engel, M.S. 2005. Evolution of insects. Cambridge University Press, Cambridge, 755p.
- Hamon, C. and Chauvin, G. 1992. Ultrastructural analysis of spermatozoa of *Korscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera: Hepialidae) and *Micropterix calthella* L. (Lepidoptera: Micropterigidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 21: 149-160.
- Hypša, V. Tietz, D.F. Zrzavý, J. Rego, R.O.M. Galvão, C. and Jurberg, J. 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447-457.
- Jamieson, B.G.M. 1987. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, p. 319.
- Jamieson, B.G.M. Dallai, R. Afzelius, B.A. 1999. Insects: Their spermatozoa and phylogeny. *Science Publishers*, New Hampshire, 554.
- Kato, M. 1956. The biology of the cicadas. [*Bulletin of the Cicadidae Museum*]. Jinbocho Kanda, Tokyo : Iwasaki Shoten pp. 319.
- Kubo-Irie, M. Irie, M. Nakazawa, T. and Mohri, H. 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 49: 983–991.
- Lee, P.E. and Wilkes, A. 1965. Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science* 147: 1445–1446.
- Lent, H. and Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera - Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123-520.
- Lino-Neto J. Dolder, H. Mancini, K. Mercati, D and Dallai, R. 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue Cell* 40: 185-193.
- Mercati, D. Giusti, F. and Dallai, R. 2009. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). *Journal of Morphology* 270: 825-833.
- Otronen, M. 1997. Variation in sperm precedence during mating in male flies, *Dryomyza anilis* *Animal Behavior* 53: 1233-1240.

- Philipps, D.M. 1970. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 44: 243-277.
- Quicke, D.L.J. Ingram, S.N. Baillie, H.S. and Gaitens, P.V. 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologia Scripta* 21: 381-402.
- Schmunis, G.A. 1999. A Tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* (Z. Brener, A. A. Andrade & M. Barral-Netto, org.), pp. 1-15, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora.
- Schofield, C.J. 2000. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16: 89-92.
- Schrader, F. and Leuchtenberger, C. 1950. A citochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Experimental Cell Research* 1: 421-452.
- Schuh, R.T. and Slater, J.A. 1995. The bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press, NY.
- Silberglied, R.E. Shepherd, J.G. Dickinson, J.L. 1984. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera? *American Naturalist* 63: 255-265.
- Snock, R.R. and Karr, T.L. 1998. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Current Biology* 8: 291-2.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), Sperm competition and the evolution of animal mating systems. Academic Press, New York, 85–115.
- Swallow, J.G. and Wilkinson, G.S. 2002. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biological Reviews* 77: 153–182.
- Sugawara, T. 1979. Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly, *Pieris rapae crucivora*, and its role in behavior. *Journal of Comparative Physiology A* 130: 191-199.
- Triplehorn, C.A. and Johnson, N. 2005. Introduction to the study of insects. Belmont, Califórnia, Thomson Brooks/Cole.
- WHO (World Health Organization), 1991. *Control of Chagas Disease*. Technical Report Series 811. Geneva: WHO.
- Zama, U. Moreira, J. Bão, S. N. Campos, L.A.O. Dolder, H and Lino-Neto, J. 2007. Morphology of testicular and post-testicular spermatotozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pempredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod. Struct. Dev.* 36: 304-316.

2. Objetivos

- Descrever a estrutura dos espermatozóides das espécies *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma brasiliensis* e *T. vitticeps* e a ultra-estrutura dos espermatozóides de *T. vitticeps*, contribuindo para a sistemática de Triatominae.
- Verificar o número de espermatozóides por cisto de *Triatoma vitticeps*.
- Comparar os dados de estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides das espécies descritas neste trabalho, com aqueles existentes na literatura, procurando caracteres que possam ser incluídos em análises filogenéticas.

Capítulo 1

3.1. Polimorfismo de espermatozóides em alguns Triatominae (Reduviidae: Hemiptera)

1. Introdução

Os Hemiptera compreende um grupo diversificado de insetos que variam consideravelmente em tamanho, forma do corpo e hábitos alimentares. É dividida em quatro subordens: Heteroptera, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha. Das mais de 40 famílias de hemípteros, apenas duas de Heteroptera apresentam espécies com hábito hematofágico: Cimicidae e Reduviidae (Triplehorn & Johnson, 2005). Dentro da família Reduviidae, a subfamília Triatominae compreende cerca de 137 espécies (Galvão et al., 2003) de interesse médico, já que são potenciais vetores do parasito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas, que acomete aproximadamente 12 milhões de pessoas nas Américas (Schmunis, 1999).

A seleção natural agiu na motilidade, morfologia e ornamentação de gametas masculinos dos insetos (Sivinski, 1984), sendo comumente observadas variações interespecíficas na forma, tamanho e ultra-estrutura dos espermatozóides (Sivinski, 1984; Quicke et al., 1992; Jamieson et al., 1999). Algumas espécies de insetos produzem dois ou mais tipos de espermatozóides, que podem diferir em tamanho, forma ou número de cromossomos, fenômeno conhecido como polimorfismo de espermatozóide. Geralmente, nestes casos, somente um dos tipos é capaz de fertilizar os ovócitos (Birkhead & Møller, 1998; Simmons, 2001).

Polimorfismo espermático ocorre em várias ordens de insetos (Jamieson et al., 1999). No Chalcidoidea *Dahlbominus fuscipennis* (Hymenoptera) foi observado a produção de cinco diferentes tipos de espermatozóides (Lee & Wilkes, 1965). Nos Diptera, *Drosophila obscura* (Snock & Karr, 1998), *D. teissieri* e *D. yakuba* são produzidos dois tipos de espermatozóides. Snock & Karr (1998) observaram que em

D. obscura apenas o tipo longo participa da fertilização do ovócito. Em Lepidoptera são produzidos dois tipos de espermatozóides, um nucleado (eupirene) e outro anucleado (apirene), os quais possuem morfologia e funções diferentes (Hamon & Chauvin, 1992).

Entre os Hemiptera, a ocorrência de espermatozóides polimórficos foi descrita pela primeira vez em Pentatomidae (Heteroptera) (Montgomery, 1898), com algumas espécies que produzem espermatozóides de três tamanhos. Em *Largus rufipennis* (Largidae) foi observado a produção de espermatozóides de dois tamanhos (Araújo, 2009). Polimorfismo foi também constatado em Auchenorrhyncha, na espécie *Graptopsaltria nigrofuscata* (Kato, 1956), na qual se observou, posteriormente, que apenas os espermatozóides de núcleos mais longos fertilizavam os ovócitos (Kubo-Irie et al., 2003).

Neste trabalho, descrevemos a ocorrência de espermatozóides polimórficos em Triatominae, número de espermatozóides por cisto e a relação entre o tamanho de espermatozóides e a sua produção nos diferentes folículos testiculares. Com isso buscamos contribuir para o conhecimento da biologia reprodutiva, bem como levantar caracteres que possam ser usados na taxonomia dos Reduviidae e dos Heteroptera, como um todo.

2. Material e Métodos

No total, vinte indivíduos sexualmente maduros de *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954), *R. nasutus* (Stal 1958), *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) e *T. brasiliensis* (Neiva, 1911) foram utilizados para a realização desse trabalho. Esses insetos foram procedentes de colônias mantidas em laboratórios da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, Brasil. Os espécimes de *R. nasutus* foram cedidos pelo Laboratório de Biologia e Controle de Insetos Vetores do Departamento de Biologia (Fiocruz – RJ), e os espécimes de *R. neglectus*, *T. brasiliensis* e *T. vitticeps*, pelo setor de Morfologia, Ultra-estrutura e Bioquímica de Artrópodes e Parasitas do Departamento de Entomologia (Fiocruz – RJ) e Laboratório de Triatomíneos (René Rachou – BH).

Microscopia de luz

Para as medidas, suspensão de espermatozóides, extraídos das vesículas seminais, foi espalhada em lâminas histológicas e fixada por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio e 50 espermatozóides para cada espécie foram fotografados para serem medidos. Para medir os núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 0.2 µg/ml em PBS, lavadas e montadas em sacarose 50%. Essas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm e foram fotografados 50 núcleos para cada espécie. Para a morfometria foi utilizado o programa de análise de imagem “Image-Pro Plus”, versão 4.5 para Windows 98.

Para contar o número de espermatozóides por cisto, machos adultos de *T. vitticeps* foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2 e os folículos testiculares (sendo três curtos e quatro longos) foram fixados por 12 horas em solução de glutaraldeído a 2,5%. Em seguida, eles foram lavados no mesmo tampão, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas, desidratados em uma série alcoólica crescente e incluídos em Histoiresina. Cortes de 2 μ m colocados sob lâminas histológicas, foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e montados em sacarose 50%. As imagens de cistos, dos dois tipos de folículos, foram capturadas com uma câmera digital acoplada a um microscópio estereoscópico (Olympus BX-60).

Para verificar se há relação entre o tamanho dos espermatozóides e os folículos testiculares, espermatozóides de *T. vitticeps* extraídos dos folículos longos e curtos foram espalhados em lâminas histológicas. Estas foram fixadas por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, lavadas e secas a temperatura ambiente. Para identificar os espermatozóides (se pequeno ou grande), os núcleos foram corados com DAPI (conforme protocolo acima), observados e fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm.

As medidas foram analisadas empregando-se estatística descritiva e inferencial. Para análise estatística, foi utilizado o software *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, versão 11.0. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão. Foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes para comparação das médias entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5%, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

Nos Triatominae, *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma vitticeps* e *T. brasiliensis*, foram encontrados dois tipos de espermatozóides, com diferença no comprimento total e nuclear. Entre estas espécies, *T. brasiliensis* apresentou maior diferença de tamanho entre os dois tipos de espermatozóides (Fig. 1). Os valores do comprimento dos espermatozóides e dos núcleos estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Nas quatro espécies, observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os dois tipos de espermatozóides, tanto no comprimento total como nuclear (tabelas 1 e 2). A maior e a menor diferença nos comprimentos totais foram observadas, respectivamente, em *T. brasiliensis* (705 μm e 273 μm) e *T. vitticeps* (398 μm e 304 μm) (tabelas 1 e 4).

Os comprimentos totais dos espermatozóides maiores, bem como os dos menores, são significantemente diferentes quando comparados entre as quatro espécies (tabela 3). Quanto aos núcleos, diferença significativa foi observada apenas quando comparados os maiores entre os *Triatoma* (tabela 3). Ainda, apenas nas espécies desse gênero, observou-se diferença acentuada entre as razões: comprimentos dos núcleos e o dos espermatozóides correspondentes; espermatozóide menor e maior; e núcleo menor e maior (tabela 4).

Apesar de, em *T. vitticeps*, os folículos longos e curtos produzirem os dois tipos de espermatozóides, observamos que preferencialmente os folículos longos produzem espermatozóides menores e os folículos curtos, espermatozóides maiores.

A mediana do número de espermatozóides encontrado em cada cisto de *T. vitticeps* foi de 939 (Fig. 2).

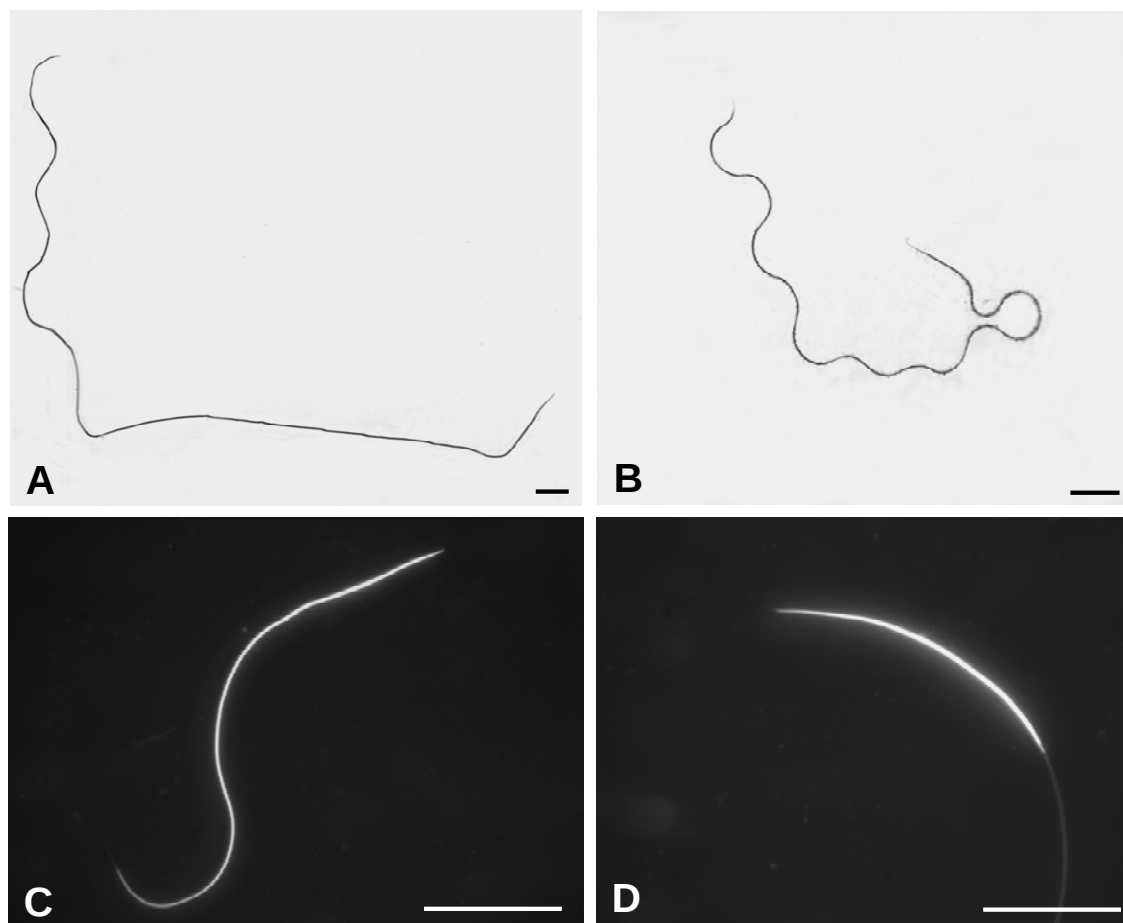


Figura 1. Micrografia do espermatozóide de *Triatoma brasiliensis*. **A-B.** Em contraste de fase, do tipo maior (A) e do tipo menor (B). **C-D.** Fluorescência da região da cabeça do espermatozóide do tipo maior (C) e menor (D), mostrando núcleos corados com DAPI. Barras A e B: 20 μm ; C e D: 10 μm

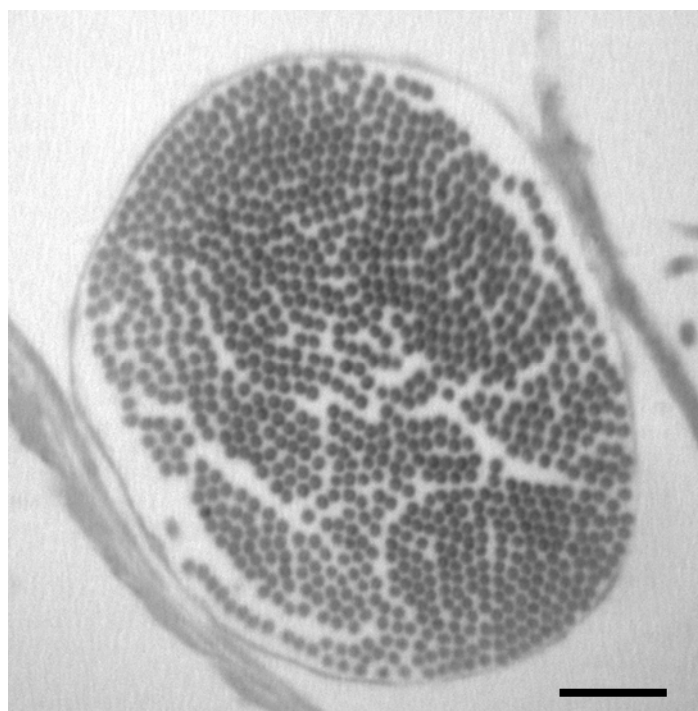


Figura 2. Cisto de *Triatoma vitticeps*, contendo 955 espermatozóides. Barra = 10 μm

Tabela 1. Média do comprimento dos espermatozóides (em μm) das espécies de Triatominae. Sptz1 = comprimento médio dos espermatozóides maiores; Sptz2 = comprimento médio dos espermatozóides menores.

Espécie	Sptz 1	Sptz 2	Valor p
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
<i>Rhodnius neglectus</i>	563,08 $\pm$ 18,03	238,37 $\pm$ 9,17	0,000*
<i>Rhodnius nasutus</i>	544,69 $\pm$ 20,97	253,73 $\pm$ 5,64	0,000*
<i>Triatoma vitticeps</i>	398,64 $\pm$ 22,24	304,64 $\pm$ 10,67	0,000*
<i>Triatoma brasilienses</i>	705,90 $\pm$ 145,97	273,31 $\pm$ 11,85	0,000*

Teste t Student *p $\leq$ 0,05

Tabela 2. Média do comprimento dos núcleos (em μm) dos espermatozóides das espécies de Triatominae. N1 = comprimento médio dos núcleos dos espermatozóides maiores; N2 = comprimento médio dos núcleos dos espermatozóides menores.

Espécie	N 1	N 2	Valor p
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
<i>Rhodnius neglectus</i>	21,88 $\pm$ 0,58	20,25 $\pm$ 0,61	0,000*
<i>Rhodnius nasutus</i>	21,93 $\pm$ 0,66	20,39 $\pm$ 0,49	0,000*
<i>Triatoma vitticeps</i>	50,06 $\pm$ 3,84	22,64 $\pm$ 3,04	0,000*
<i>Triatoma brasilienses</i>	42,7 $\pm$ 3,14	23,11 $\pm$ 2,26	0,000*

Teste t Student *p $\leq$ 0,05

Tabela 3. Média do comprimento dos espermatozóides e dos núcleos (em μm) maiores e menores entre as espécies de *Rhodnius* e entre as espécies de *Triatoma*. Sptz1 = comprimento médio dos espermatozóides maiores; Sptz2 = comprimento médio dos espermatozóides menores; N1 = comprimento médio dos núcleos dos espermatozóides maiores; N2 = comprimento médio dos núcleos dos espermatozóides menores.

	<i>R. neglectus</i>	<i>R. nasutus</i>		<i>T. vitticeps</i>	<i>T. brasilienses</i>	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Valor p	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	Valor p
Sptz 1	563,08 $\pm$ 18,03	544,69 $\pm$ 20,97	0,000*	398,64 $\pm$ 22,24	705,90 $\pm$ 145,97	0,000*
Sptz 2	238,37 $\pm$ 9,17	253,73 $\pm$ 5,64	0,000*	304,64 $\pm$ 10,67	273,31 $\pm$ 11,85	0,000*
N 1	21,88 $\pm$ 0,58	21,93 $\pm$ 0,66	0,554	50,06 $\pm$ 3,84	42,7 $\pm$ 3,14	0,000*
N 2	20,25 $\pm$ 0,61	20,39 $\pm$ 0,49	0,096	22,64 $\pm$ 3,04	23,11 $\pm$ 2,26	0,385

Teste t Student * p $\leq$ 0,05

Tabela 4. Razão entre as médias do comprimento dos espermatozóides e dos núcleos (em μm) das espécies de Triatominae. $N1/Sptz1$ = razão entre o comprimento médio dos núcleos e comprimento médio dos respectivos espermatozóides maiores; $N2/Sptz2$ = razão entre o comprimento médio dos núcleos e comprimento médio dos respectivos espermatozóides menores; $Sptz2/Sptz1$ = razão entre o comprimento médio dos espermatozóides menores e o comprimento médio dos maiores; $N2/N1$ = razão entre o comprimento médio do núcleo do espermatozóide menor e o comprimento médio do núcleo do espermatozóide maior.

Espécies	N1/Sptz1	N2/Sptz2	Sptz2/Sptz1	N2/N1
<i>Rhodnius neglectus</i>	0,0408	0,0850	0,4447	0,9255
<i>Rhodnius nasutus</i>	0,0402	0,0804	0,4658	0,9298
<i>Triatoma vitticeps</i>	0,1256	0,0743	0,7642	0,4523
<i>Triatoma brasilienses</i>	0,0605	0,0846	0,3872	0,5412

4. Discussão

A produção de mais de um tipo de espermatozóides, como observamos nos Triatominae *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma vitticeps* e *T. brasiliensis*, já foi encontrada em outros Hemiptera, como Pentatomidae (Schrader & Leuchtenberger, 1950), Cicadidae (Kato, 1956; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005) e Largidae (Araújo, 2009). Em todas as espécies, o poliformismo dos espermatozóides se deve a diferenças nos comprimentos totais e nucleares. Nestes triatomíneos, assim como em Largidae (Araújo, 2009) e no Cicadidae *Graptopsaltria nigrofuscata* (Kubo-Irie et al. 2003), ocorrem dois tipos de espermatozóides (dimorfismo). Entretanto, na família Pentatomidae (Schrader & Leuchtenberger, 1950) e na tribo Platypeurini (Cicadidae) (Chawanji, et al., 2005) os autores descrevem três tipos (maiores, médios e menores).

O número de espermatozóides por cisto é espécie-específico e determina o número de divisões celulares durante a espermatogênese, o qual tem sido usado como informação adicional na sistemática de insetos (Schiff et al. 2001; Lino-Neto et al., 2008). Em *T. vitticeps*, o número de espermatozóides por cisto foi de aproximadamente 890, logo, nesta espécie, ocorre oito ciclos mitóticos. Como esse mesmo número foi encontrado em Belostomatidae (Heteroptera) (Lee & Lee, 1992), possivelmente esse número seja constante entre Heteroptera, mas ainda é necessário ter essa informação para mais táxons.

Os triatomíneos possuem sete folículos testiculares com comprimento e largura variáveis e são classificados em três tipos: sendo dois longos e grossos, dois médios e grossos e três curtos e finos (Gonçalves et al., 1987; Freitas et al., 2008). Como em *T. vitticeps* os folículos longos e médios apresentam o mesmo diâmetro e

praticamente o mesmo comprimento, nós os classificamos em dois tipos: quatro longos e grossos e três curtos e finos. Nesta espécie, tanto os folículos longos quanto os folículos curtos produzem os dois tipos de espermatozóides. Em Pentatomidae, o número de folículos encontrado em cada testículo varia de 3 a 8 entre as espécies e, segundo Schrader & Leuchtenberger (1950), *Arvelius albopunctatus* (De Geer, 1773) possui seis folículos onde dois folículos menores produzem apenas espermatozóides maiores, um único folículo maior produz espermatozóides menores e os três restantes produzem espermatozóides de tamanho médio.

Trabalhos sobre morfometria de espermatozóides em Hemiptera demonstraram que as medidas do comprimento total e do núcleo podem ser usadas para separar tribos de Auchenorrhyncha (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005; 2006). Nesse trabalho, observamos que essas mesmas medidas podem ser usadas para separar gênero e até mesmo espécies da subfamília Triatominae.

Agradecimentos

Ao Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e Belo Horizonte; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Referências Bibliográficas

- Araújo, V.A. 2009. *Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de Hymenoptera e Hemiptera (Insecta) e suas possíveis contribuições para a sistemática*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 133p.
- Birkhead, T.R. and Møller, A.P. 1998. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, London 826.
- Chawanji, A.S.; Hodgson, A.N. and Villet, M.H. 2005. Sperm morphology in four species of african platyleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell* 37: 257–267.
- Chawanji, A.S.; Hodgson, A.N. and Villet, M.H. 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue and Cell* 38: 373–388.
- Freitas, S.P.C.; SantosMallet, J.R.; Costa, J.; Souza, A.L.B.; Serrão, J.E. and Gonçalves, T.C.M. 2008. A comparative study of testis follicles in species of *Triatoma* (Hemiptera, Triatominae). *Animal Biology* 58: 227-233.
- Galvão, C.; Carcavallo, R.; Roche, D.S. and Jurberg, J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gonçalves, T.C.M.; Lent, H. and Almeida, J.R. 1987. Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 82: 542-550.
- Hamon, C. and Chauvin, G. 1992. Ultrastructural analysis of spermatozoa f *Korscheltellus lupulinus* L. (Lepidoptera: Hepialidae) and *Micropterix calthella* L. (Lepidoptera: Micropterigidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 21: 149-160.
- Jamieson, B.G.M.; Dallai, R. and Afzelius, B.A. 1999. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny*. Science Publishers, New Hampshire, 554.
- Kato, M. 1956. The Biology of the Cicadas. [*Bulletin of the Cicadidae Museum*]. Jinbocho Kanda, Tokyo : Iwasaki Shoten pp. 319.
- Kubo-Irie, M.; Irie, M.; Nakazawa, T. and Mohri, H. 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 49 983–991.
- Lee, Y.H. and Lee, C.E. 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: Heteroptera) with special referente to phylogeny. *Zoological Science* 9: 971-981.

- Lee, P.E. and Wilkes, A. 1965. Polymorphic spermatozoa in the hymenopterous wasp *Dahlbominus*. *Science* 147: 1445–1446.
- Lino-Neto, J.; Dolder, H. Mancini, K. Mercati, D. and Dallai, R. 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphita). *Tissue and Cell* 40: 185-193.
- Quicke, D.L.J.; Ingram, S.N.; Baillie, H.S. and Gaitens, P.V. 1992. Sperm estructure and ultrastructure in the hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta* 21: 381-402.
- Schiff, N.; Flemming, A.J. and Quicke, D.L.J. 2001. Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: Symphyta): evidence for multiple increases in sperm bundle size. *Journal of Hymenoptera Research* 10: 119:125.
- Schmunis, G.A.A. 1999. Tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas (Z. Brener, A. A. Andrade & M. Barral-Netto, org.), 1-15, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora.
- Schrader, F. and Leuchtenberger, C. 1950. A citochemical analysis od the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Experimental Cell Research* 1: 421-452.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, New York, 85–115.
- Simmons, L.W. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Princeton University Press*, Princeton, NY.
- Snock, R.R. and Karr, T.L. 1998. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm- heteromorphic *Drosophila* species. *Current Biology* 8: 291-2.
- Triplehorn, C.A. and Johnson, N. 2005. *Introduction to the Study of Insects*. Belmont, Califórnia, Thomson Brooks/Cole.

Capítulo 2

3.2. Morfologia dos espermatozóides de *Triatoma vitticeps* Stal, 1859

(Hemiptera: Reduviidae), com ênfase na transição núcleo-flagelo.

1. Introdução

Os espermatozóides estão entre os tipos celulares mais diversificados, tanto na sua morfologia externa quanto nas características ultra-estruturais, e frequentemente fornecem caracteres para distinguir táxons e permitem inferências filogenéticas (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999). A diversidade maior é encontrada nos invertebrados, principalmente entre os insetos (Sivinski, 1984; Jamieson et al., 1999).

A ordem Hemiptera é dividida em quatro subordens: Heteroptera, Coleorrhyncha, Sternorrhyncha e Auchenorrhyncha. Das mais de 40 famílias de hemípteros apenas Cimicidae e Reduviidae (Heteroptera) apresentam espécies com hábito hematófago. O número de subfamílias em Reduviidae varia de 21 a 29, sendo que Triatominae é a única que realiza hematofagia, as demais são compostas por insetos predadores (Galvão et al. 2003). A espécie *Triatoma vitticeps* tem hábito silvestre com distribuição geográfica restrita aos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. Nos dois últimos estados vem crescendo a invasão de *T. vitticeps* no ambiente domiciliar e, freqüentemente, os indivíduos são encontrados com altas taxas de infecção por *Trypanosoma cruzi* (Correa 1986; Silveira et al. 1984).

Para análise sistemática em insetos, é necessário estudar um número representativo de táxons para que hipóteses filogenéticas possam ser sugeridas. Em Heteroptera, algumas espécies de Coridae, Pyrrhocoridae, Corixidae, Hidrometrydae, Pentatomidae, Plataspidae, Largidae e Reduviidae tiveram a ultra-estrutura dos espermatozóides descrita (Dallai e Afzelius, 1980; Dolder, 1988; Báó & DeSouza, 1994; Mercati et al., 2009; Araújo, 2009) e caracteres sinapomórficos

foram descritos para algumas famílias. Neste estudo, descrevemos a estrutura e ultra-estrutura dos espermatozóides de *T. vitticeps* buscando identificar caracteres que possam ser aplicados à sistemática de Heteroptera.

2. Material e Métodos

Os cinco machos sexualmente maduros de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859), utilizados neste trabalho, foram provenientes de colônias mantidas no Laboratório de Triatomíneos da Fundação Oswaldo Cruz (Instituto René Rachou – Belo Horizonte, MG)

Microscopia de luz

Suspensão de espermatozóides extraídos das vesículas seminais foi espalhada em lâminas histológicas e fixada por vinte minutos em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2. Após secar em temperatura ambiente, as lâminas foram observadas em fotomicroscópio e 50 espermatozóides foram fotografados para serem medidos. Para medir os núcleos, algumas lâminas foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 0.2 µg/ml em PBS, lavadas e montadas em sacarose 50%. Essas lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX-60) equipado com filtro BP360-370 nm e 50 núcleos foram fotografados.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os machos de *T. vitticeps* foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e os folículos testiculares foram separados. Estes foram fixados por 5 dias, a 4°C, em solução de ácido tânico a 1%, glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,2. Após lavados em água, os folículos foram contrastados em solução de acetato de uranila aquoso a 1% por 2 horas e, metade deles foi pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. Após lavagem rápida

em água, os folículos foram desidratados em série crescente de etanol, infiltrados e incluídos na resina Epon 812. Os cortes ultrafinos, contrastados com uranila a 3% e citrato de chumbo a 3%, foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss LEO 906) no Instituto de Biologias da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP.

3. Resultados

Triatoma vitticeps apresenta dois tipos de espermatozóides com diferenças no comprimento total e nuclear. Os espermatozóides do tipo menor e seu núcleo (Fig. 1A-B) medem em média, respectivamente, 300 μm e 23 μm de comprimento. Já os espermatozóides do tipo maior e seu núcleo medem, respectivamente, 400 μm e 50 μm de comprimento. O núcleo é linear, longo e preenchido por cromatina compacta (Fig. 1A-C). Sua extremidade posterior é afilada e termina na região anterior do axonema (Fig. 1C). O adjunto do centríolo é alongado, elétron denso (Fig 1C-E) e se estende paralelamente à extremidade posterior do núcleo (Fig.1C-I). Apresenta formato de meia-lua, em corte transversal, e é complementar ao núcleo (Fig. 1F). À medida que se aproxima da base do núcleo, se torna bifurcado (Fig. 1G), se associa aos dois derivados mitocondriais, um imediatamente antes do outro (Fig. 1D, E, H, I) e termina no início do axonema (Fig. 2A).

O flagelo consiste de um axonema e dois derivados mitocondriais (Fig. 2A). Anteriormente, o axonema começa junto à ponta afilada do núcleo (Fig. 1C-E). Em cortes transversais, ele exhibe o padrão típico de 9+9+2 microtúbulos, sendo 9 acessórios, 9 duplas e 2 microtúbulos centrais e abundante material intertubular (Fig. 2D). Na extremidade final do axonema, as nove duplas são as primeiras a terminarem, seguidas do par central e, por último, os microtúbulos acessórios (Fig. 2E). Anteriormente, os derivados mitocondriais começam acima da base do núcleo, um imediatamente antes do outro, e encaixado na extremidade bifurcada do adjunto do centríolo (Fig.1 D, E, H, I). Os derivados mitocondriais, em corte transversal, são simétricos e exibem formato de meia-lua (Fig. 2A, D). Em ambos, observa-se uma

região de cristas mitocondriais restrita à periferia convexa (Fig. 2B-D). Em cortes longitudinais, as cristas se mostram perpendiculares ao longo do eixo dos derivados e com espaços regulares de 48 nm (Fig. 2B, C). Ainda, os derivados mitocondriais possuem duas regiões paracristalinas, diferindo entre si em tamanho e padrão de organização, e duas regiões de material amorfo, também com tamanhos diferentes (Fig. 2D). Inclusive, a porção dos derivados inserida no adjunto do centríolo é formada apenas pelo material paracristalino (Fig. 1I), que identificamos como P2 na figura 2D.

Entre cada derivado mitocondrial e o axonema existe uma estrutura em forma de âncora, ligando o respectivo derivado ao material intertubular (Fig. 2D).

Discussão

O polimorfismo espermático observado em *T. vitticeps* também ocorre em outras espécies de Reduviidae (Maia et al., dados não publicados), bem como em Pentatomidae (Schrader & Leuchtenberger, 1950) e Cicadidae (Kato, 1956; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005). Em *T. vitticeps*, o núcleo do espermatozóide maior medindo 50 μm , representa o maior núcleo dentre os Hemiptera já estudados (*q.v.*).

Um fenômeno comum nos insetos é a permanência dos espermatozóides organizados em feixes nas vesículas seminais (Kubo-Irie et al. 2003; Lino-Neto et al., 2008) e, na maioria das vezes, são transferidos assim para as fêmeas durante a cópula. No caso dos Hemiptera, esse fenômeno foi observado em Auchenorrhyncha (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al. 2005; Araújo, 2009). Entretanto não observamos em *T. vitticeps* e, como também não foi observado em espécies de Belostomatidae e Nepidae (Lee & Lee, 1992) e Pentatomidae (observação pessoal), possivelmente, em Heteroptera, os espermatozóides são mantidos individualizados nas vesículas seminais.

Em Heteroptera, algumas espécies de Coridae, Pyrrhocoridae, Corixidae, Hidrometrydae, Pentatomidae, Plataspidae, Belostomatidae, Nepidae, Largidae e Reduviidae tiveram a ultra-estrutura dos espermatozóides completa ou parcialmente descrita (Dallai e Afzelius, 1980; Lee & Lee, 1992; Dolder, 1988; Báó & DeSouza, 1994; Mercati et al., 2009; Araújo, 2009). Em *T. vitticeps* a morfologia geral dos espermatozóides é semelhante àquela observada nos outros Heteroptera, como, por exemplo, no flagelo observa-se: (1) o axonema parcialmente envolvido pelos dois derivados mitocondriais; (2) presença de estrutura em forma de âncora, ligando os derivados mitocondriais ao material intertubular; e (3) dois ou três corpos

paracristalinos nos derivados mitocondriais. Essas características são consideradas sinapomórficas para os Heteroptera e são apontados como caracteres potenciais para estudos filogenéticos (Dallai e Afzelius, 1980).

Embora o adjunto de centríolo esteja presente em muitos espermatozóides de insetos (Newman e Quicke, 1999; Lino-Neto et al. 1999), sua origem e função ainda não está bem clara (Jamieson et al. 1999; Dallai et al. 2003). O adjunto do centríolo, primeiramente nomeado por Gatenby & Tahmisian (1959), refere-se à estrutura que se forma ao redor do centríolo na região entre o núcleo e o flagelo. Em *T. vitticeps*, como em *Largus rufipennis* (Heteroptera) (Araújo, 2009), na região de transição núcleo-flagelo, o núcleo vai se afinando e é acompanhado pelo adjunto do centríolo, o qual, posteriormente, se associa aos derivados mitocondriais. Em *Nepomorpha* (Heteroptera), o adjunto do centríolo é bem desenvolvido e localizado na lateral do núcleo (Lee & Lee, 1992). Em *Aethalionidae* e *Cicadidae* (subordem *Auchenorrhyncha*) o adjunto do centríolo consiste de um material eletrôn-denso, alongado e localizado anteriormente aos derivados mitocondriais (Chawanji et al, 2005; Araújo, 2009). Em *Cicadinae*, o adjunto de centríolo é relativamente grande e tem uma subestrutura do tipo lamelar que pode ser considerada uma característica sinapomórfica para esse grupo (Chawanji et al, 2006). Entretanto, para nenhuma dessas espécies foi observada bifurcação na extremidade do adjunto que se associa aos derivados mitocondriais, como observado em *T. vitticeps*.

Como nos Heteroptera, o flagelo dos espermatozóides de *Auchenorrhyncha* apresenta dois derivados mitocondriais (Kubo-Irie et al. 2003; Chawanji, et al. 2005, 2006; Araújo, 2009). Entretanto, eles diferem por terem formato oval e não circundarem, nem parcialmente, o axonema.

Os corpos acessórios estão ausentes em *T. vitticeps*, assim como em outras famílias de Heteroptera como, Coridae, Pyrrhocoridae, Corixidae, Hidrometrydae, Pentatomidae, Plataspidae, Belostomatidae, Nepidae e Largidae (Dallai e Afzelius, 1980; Lee & Lee, 1992; Mercati et al., 2009; Araújo, 2009) e em Auchenorrhyncha, como Cicadidae e Cercopidae (Chawanji, et al. 2005). Essas duas últimas famílias estão mais próximas filogeneticamente (Bourgoin & Campbell, 2002) do que a família Aethalionidae (Auchenorrhyncha) onde os corpos acessórios são encontrados ao lado do axonema e paralelos aos derivados mitocondriais e possuem uma região circular de material paracristalino ao longo de todo o seu comprimento (Araújo, 2009).

A estrutura em forma de âncora observada entre os derivados mitocondriais e o material intertubular do axonema, é exclusivo dos Heteroptera e, segundo Mercati et al., (2009), esta estrutura conecta os derivados mitocondriais aos materiais intertubulares aderidos as duplas 1 e 5 de microtúbulos. Ainda segundo estes autores, ela se forma a partir de remanescente da cisterna periaxonemal (cisternas curtas) e pode ter a função de manter a posição do axonema durante o batimento flagelar, evitando uma distorção que possa afetar a mobilidade do flagelo.

Na extremidade posterior do flagelo de *T. vitticeps*, os microtúbulos se desorganizam primeiro nas nove duplas, depois o par central e por último os microtúbulos acessórios. Em Cicadidae (Chawanji et al., 2005) o par central é o primeiro a terminar. Já Aethalionidae, os microtúbulos se desorganizam simultaneamente (Araújo, 2009).

Estudos adicionais com a morfologia de espermatozóides em outras espécies de Hemiptera são necessários para demonstrar se caracteres presentes em *T. vitticeps*, como: (1) adjunto do centríolo envolvendo os derivados mitocondriais; (2)

ponte entre o material intertubular e a cisterna periaxonemal; e (3) a sequência de terminação dos microtúbulos, são sinapomorfias para a família Reduviidae ou mesmo para toda a subordem Heteroptera.

Agradecimentos

Ao Instituto René Rachou (Fiocruz–MG), ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Campinas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Referências Bibliográficas

- Araújo, V. A. 2009. *Caracteres morfológicos do sistema reprodutor masculino e dos espermatozoides de Hymenoptera e Hemiptera (Insecta) e suas possíveis contribuições para a sistemática*, Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 133p.
- Báo, S. N. and DeSouza, W. 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue Cell* 26: 299-308.
- Bourgoin, T. and Campbell, B. C. 2002. Inferring a phylogeny for Hemiptera: falling into the 'Autapomorphic Trap'. *Denisia* 4, 67–82.
- Chawanji, A. S. Hodgson, A. N. and Villet, M. H. 2005. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 37: 257–267.
- Chawanji, A. S. Hodgson, A. N. and Villet, M. H. 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38: 373–388.
- Correa, R. R. 1986. Informe sobre a Doença de Chagas no Brasil e em especial no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Malariologia de Doenças Tropicais* 20: 39-81.
- Dallai, R. and Afzelius, B. A. 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *Journal of Morphology* 164: 301-309.
- Dallai, R. Frati, F. Lupetti, P. and Adis, J. 2003. Sperm ultrastructure of *Mantophasma ephyra* (Insecta Mantophasmatodea), *Zoomorphology* 122: 67–76.
- Dolder, H. 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestam* (Hemiptera. Reduviidae). *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 101: 159-164.
- Galvão, C. Carcavallo, R. Roche, D. S. and Jurberg, J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Gatenby, J. B. and Tahmisian, T. N. 1959. Centriole adjunct, centrioles, mitochondria and ergastoplasm in orthopteran spermatogenesis. An electron microscopic study, *La Cellule*. 59: 27–52.
- Jamieson, B. G. M. 1987. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, p. 319.

- Jamieson, B. G. M. Dallai, R. and Afzelius, B. A. 1999. Insects: Their spermatozoa and phylogeny. *Science Publishers*, New Hampshire, 554.
- Kato, M. 1956. The Biology of the Cicadas. [*Bulletin of the Cicadidae Museum*]. Jinbocho Kanda, Tokyo : Iwasaki Shoten pp. 319.
- Kubo-Irie, M. Irie, M. Nakazawa, T. and Mohri, H. 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 49: 983–991.
- Lee, Y. H. and Lee, C. E. 1992. Ultrastructure of spermatozoa and spermatogenesis in Nepomorpha (Insecta: heteroptera) with special referente to phylogeny. *Zoological Science* 9: 971-981.
- Lino-Neto, J. Bao, S. N. and Dolder, H. 1999. Sperm ultrastructure of the honeybee with emphasis on the nucleus-flagellum transition region, *Tissue Cell* 32: 322–327.
- Lino-Neto, J. Dolber, H. Mancini, K. Mercati, D. and Dallai, R. 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: symphyta). *Tissue and Cell* 40: 185-193.
- Mercati, D. Giusti, F. and Dallai, R. 2009. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). *Journal of Morphology* 270: 825-833.
- Newman, T. M. and Quicke, D. L. J. 1999. Ultrastructure of spermatozoa in *leptopilina* (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 197–203.
- Schrader, F. and Leuchtenberger, C. 1950. A citochemical analysis od the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (De Geer). *Experimental Cell Research* 1: 421-452.
- Silveira, A. C. Feitosa, V. R. and Borges, R. 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domicilar no período 1975/83, Brasil. *Revista Brasileira Malariologia de Doenças Tropicais* 36: 15-312.
- Sivinski, J. 1984. Sperm in competition. In: Smith, R.L. (Ed.), *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Academic Press, New York, 85–115.

Legenda das Figuras

Figura 1 – Fotomicrografia de luz (A-B) e eletrônica de transmissão (C-I) dos espermatozóides de *Triatoma vitticeps*. **A.** Contraste de fase do espermatozóide do tipo menor, a seta indica o limite entre a cabeça (h) e o flagelo (f). **B.** Fluorescência da região da cabeça mostrando o núcleo do tipo menor corado com DAPI. **C-E.** Cortes longitudinais da região de transição núcleo-flagelo. **C.** Núcleo (n) e sua região posterior afilada (cabeça de seta) que antecede o axonema (ax). **D-E.** O adjunto do centríolo (ca) bifurcando e associado aos derivados mitocondriais (md) com as cristas (seta) iniciando após o adjunto do centríolo **F-I.** Cortes transversais da região de transição núcleo-flagelo. **F-G.** Adjunto do centríolo (ca) paralelo ao núcleo (n). **H.** Região em que o núcleo (n) está em paralelo com o adjunto do centríolo (ca) e um dos derivados mitocondriais (md). **I.** Núcleo (n) e adjunto do centríolo envolvendo ambos os derivados mitocondriais (md). Barras: A-B = 10 μm ; C-D e G = 0,5 μm ; E = 1 μm ; F, H-I = 0,2 μm .

Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos espermatozóides de *Triatoma vitticeps*. **A.** Corte transversal da porção inicial do flagelo composto pelo axonema (ax) e dois derivados mitocondriais (md), mostrando ainda a porção final do adjunto do centríolo (ca) **B-C.** Corte longitudinal e tangencial dos derivados mitocondriais evidenciando a região das cristas (cabeça de seta). **D.** Corte transversal do flagelo mostrando o axonema formado por nove microtúbulos acessórios (am), nove duplas (dm) e um par central (cm). Notar os derivados mitocondrias com duas regiões paracristalinas (p_1 e p_2) e duas regiões de material amorfo (a); cristas mitocondriais (cabeça de seta) restrita à periferia convexa e estrutura em forma de âncora (setas) entre o material intertubular e cisternas (ci). **E.** Corte transversal das regiões finais do flagelo mostrando a desorganização dos microtúbulos. As nove duplas são as primeiras a terminarem (1), seguidas do par central (2) e por último os microtúbulos acessórios (3). Barras: A-B e D = 0,2 μm ; C = 0,5 μm ; E = 0,25 μm .

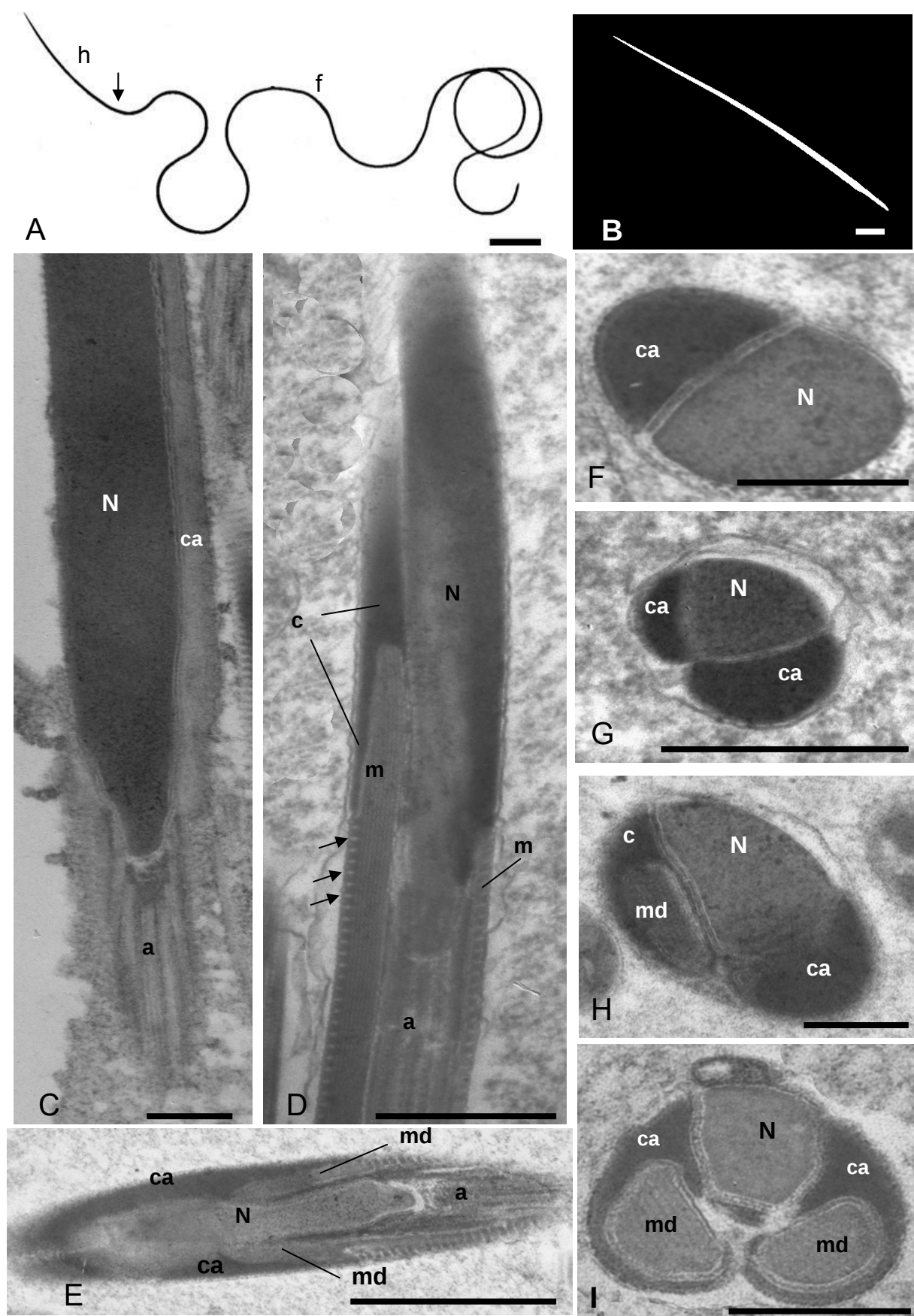


Figura 1

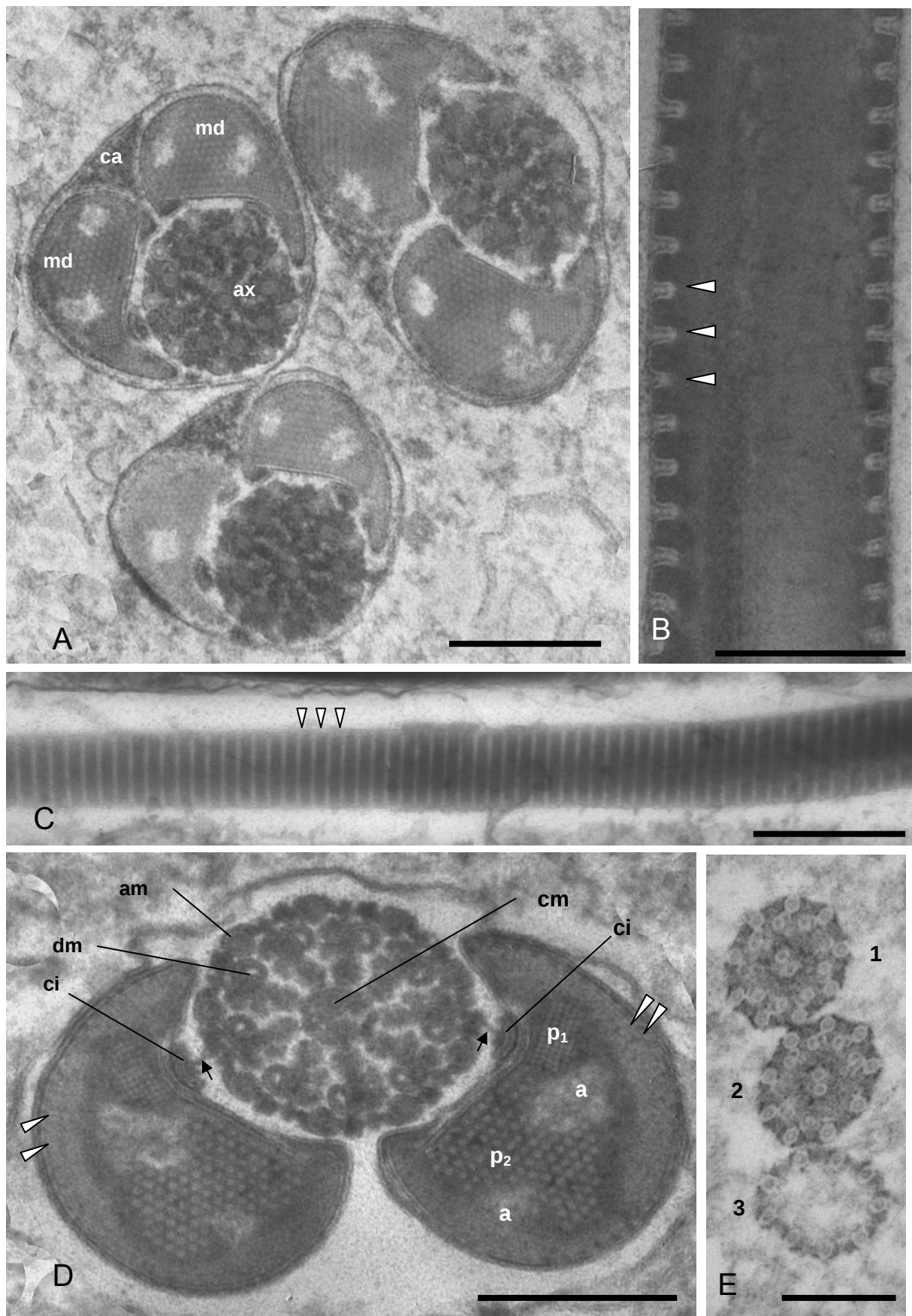


Figura 2

4. Conclusões Gerais

- Nas espécies de Triatominae foram encontrados dois tipos de espermatozóides, com diferença no comprimento total e do núcleo.
- Verificou-se que em *T. vitticeps* (Reduviidae) tanto os folículos longos quanto os folículos curtos produzem os dois tipos de espermatozóides com diferentes proporções.
- O número médio de espermatozóides encontrado em cada cisto de *T. vitticeps* indicou a ocorrência de 8 ciclos mitóticos, o mesmo encontrado em Belostomatidae (Heteroptera), sendo usado como uma informação adicional na sistemática da subordem Heteroptera.
- A ultra-estrutura dos espermatozóides de *T. vitticeps* demonstrou algumas sinapomorfias para a família Reduviidae ou mesmo para toda a subordem Heteroptera.