

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL
(PPGBIO)

Aline Fernandes Baffa

**Caracterização morfológica dos espermatozoides do complexo
Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

Rio de Janeiro - RJ

Março / 2015

Aline Fernandes Baffa

**Caracterização morfológica dos espermatozoides do complexo
Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas, sob orientação do Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva (UNIRIO) e co-orientação da Dra. Simone Patrícia Carneiro de Freitas (FIOCRUZ-RJ).

Rio de Janeiro - RJ

Março / 2015

Ficha Catalográfica

Baffa, A. F.

Caracterização morfológica dos espermatozoides do complexo *Triatoma brasiliensis*
(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Orientador: Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva

Co-orientadora: Dra. Simone Patrícia de Freitas Carneiro

2015, 53f

Dissertação – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical

Palavras-chave: 1. Hemiptera; 2. vetor; 3. Polimorfismo espermático; 4. Sistema reprodutor



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
Instituto de Biociências (IBIO)
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGBIO)
Mestrado em Biodiversidade Neotropical

“Caracterização morfológica do espermatozoide do complexo *Triatoma brasiliensis*
(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)”

por

Aline Fernandes Baffa

Dissertação de Mestrado

Banca Examinadora

Prof. Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva

Prof.ª Dr.ª Jane Carla Soares Moreira

Prof.ª Dr.ª Luci Boa Nova Coelho

Prof.ª Dr.ª Maria Inês da Silva dos Passos

Conceito: _____

A

MARÇO DE 2015

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical (PPGBIO)
Tel.: (0xx21) 2542-4278
<http://www.unirio.br>

Dedico este trabalho ao meu pai

Alexandre Chaves Baffa

à minha mãe

Solange de Almeida Fernandes Baffa

e à minha irmã

Mariana Fernandes Baffa

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, Solange e Alexandre, que sempre me apoiaram e me incentivaram nas minhas escolhas, e à minha irmã, Mariana, por todo o carinho.

Aos meus avôs, Constantino, Antônio, Edna e Augusta, meus amores e exemplos de vida.

Ao Bento, por tantas conversas, diversão e por me acalmar prontamente sempre que surgia qualquer problema.

Ao Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva, meu orientador, por ser um exemplo de profissional para mim, com toda a paixão que demonstra dentro e fora da sala de aula com tudo o que faz.

À Dra. Simone Patrícia Carneiro de Freitas, minha co-orientadora, pelo conhecimento, paciência e tempo dedicado a mim.

À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, chefe do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, RJ, pelo apoio e conselhos.

A todos os colegas do Setor de Entomologia Médica e Forense do IOC, FIOCRUZ, pela simpatia e ótima companhia sempre.

À Dra. Catarina Macedo, do Setor de Entomologia Médica e Forense do IOC, FIOCRUZ, pela generosidade e grande ajuda com programa Photoshop.

Ao Prof. Daniel Câmara, pela inestimável ajuda com a parte estatística desse trabalho.

À Dra. Jane Costa, chefe do Laboratório de Biodiversidade Entomológica do IOC, FIOCRUZ, por ter cedido as colônias de triatomíneos para a realização desse trabalho.

Ao Rômulo Custódio e ao Sr. Luciano (*in memoriam*), da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do IOC, FIOCRUZ, pelo apoio técnico.

A todos os professores das disciplinas que cursei ao longo do Mestrado, pelo conhecimento e por abrir mais um cadinho mais minha mente.

Aos meus queridos amigos da UNIRIO por todos os momentos inesquecíveis que vivemos juntos: Ana Luiza Quijada, André Furmiga, Edson Luiz, Filipe Gomes, Glauco Nunes, Guilherme Lopes, Isabella Campos, Juliane Fernandes e Vinícius Gomes.

À Fundação Capes pela bolsa.

Resumo

Na ordem Hemiptera, a produção de espermatozoides polimórficos já foi relatada em Pentatominae, Largidae e Cicadidae. Em relação à morfologia ultraestrutural dos espermatozoides, os estudos são escassos e demonstraram uma série de modificações suficientes para justificar estudos descritivos que poderão suportar análises de taxonomia, biologia reprodutiva e filogenia entre as subordens de Hemiptera. Porém, é necessário que a maior quantidade possível de grupos seja estudada. Na subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), estão inseridos os hemípteros hematófagos de importância na saúde pública por serem vetores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Dentre as espécies de Triatominae, estudos multidisciplinares feitos com *Triatoma brasiliensis*, confirmaram a existência de um complexo de espécies, o complexo “brasiliensis”, composto por *T. br. brasiliensis*, *T. br. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*. No presente trabalho foi feito um estudo morfológico e estrutural dos espermatozoides do complexo “brasiliensis” buscando possíveis parâmetros relevantes em análises sistemáticas e filogenéticas. Machos foram dissecados e suas vesículas seminais retiradas para a obtenção dos espermatozoides. Estes foram fixados em lâminas de vidro, observados e fotografados em microscópio Zeiss Primo Star, acoplado com câmera Zeiss AxioCam ICc1. As imagens foram analisadas e as medidas dos espermatozoides feitas utilizando-se o programa Image-Pro 4.5. As medidas foram analisadas através da ANOVA e do teste de Tukey para detectar diferenciação entre os táxons. Além disso, vesículas seminais retiradas foram preparadas para estudos de microscopia eletrônica de transmissão. Todos os táxons estudados apresentaram espermatozoides polimórficos, curtos e longos. Os espermatozoides de *T. br. macromelasoma* apresentaram diferença significativa quando comparados aos dos outros quatro membros do complexo, sendo os de maior tamanho. Os espermatozoides dos cinco táxons apresentam morfologia ultraestrutural semelhantes, formados pelo núcleo e o flagelo, este último composto pelo axonema de arranjo microtubular 9 + 9 + 2 e por dois derivados mitocondriais de mesmo tamanho. Cada derivado mitocondrial apresenta três regiões distintas em seu interior (dois corpos cristalinos, circundadas pela área de material cristalino e uma área cristalina periférica) e pontes que conectam cada derivado mitocondrial ao axonema. Diante do exposto, concluímos que as características ultraestruturais observadas nos derivados mitocondriais corroboram a hipótese levantada por estudos anteriores de que elas são sinapomórficas para a subordem Heteroptera.

Palavras-chave: Hemiptera, vetor, polimorfismo espermático, sistema reprodutor.

Abstract

In order Hemiptera, polymorphic sperm has been already reported in Pentatominae, Largidae and Cicadidae. Regarding the ultrastructural morphology of sperm, studies are scarce and demonstrated a great number of changes, enough to justify descriptive studies that may support reproductive biology, phylogenetic and taxonomic analysis between the suborders of Hemiptera. However, it is necessary that the largest possible number of groups is investigated. In the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) are inserted the hematophagous Hemiptera with public health importance, since they are vectors of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Among the species of Triatominae, multidisciplinary studies of *Triatoma brasiliensis* confirmed the existence of a species complex, the complex "brasiliensis," compound by *T. br. brasiliensis*, *T. br. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* and *T. sherlocki*. In the present study we investigate morphological and structural features of complex "brasiliensis" sperm, seeking possible relevant parameters in systematic and phylogenetic studies. Males were dissected and their seminal vesicles removed. The sperm within them were fixed on glass slides, observed and photographed under a microscope Zeiss Primo Star, coupled with Zeiss AxioCam icc1 camera. The images were analyzed and the measures of sperm made using the program Image-Pro 4.5. They were analyzed using ANOVA and Tukey test to detect differentiation among taxa. Furthermore, seminal vesicles were removed and prepared for studies of transmission electron microscopy. All taxa studied showed polymorphic sperm, short and long. The sperm *T. br. macromelasoma* showed significant difference when compared to the other four members of the complex, with the larger total lengths. The sperm of the five taxa have similar ultrastructural morphology, formed by the nucleus and the flagellum, the latter composed of the axoneme following the 9 + 9 + 2 microtubule arrangement, and two mitochondrial derivatives of the same size. Each mitochondrial derivative has three distinct regions inside (two crystalline bodies, surrounded by the area of crystalline material and a peripheral crystalline area) and bridges that connect each mitochondrial derivative to the axoneme. We conclude that the ultrastructural features observed in mitochondrial derivatives confirm the hypothesis raised by previous studies that they are synapomorphic to the suborder Heteroptera.

Keywords: Hemiptera, vector, sperm polymorphism, reproductive system.

Lista de Figuras

Figura 1- Macho de <i>Triatoma brasiliensis macromelasoma</i>	3
Figura 2- Fêmea de <i>Triatoma brasiliensis brasiliensis</i>	3
Figura 3- Macho de <i>Triatoma juazeirensis</i>	3
Figura 4- Macho de <i>Triatoma melanica</i>	3
Figura 5- Fêmea de <i>Triatoma sherlocki</i>	3
Figura 6- Distribuição geográfica dos membros do complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	4
Figura 7- Desenho esquemático do sistema reprodutor de Triatominae.....	5
Figura 8- Esquema dos dois tipos de espermatozoides nos cinco membros do complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	11
Figura 9- Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides curtos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”.....	13
Figura 10- Análises dos pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para o grupo de dados dos espermatozoides curtos.....	15
Figura 11- Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides longos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”.....	16
Figura 12- Análises dos pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para o grupo de dados dos espermatozoides longos.....	18
Figura 13- Elétron-micrografia de núcleos.....	19
Figura 14- Elétron-micrografia de núcleos.....	19
Figura 15- Elétron-micrografia da região de núcleo e adjunto do centríolo em corte transversal de <i>T. brasiliensis</i>	20
Figura 16- Elétron-micrografia da região de núcleo e adjunto do centríolo em corte transversal de <i>T. juazeirensis</i>	20
Figura 17- Elétron-micrografia da região de núcleo e adjunto do centríolo em corte longitudinal de <i>T. juazeirensis</i>	20
Figura 18- Elétron-micrografia da região entre núcleo e flagelo em <i>T. br. macromelasoma</i>	21
Figura 19- Elétron-micrografia da região entre núcleo e flagelo de <i>T. juazeirensis</i>	21
Figura 20- Elétron-micrografia da região entre núcleo e flagelo de <i>T. juazeirensis</i>	21
Figura 21- Elétron-micrografia da região do flagelo de <i>T. sherlocki</i>	22
Figura 22- Elétron-micrografia da região do flagelo de <i>T. brasiliensis</i>	22

Figura 23- Elétron-micrografia da região do flagelo de <i>T. melanica</i>	22
Figura 24- Elétron-micrografia das regiões dos derivados mitocondriais no espermatozoide de <i>T. brasiliensis</i>	23
Figura 25- Elétron-micrografia da região do flagelo em corte longitudinal de <i>T. brasiliensis</i>	23
Figura 26- Elétron-micrografia da região do flagelo em corte longitudinal de <i>T. sherlocki</i>	23

Lista de Tabelas

Tabela 1- Comprimento médio (μm) dos espermatozoides curtos e longos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”	12
Tabela 2- Resultado da Análise de Variância usando comprimento dos espermatozoides do tipo curto (variável resposta) contra espécie de triatomíneo.....	13
Tabela 3- Comparação de contrastes de Tukey para indicar diferença entre o comprimento de espermatozoides do tipo curto entre os cinco táxons do complexo “brasiliensis”.....	14
Tabela 4- Resultado da Análise de Variância usando comprimento dos espermatozoides do tipo longo (variável resposta) contra espécie de triatomíneo.....	16
Tabela 5- Comparação de contrastes de Tukey para indicar diferença entre o comprimento de espermatozoides do tipo longo entre os cinco táxons do complexo “brasiliensis”.....	17

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os Triatomíneos e o complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	1
1.2. Morfologia do Sistema Reprodutor Masculino de Triatominae.....	5
1.3. Morfologia dos espermatozoides.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo geral.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Obtenção e criação dos insetos.....	9
3.2. Morfometria dos espermatozoides.....	9
3.3. Análises estatísticas.....	9
3.4. Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides.....	10
4. RESULTADOS.....	11
4.1. Morfometria dos espermatozoides.....	11
4.2. Análise estatística.....	12
4.2.1. Análise dos dados dos espermatozoides curtos.....	12
4.2.2. Análise dos dados dos espermatozoides longos.....	15
4.3. Morfologia estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides.....	18
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	29
7. PERSPECTIVAS.....	30
8. BIBLIOGRAFIA.....	31
9. APÊNDICE.....	39
9.1. Artigo: Sperm dimorphism in <i>Triatoma brasiliensis</i> Neiva, 1911 (Hemiptera, Triatominae).....	40

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Os Triatomíneos e o complexo *Triatoma brasiliensis*:

Hemiptera é uma ordem de insetos paurometábolos distinguidos pelo seu aparelho bucal sugador, sendo composta pelas subordens Auchenorrhyncha (cigarras e cigarrinhas), Sternorrhyncha (psílídeos, pulgões, cochonilhas e as chamadas moscas brancas), Coleorrhyncha e Heteroptera (percevejos verdadeiros). A subordem Heteroptera, com mais de 40.000 espécies descritas, representa uma das radiações mais bem sucedidas de insetos não-holometábolos. Dentro de Heteroptera, três características diagnósticas são sinapomórficas: lábio inserido anteriormente na cabeça, ao contrário de posteriormente como em Sternorrhyncha, Coleorrhyncha e Auchenorrhyncha; presença de glândulas metatorácicas nos adultos; e glândulas abdominais dorsais nos imaturos (Weirauch & Schuh, 2011). A maioria das espécies de Heteroptera é fitófaga, se alimentando de seiva e outros sucos produzidos pelas plantas, mas também existem algumas espécies hematófagas (alimentam-se de sangue) e entomófagas (predadoras de outros insetos) (Triplehorn & Johnson, 2011).

Na família Reduviidae, a cabeça é alongada, com a área atrás dos olhos contraída e semelhante a um pescoço. O rostro é curto, composto por três segmentos, com o ápice encaixado no sulco estridulatório no prosterno. O abdome de muitas espécies é alargado na região mediana, expondo as margens laterais dos segmentos além das asas (Triplehorn & Johnson, 2011).

Na subfamília Triatominae, estão inseridos os hemípteros hematófagos de importância na saúde pública, uma vez que os triatomíneos são vetores do parasita *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas. Atualmente, essa subfamília divide-se em cinco tribos, incluindo dezoito gêneros e 148 espécies. A maioria dessas ocorre apenas na Região Neotropical. No Brasil, foram registradas 64 espécies, sendo que, cerca de dez são epidemiologicamente mais importantes devido às características comportamentais, destacando-se *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 e *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Jurberg et al., 2014).

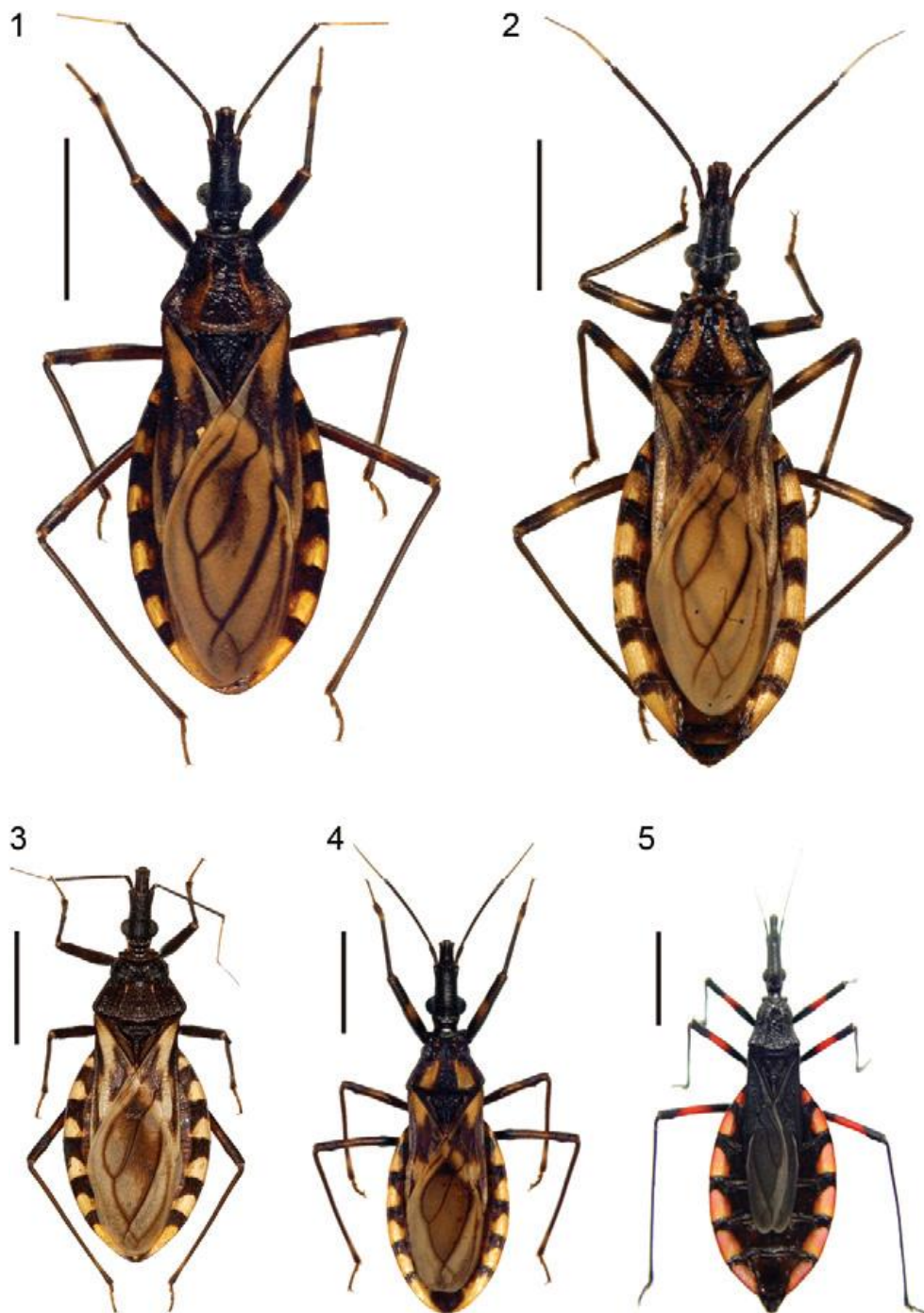
No ambiente natural os triatomíneos são encontrados em associação com diversos tipos de animais silvestres (Sherlock, 2000) e seu habitat primário está representado por abrigos, tocas e ninhos de animais, como marsupiais, edentados, roedores, carnívoros, morcegos, aves, répteis e anfíbios. (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Dentre as espécies de Triatominae de importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas, *Triatoma brasiliensis* é a espécie dominante nas zonas secas do Nordeste brasileiro. Devido à sua larga distribuição geográfica, altas taxas de infecção natural e capacidade de colonizar ambientes antrópicos e naturais, *T. brasiliensis* tem se tornado a espécie prioritária para o Ministério da Saúde, objetivando controlar este vetor da doença de Chagas em todo o Nordeste brasileiro (Costa et al., 2003a). Essa espécie foi descrita originalmente no município de Caicó, Rio Grande do Norte. Neiva e Lent (1941) descreveram um padrão cromático diferente de *T. brasiliensis* em Espinosa, Minas Gerais, como a subespécie *Triatoma brasiliensis melanica* Neiva & Lent, 1941. A partir daí, a subespécie *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911 foi estabelecida.

Com base em espécimes dos municípios de Petrolina, Pernambuco e Curaçá, Bahia, Galvão (1956) ilustrou e caracterizou uma nova subespécie, *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956. Mais tarde, Lent e Wygodzinsky (1979) sugeriram uma sinonímia para as subespécies de *T. brasiliensis*, declarando que formas intermediárias podem ser encontradas na natureza.

Estudos multidisciplinares foram feitos para analisar os diferentes morfotipos de *T. brasiliensis* baseados em sua morfologia (Costa et al., 1997a; Dujardin et al., 2009), biologia (Costa & Marchon-Silva, 1998), ecologia (Costa et al., 1998, 2002), perfil isoenzimático (Costa et al., 1997b), cruzamentos entre os morfotipos (Correia et al., 2013; Costa et al., 2003b) e análise a partir do DNAm (Monteiro et al., 2004). Esses estudos confirmam a existência de um complexo de espécies. Os estudos moleculares e de cruzamento foram decisivos para a elevação do *T. melanica* para o status de espécie (Costa et al., 2006) e para a descrição de uma nova espécie *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix, 2007, ambas identificadas como unidades evolutivas independentes.

Estudos filogenéticos usando sequenciamento do citocromo b e RNAr 16S identificaram *Triatoma sherlocki* Papa et al., 2002 como espécie-irmã de *T. melanica* e membro do complexo *T. brasiliensis* (Mendonça et al., 2009). Esses estudos também sugerem que *T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma* são suficientemente distintos dos outros membros do grupo e assim, o status de subespécies requer revalidação. Com base em todos esses estudos, Costa et al. (2013) providenciaram uma redescrição detalhada de *T. b. macromelasoma* bem como uma chave de identificação para todos os membros do complexo *T. brasiliensis* (Figura 1-5), e a distribuição geográfica dos táxons do complexo foram mostrados por Costa et al., 2014 (Figura 6).



Figuras 1-5: Os cinco membros do complexo *Triatoma brasiliensis* em vista dorsal. 1: macho de *Triatoma brasiliensis macromelasoma*; 2: fêmea de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*; 3: macho de *Triatoma juazeirensis*; 4: macho de *Triatoma melanica*; 5: fêmea de *Triatoma sherlocki*. Barras = 5 mm. (Fonte: Costa et al., 2013).

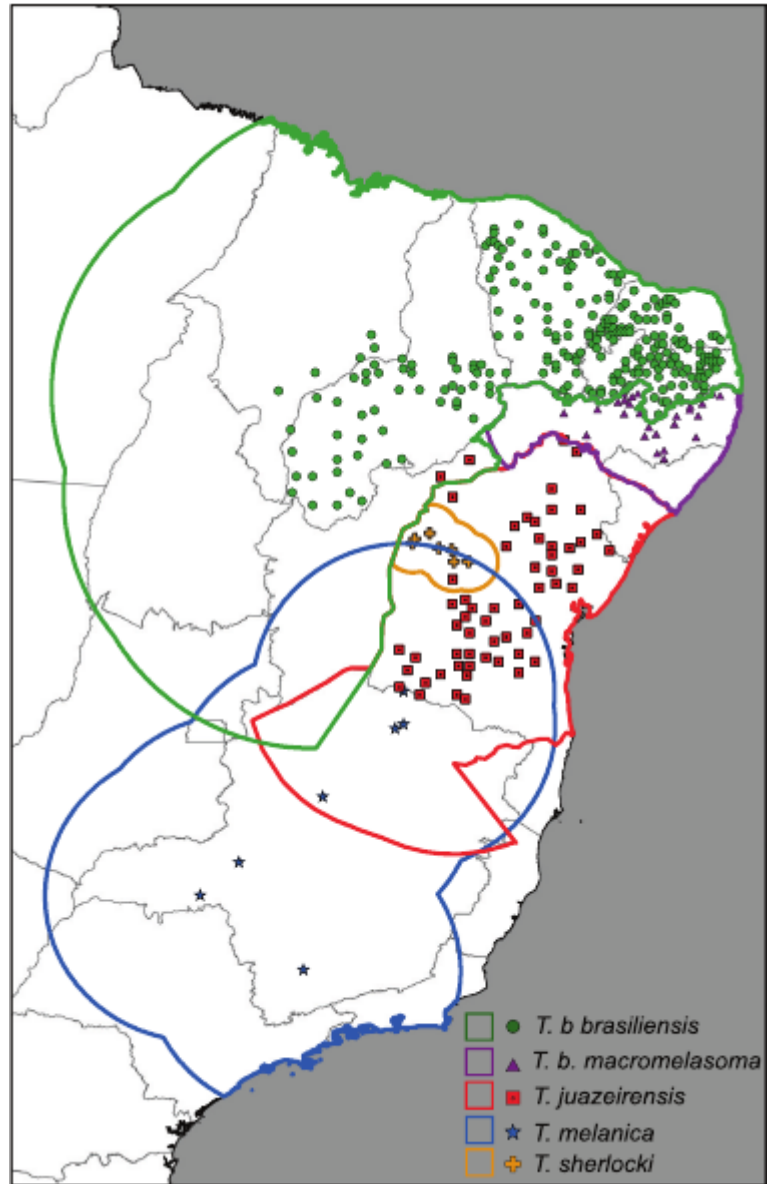


Figura 6: Distribuição geográfica dos membros do complexo *Triatoma brasiliensis*. (Fonte: Costa et al., 2014).

1.2 Morfologia do Sistema Reprodutor Masculino de Triatominae:

O sistema reprodutor masculino em Triatominae apresenta dois testículos ovais pareados, revestidos por uma membrana testicular que engloba os folículos testiculares. Dentro de cada folículo, os espermatozoides em desenvolvimento se apresentam em diferentes estágios de maturação, divididos em cistos. Os folículos se conectam ao ducto principal, o vaso deferente, através de vasos eferentes individuais (Freitas et al., 2010). De cada testículo parte um vaso deferente, e esse canal se dilata em um ponto de sua extensão para formar a vesícula seminal (Barth, 1958). Associado a esse sistema estão as glândulas acessórias que consistem em quatro lóbulos: anterior, externo, interno e dorsal, juntando-se em um ponto, formando um hilo, que forma o ducto glandular, e este desemboca um pouco abaixo do vaso deferente, no ducto ejaculatório (Barth, 1958; Freitas et al., 2010) (Figura 7).

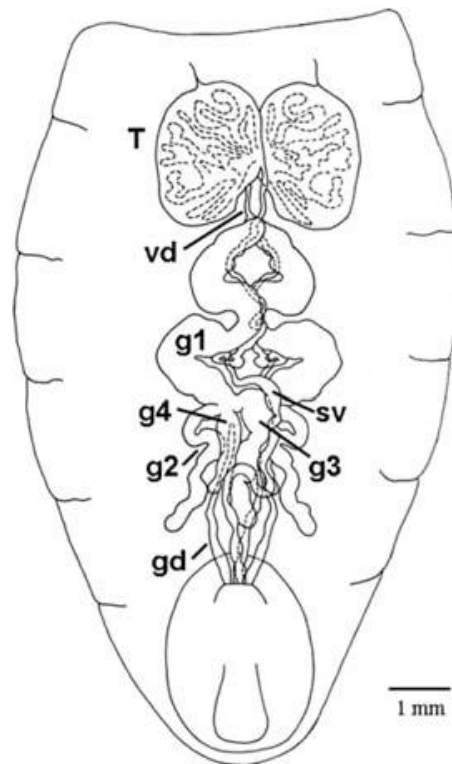


Figura 7: Desenho esquemático do sistema reprodutor masculino de Triatominae. T: testículos, vd: vaso deferente, g1-4: glândulas acessórias, sv: vesícula seminal, gd: ducto glandular. (Fonte: Freitas et al., 2008).

1.3 Morfologia dos espermatozoides:

Espermatozoides estão entre os tipos de célula com maior diversidade, e sua morfologia externa e ultraestrutura muitas vezes fornecem dados confiáveis para distinguir taxas e examinar relações filogenéticas. A maior diversidade destas células é encontrada nos invertebrados, principalmente nos insetos (Jamieson, 1987).

Nos insetos, os espermatozoides são formados pela cabeça e cauda. Grande parte da cabeça é ocupada pelo núcleo. Na frente do núcleo está o *acrosoma*, estrutura glicoproteica, circundada por membrana com, na maioria dos insetos, uma camada extra acrosomal e uma haste interna ou cone. Esta estrutura está envolvida no reconhecimento interespecífico esperma-ovo e possivelmente com a lise da membrana do ovo, permitindo a entrada do espermatozoide no mesmo (Chapman, 1998).

A porção motora do flagelo é chamada *axonema*, localizado na base do núcleo, e é composto por microtúbulos provenientes do centríolo. O espermatozoide da maioria dos Pterygota tem um flagelo com arranjo microtubular 9+9+2 (nove acessórios, nove duplos e dois centrais) (Klowden, 2007). Flanqueando o axonema estão os *derivados mitocondriais*, os quais, nos Pterygota, geralmente são dois, porém em algumas ordens apresentam-se únicos (Chapman, 1998).

A evolução rápida e divergente do espermatozoide é um padrão generalizado que ocorre em muitos grupos animais. Em alguns grupos, o comprimento e a morfologia do espermatozoide variam até entre espécies afins (Chawanji et al., 2006; Araújo et al., 2011). Um exemplo de diversificação da morfologia do espermatozoide é o *polimorfismo espermático*, no qual dois ou mais diferentes tipos de espermatozoides são encontrados no ejaculado de um único macho. Esse polimorfismo pode incluir diferenças na morfologia, no comprimento total do espermatozoide, no comprimento de algumas estruturas e na função (Swallow & Wilkinson, 2002).

Um dos casos de polimorfismo espermático bem estudado é o da ordem Lepidoptera, onde o mesmo indivíduo produz dois tipos distintos de espermatozoide, eupirênios e apirênios, sendo apenas os primeiros nucleados. Os espermatozoides apirênios são menores, mais finos e contêm menos material mitocondrial do que os espermatozoides eupirênios, sendo ambos os tipos transferidos para a fêmea durante a cópula e armazenados na espermateca. (Cook & Wedell, 1999).

Algumas espécies de *Drosophila* Fallén, 1823 (Diptera: Drosophilidae) produzem dois ou mais tipos de espermatozoides, de tamanhos diferentes, ambos nucleados. Essa forma de polimorfismo é chamada de polimegalia (Pasini et al., 1996). Snook & Karr (1998) mostraram

em um estudo sobre o grupo de *Drosophila obscura* Fallén, 1823, com as espécies *D.subobscura* Collin, 1936, *D. pseudoobscura* Frovola & Astaurov, 1929, *D. affinis* Sturtevant, 1916, *D. persimilis* Dobzhansky & Epling, 1944, *D. miranda* Dobzhansky, 1935 e *D. athabasca* Sturtevant & Dobzhansky, 1936, que todas essas espécies produzem espermatozoides maduros nucleados de duas classes de comprimento diferentes: curtos e longos e apenas os longos foram encontrados fertilizando os ovos.

Em Hemiptera, a produção de espermatozoides polimórficos que diferem quanto ao comprimento da cabeça e/ou do flagelo já foi relatada em Pentatomidae (Araújo et al., 2011), Largidae (Araújo et al., 2012) e Cicadidae (Chawanji et al., 2005; 2006). Em relação a morfologia ultraestrutural dos espermatozoides, os estudos são restritos apenas a algumas espécies (Danilova et al., 1984; Afzelius et al., 1985; Lee, 1985; Bão & De-Souza, 1994; Chawanji et al., 2005, 2006, 2007; Araújo et al., 2011, 2012). Esses trabalhos têm demonstrado uma série de modificações nos diferentes grupos de Hemiptera, com diversidade suficiente para justificar estudos descritivos que poderão suportar análise de taxonomia, biologia reprodutiva e filogenia entre as subordens de Hemiptera. Para isso há a necessidade de que mais espécies sejam estudadas, preferencialmente que representem o maior número de táxons dentre as subordens de Hemiptera, bem como espécies envolvidas em “complexos de espécie” como o caso aqui apresentado.

2. OBJETIVOS:

2.1 Geral:

Descrever a morfologia estrutural dos espermatozoides de *Triatoma brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* e *T. brasiliensis macromelasoma* buscando possíveis parâmetros relevantes em estudos sistemáticos e filogenéticos.

2.2 Específicos:

- Realizar a morfometria dos espermatozoides, utilizando a microscopia de luz;
- Descrever as estruturas morfológicas dos espermatozoides, utilizando a microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão;
- Caracterizar os espermatozoides e usá-los para inferir como marcadores espécie-específicos em Triatominae.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Obtenção e criação dos insetos:

Os insetos utilizados são provenientes de colônias estabelecidas no Setor de Entomologia Médica e Forense, do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ a partir de espécimes procedentes de diferentes regiões geográficas: *T. brasiliensis* (Várzea alegre, Ceará); *T. juazeirensis* (Juazeiro, Bahia); *T. melanica* (Espinosa, Minas Gerais); *T. sherlocki* (Gentio do Ouro, Bahia) e *T. brasiliensis macromelasoma* (Pernambuco). Semanalmente as colônias são alimentadas com sangue de camundongo suíço (Protocolo CEUA - FIOCRUZ LW-14/10), e mantidas a 29°C e 80% UR, com fotoperíodo de 12 horas.

3.2 Morfometria dos espermatozoides:

Para a mensuração total dos espermatozoides, cinco machos, de cada espécie foram dissecados e as vesículas seminais extraídas. Em seguida, gotas de suspensão dos espermatozoides foram espalhadas em lâminas histológicas, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, a temperatura ambiente e, depois, lavadas em água corrente. Após secas, as lâminas foram observadas e fotografadas em Microscópio Zeiss Primo Star, acoplado com câmera Zeiss AxioCam ICc1, em aumento de 40x. As imagens foram analisadas e as medidas feitas utilizando o Programa Image-Pro 4.5.

3.3 Análises estatísticas:

Utilizou-se a Análise de Variância de um fator (one-way ANOVA) para verificar a relação entre o comprimento do espermatozoide (variável resposta) e espécie de triatomíneo. Com resultado significativo dessas análises, um teste de contraste de Tukey foi realizado para verificar as diferenças entre as espécies de triatomíneos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa “R for Windows” (R Core Team, 2014) e R-Studio (RStudio Team, 2012), utilizando os pacotes “car” (Fox & Weisberg, 2011) e “MASS” (Venables & Ripley, 2002). O nível de significância adotado para este trabalho foi de 5% ($p < 0,05$).

3.4 Morfologia ultraestrutural dos espermatozoides:

Para o estudo ultraestrutural, vesículas seminais, contendo espermatozoides, foram removidas, isoladas e transferidas para solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida as vesículas foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora à temperatura ambiente, no escuro. Após a lavagem no tampão cacodilato de sódio 0,1 M, seguiu-se a desidratação em acetona 50% e 70%. Neste ponto, o material foi colocado em solução de uranila a 2% em acetona 70% por 24 horas, posteriormente em acetona 90% e 100%, seguida de infiltração e inclusão na resina epoxi Epon 812.

Cortes semifinos foram realizados utilizando o ultramicrotomo, corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo 1% seguindo-se observação em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 da Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC, FIOCRUZ.

4. RESULTADOS:

4.1 Morfometria dos espermatozoides:

Os espermatozoides dos cinco táxons do complexo *brasiliensis* são finos e de dois comprimentos: curtos e longos (Fig. 8). A morfometria dos espermatozoides de *T. brasiliensis* foi baseada em 100 curtos e 37 longos, *T. brasiliensis macromelasoma* em 98 curtos e 56 longos, *T. juazeirensis* em 163 curtos e 55 longos, *T. melanica* em 120 curtos e 53 longos, e *T. sherlocki* em 146 curtos e 52 longos.

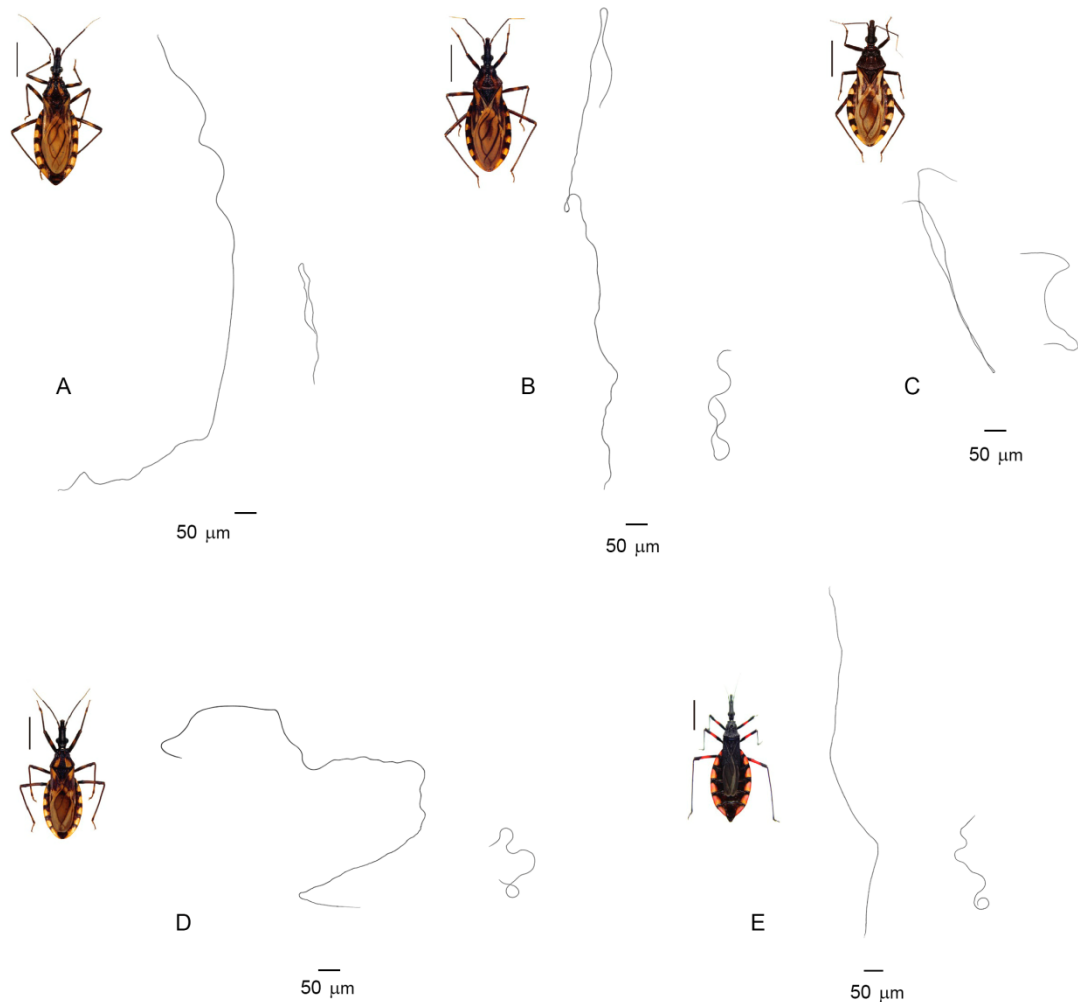


Figura 8: Esquema dos dois tipos de espermatozoides nos cinco membros do complexo *Triatoma brasiliensis*. A: *Triatoma brasiliensis*, B: *Triatoma brasiliensis macromelasoma*, C: *Triatoma juazeirensis*, D: *Triatoma melanica*, E: *Triatoma sherlocki*.

Os espermatozoides longos têm seu comprimento extenso, e por isso houve dificuldade em obtê-los isolados e distendidos, melhor forma de realizar as medições, além de aparentarem ser menos numerosos. Um total de 880 medições foram realizadas, das quais 16 foram descartadas por apresentarem inconsistências, resultando em 864 medições, distribuídas pelas cinco espécies de triatomíneos (Tabela 1).

Em *T. brasiliensis*, além dos machos, também foi feito um estudo da morfometria dos espermatozoides armazenados nas espermatecas de fêmeas. Os resultados estão apresentados em um artigo pronto para publicação em Revista indexada (anexo).

Tabela 1: Comprimento médio (μm) dos espermatozoides curtos e longos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”.

Espécie	Curto			Longo		
	n	Média	Erro padrão	n	Média	Erro padrão
<i>T. brasiliensis</i>	95	465,7382	1,168970	36	1276,899	34,66644
<i>T. br.macromelasoma</i>	98	479,2168	2,407574	53	1636,133	23,63673
<i>T. juazeirensis</i>	158	466,0414	1,484711	54	1282,789	35,60422
<i>T. melanica</i>	120	470,4395	1,500914	53	1347,900	37,42116
<i>T. sherlocki</i>	145	428,8610	1,365862	52	1170,127	32,93728

4.2. Análises estatísticas

4.2.1. Análise dos dados dos espermatozoides curtos:

Com base nas medianas e variabilidade das medidas dos espermatozoides curtos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis” foi realizado um gráfico boxplot (Figura 9). É possível notar uma baixa variabilidade dos dados e que para as espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e *T. melanica*, os comprimentos aparentam ser similares entre si, enquanto os comprimentos de *T. br. macromelasoma* e, principalmente, *T. sherlocki*, aparentam ser discrepantes.

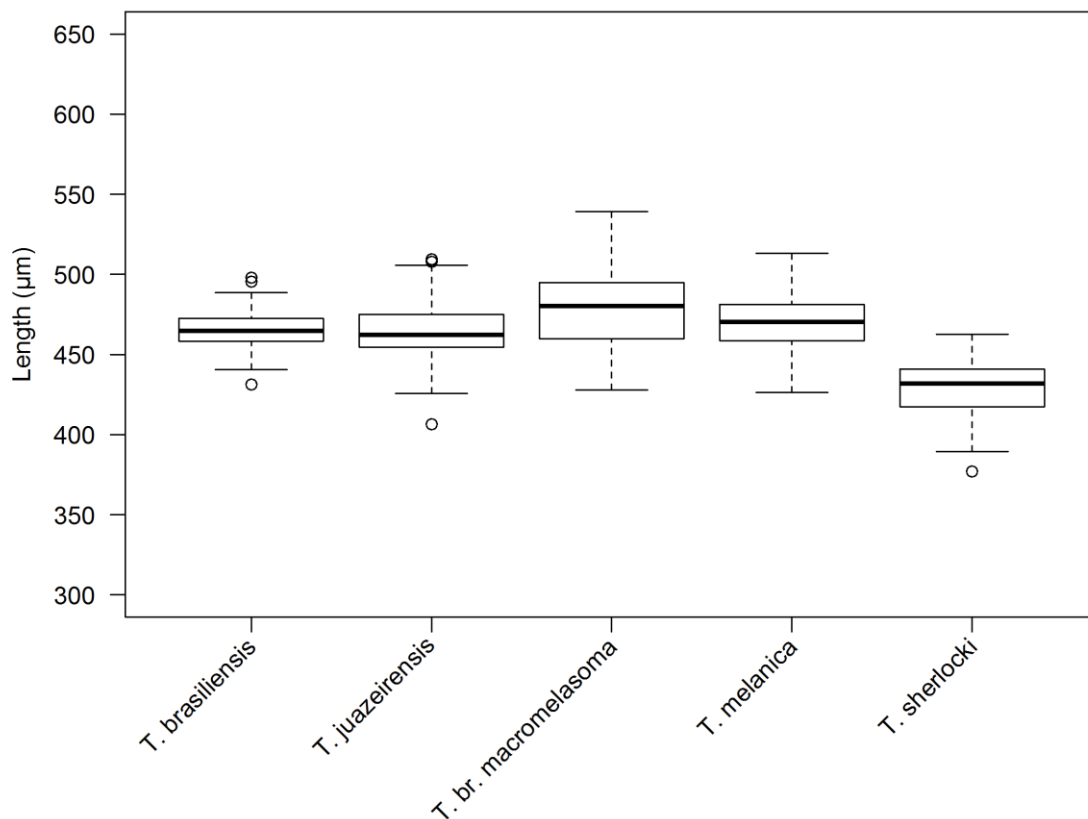


Figura 9: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides curtos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”.

O resultado de significância estatística da ANOVA (Tabela 2) indicou haver diferença entre as médias de comprimento dos espermatozoides curtos. Para verificar quais táxons são diferenciáveis a partir deste caractere, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 3).

Tabela 2: Resultado da Análise de Variância usando comprimento dos espermatozoides do tipo curto (variável resposta) contra espécie de triatomíneo. Negrito indica significância estatística ao nível de 5%.

	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F	p-valor
Espécie de triatomíneo	4	198737	49684	157.2	<0,05
Residuals	611	193107	316		

Tabela 3: Comparação de contrastes de Tukey para indicar diferença entre o comprimento de espermatozoides do tipo curto entre os cinco táxons do complexo “brasiliensis”.

Comparação de Tukey entre espécies	p-valor
juaz-bras	0,999933
mela-bras	0,30476
mela-juaz	0,246747
macm-bras	<0,05
sher-bras	<0,05
macm-juaz	<0,05
sher-juaz	<0,05
sher-macm	<0,05
sher-mela	<0,05
mela-macm	<0,05

bras: *T. brasiliensis*; juaz: *T. juazeirensis*; macm: *T. br. macromelasoma*; mela: *T. melanica*; sher: *T. sherlocki*.

Pelo teste de Tukey, não foi possível verificar diferença significativa entre os espermatozoides curtos de: *T. brasiliensis* versus *T. juazeirensis*, *T. brasiliensis* versus *T. melanica* e *T. juazeirensis* versus *T. melanica*. Além disso, o teste comprovou que tanto os espermatozoides curtos de *T. br. macromelasoma* quanto os de *T. sherlocki* são diferenciáveis dos outros táxons com que foram comparados, apresentando diferença significativa (<0,05) em todas as análises.

Os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para os espermatozoides curtos foram verificados através da análise de gráficos (Figura 10) contendo resíduos (eixo y) versus valores ajustados (eixo x). Pode-se verificar a dispersão homogênea e sem nenhum padrão nos resíduos, o que atende ao pressuposto de homoscedasticidade residual. Os resíduos do modelo ANOVA também se adequaram a uma distribuição aproximadamente

normal. Dessa forma, é possível afirmar que o ajuste do modelo é confiável para o grupo de dados dos espermatozoides curtos (Zuur et al., 2010).

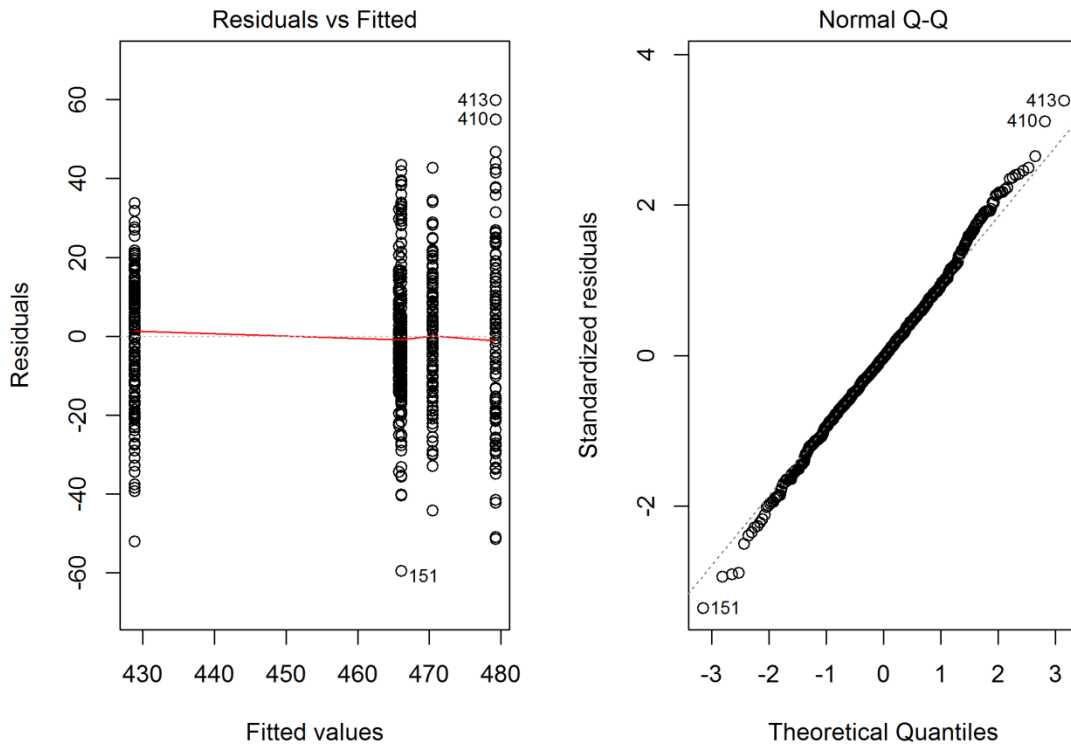


Figura 10: Análises dos pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para o grupo de dados dos espermatozoides curtos.

4.2.2. Análise dos dados dos espermatozoides longos:

Com base nas medianas e variabilidade das medidas dos espermatozoides longos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis” foi realizado um gráfico boxplot (Figura 11). É possível notar uma maior variabilidade dos dados, se comparados aos dos espermatozoides curtos e que para as espécies *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e *T. sherlocki* os comprimentos aparentam ser mais similares entre si, enquanto os comprimentos de *T. br.macromelasoma* aparentam ser os mais discrepantes.

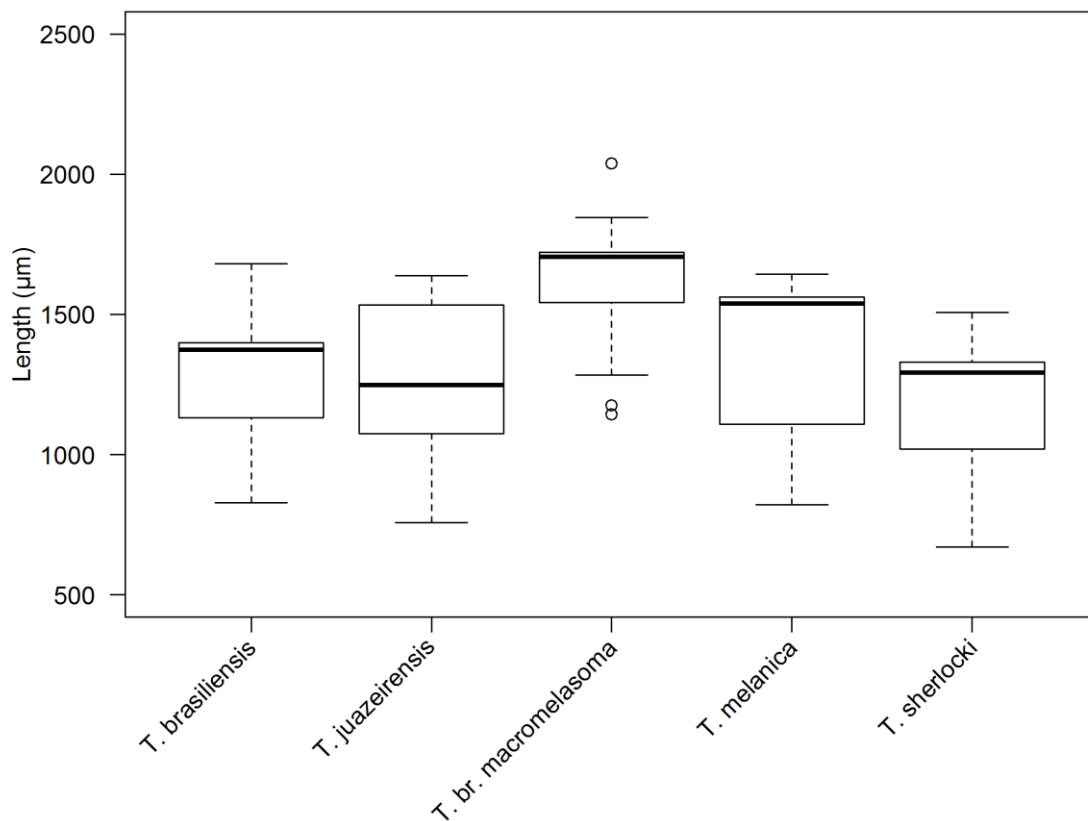


Figura 11: Boxplot dos comprimentos (μm) dos espermatozoides longos dos cinco táxons do complexo “brasiliensis”.

O resultado de significância estatística da ANOVA (Tabela 4) indicou haver diferença entre as médias de comprimento dos espermatozoides longos. Para verificar quais táxons são diferenciáveis a partir deste caractere, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 5).

Tabela 4: Resultado da Análise de Variância usando comprimento dos espermatozoides do tipo longo (variável resposta) contra espécie de triatomíneo. Negrito indica significância estatística ao nível de 5%.

	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F	p-valor
Espécie de triatomíneo	4	4,994 x 10¹³	1,249 x 10¹³	35,5	<0,05
Residuals	243	8,546 x 10 ¹³	3,517 x 10 ¹³		

Tabela 5: Comparação de contrastes de Tukey para indicar diferença entre o comprimento de espermatozoides do tipo longo entre os cinco táxons do complexo “brasiliensis”.

Comparação de Tukey entre espécies	p-valor
juaz-bras	0,997852
mela-bras	0,438843
sher-bras	0,304865
mela-juaz	0,535627
sher-juaz	0,093679
macm-bras	<0,05
macm-juaz	<0,05
mela-macm	<0,05
sher-macm	<0,05
sher-mela	<0,05

bras: *T. brasiliensis*; juaz: *T. juazeirensis*; macm: *T. br. macromelasoma*; mela: *T. melanica*; sher: *T. sherlocki*.

Pelo teste de Tukey, foi possível verificar que o comprimento dos espermatozoides longos de *T. b. macromelasoma* são significativamente diferenciáveis dos outros táxons, e os de *T. sherlocki* se diferenciaram dos de *T. melanica* e *T.br. macromelasoma*.

Os pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para os espermatozoides longos foram verificados através da análise de gráficos (Figura 12) contendo resíduos (eixo y) versus valores ajustados (eixo x). A análise gráfica de resíduos indicou haver necessidade de transformação de dados para a adequação aos pressupostos acima citados, e, para isso, utilizou-se a transformação Box-Cox, que apontou a elevação ao quadrado como melhor alternativa. Pode-se verificar a dispersão homogênea e sem nenhum padrão nos resíduos, o que atende ao pressuposto de homoscedasticidade residual. Os resíduos do modelo ANOVA também se adequaram a uma distribuição aproximadamente normal. Dessa forma, é possível afirmar que

o ajuste do modelo é confiável também para o grupo de dados dos espermatozoides longos (Zuur et al., 2010).

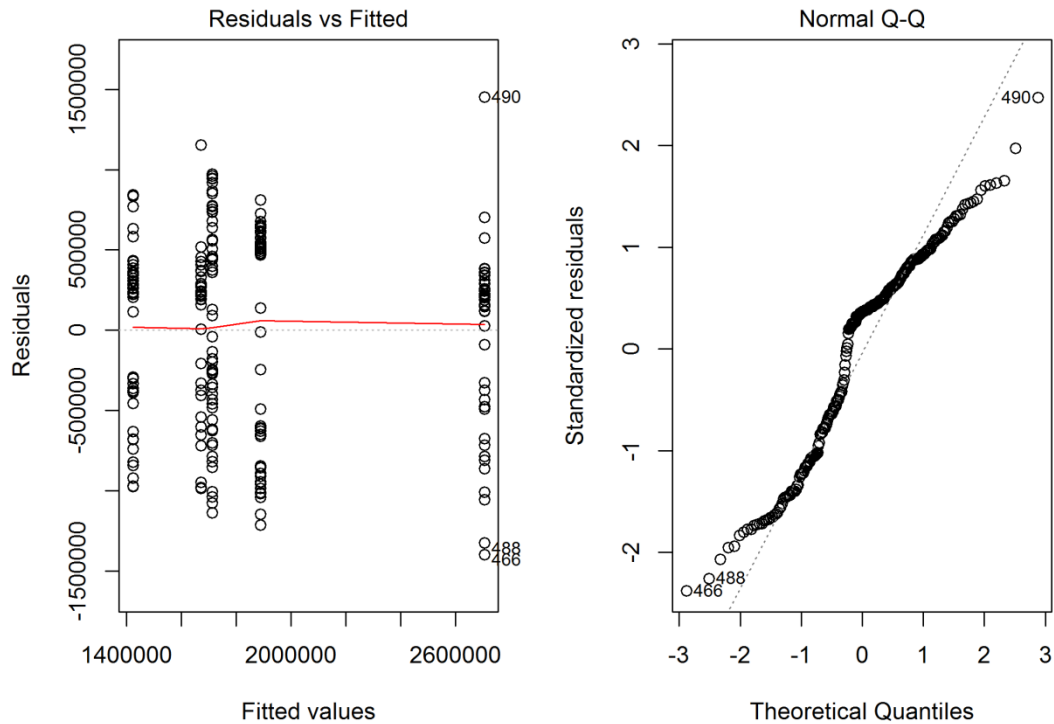
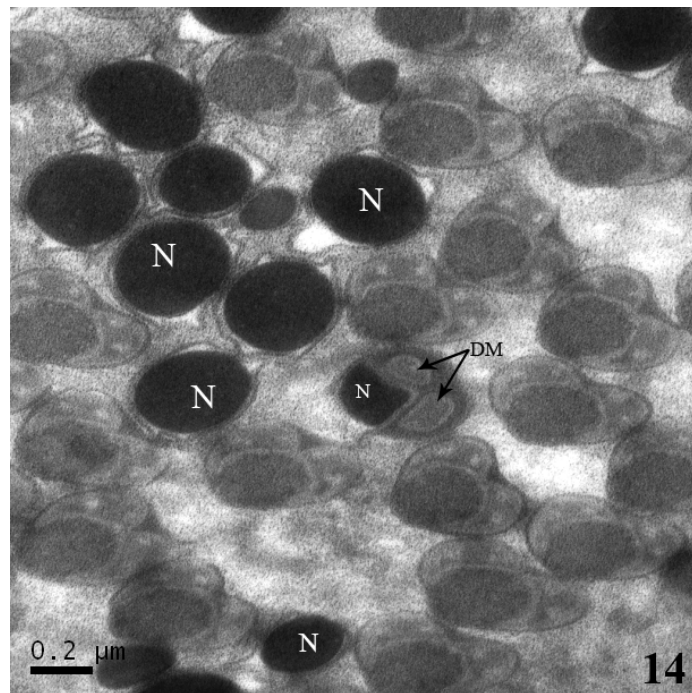
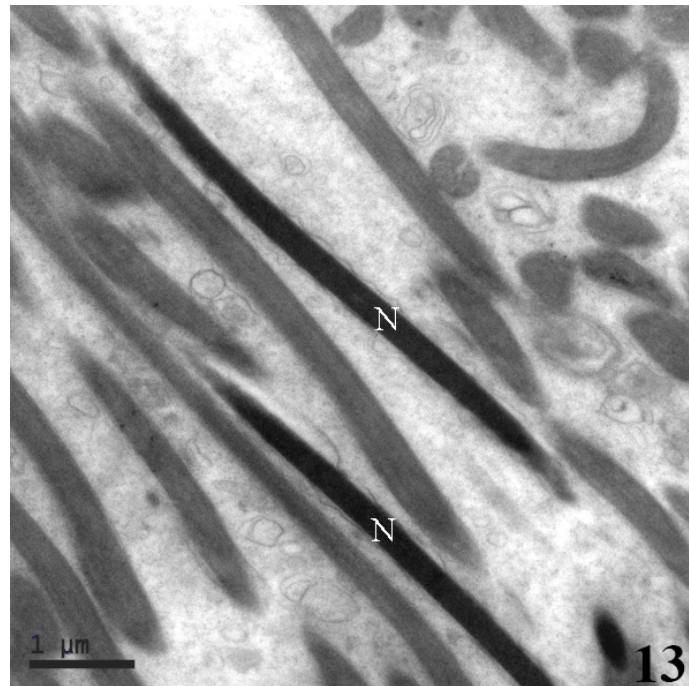


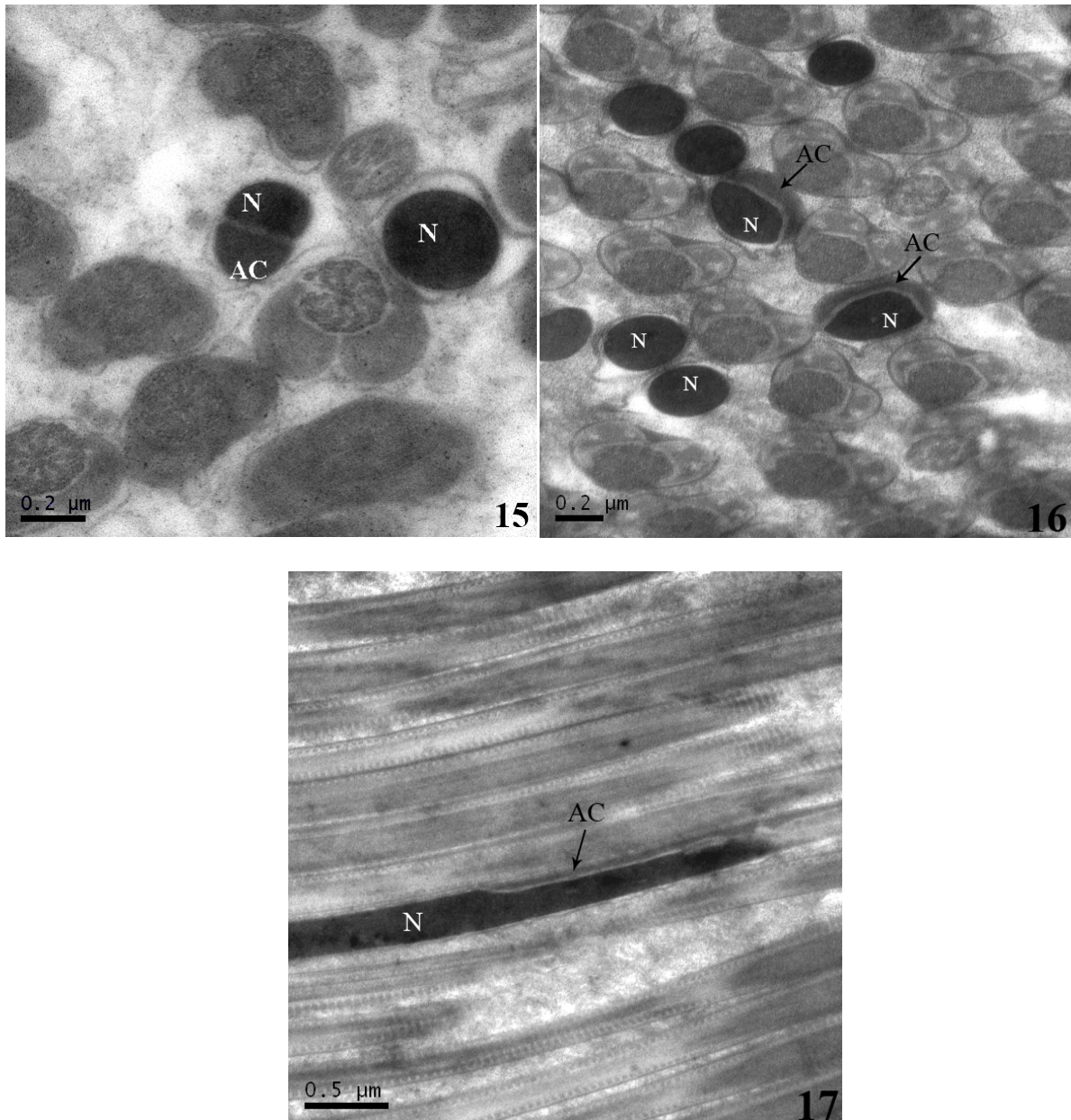
Figura 12: Análises dos pressupostos de homoscedasticidade e normalidade do modelo ANOVA para o grupo de dados dos espermatozoides longos.

4.3. Morfologia estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides:

Os espermatozoides dos cinco táxons estudados apresentam morfologia ultraestrutural semelhantes, formados pelo núcleo, inserido na extremidade anterior, e o flagelo, composto pelo fio axial duplo e dois derivados mitocondriais. O núcleo é linear, longo e preenchido por cromatina condensada homogênea (Fig. 13), que em corte transversal tem aparência circular. Essa estrutura pode ser vista com diferentes diâmetros, o que se deve ao plano de corte em diferentes alturas (Fig. 14). O núcleo é mais estreito na região apical do espermatozoide e se torna largo à medida que se aproxima do adjunto do centríolo. Na transição entre núcleo e flagelo, pode ser visto o adjunto do centríolo, paralelo ao núcleo (Fig. 15, 16 e 17).

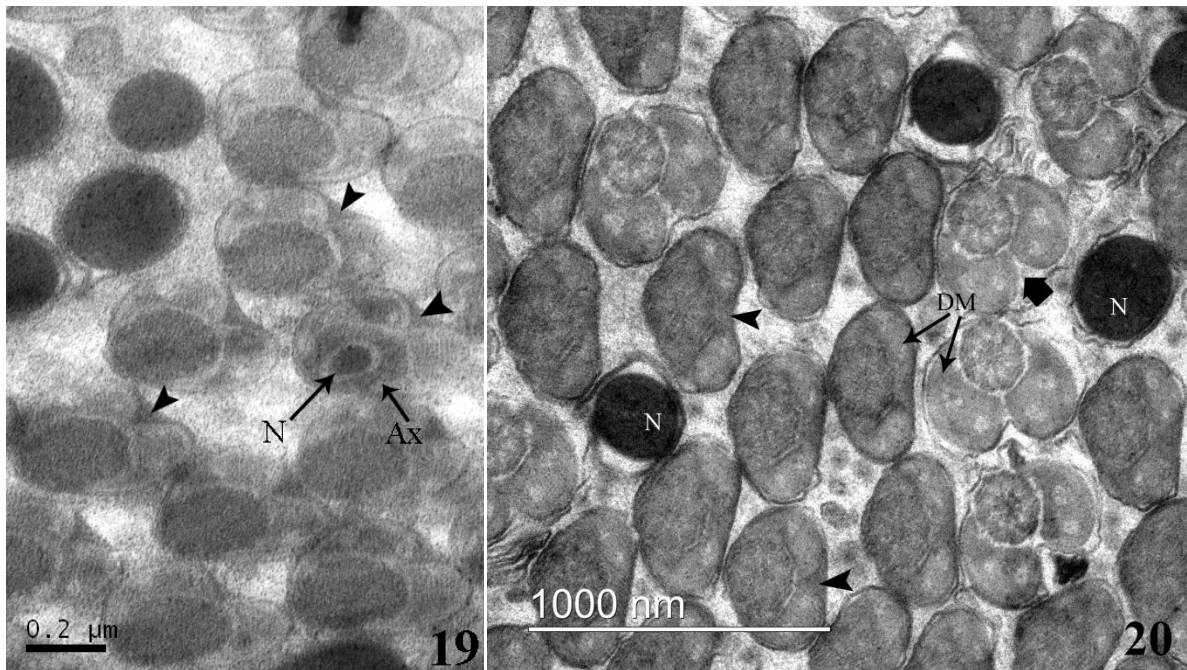
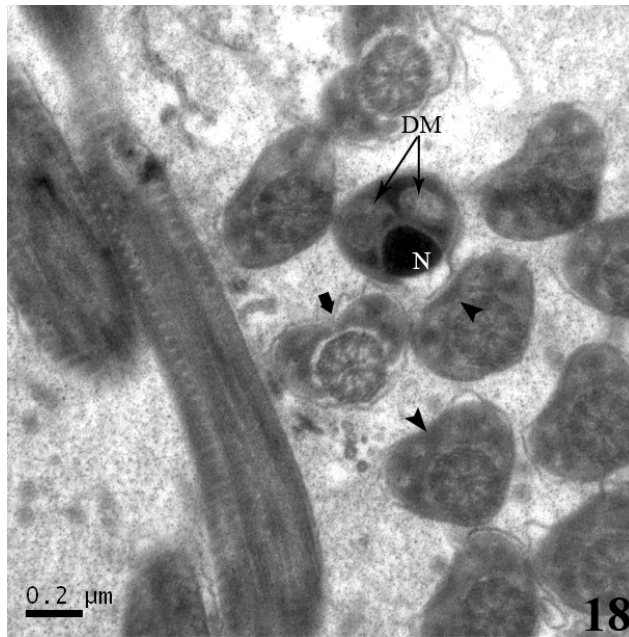


Figuras 13 e 14: Elétron-micrografia de núcleos (N). (13) dois núcleos de espermatozoides de *T. brasiliensis* em corte longitudinal. (14) núcleos em diferentes planos de cortes transversais de *T. juazeirensis*. DM: derivados mitocondriais.



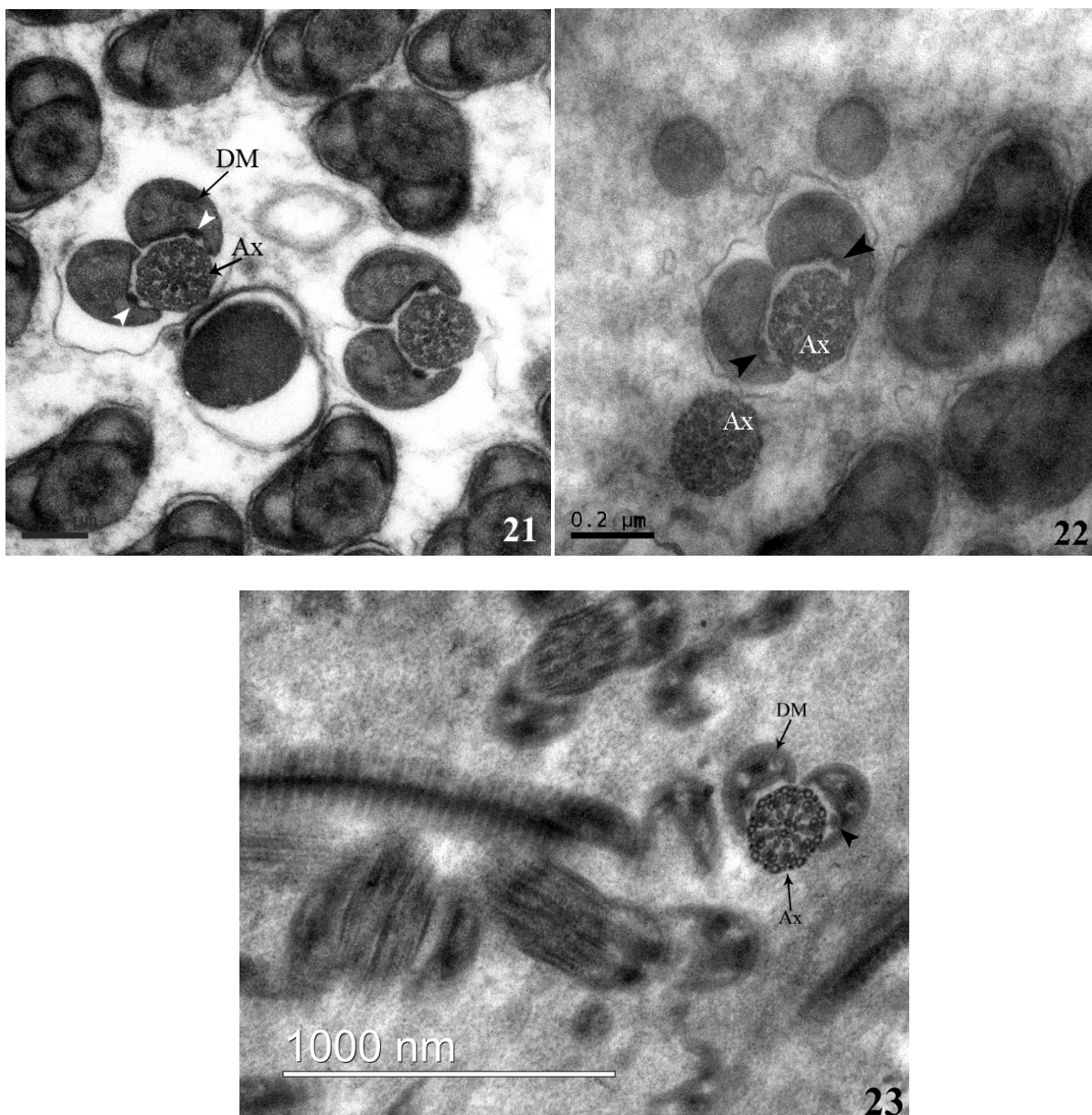
Figuras 15-17: Elétron-micrografia da região de núcleo (N) e adjunto do centríolo (AC) em corte transversal de *T. brasiliensis* (15) e *T. juazeirensis* (16) e corte longitudinal de *T. juazeirensis* (17).

Na transição entre núcleo e flagelo, após o adjunto do centríolo, os derivados mitocondriais começam a surgir (Fig. 14 e 18). Na região inicial dos derivados mitocondriais, o núcleo ainda é observado no centro de onde começa a aparecer o axonema, circundando o mesmo (Fig.19). Os derivados mitocondriais se mantêm mais próximos entre si por uma área eletrondensa, que parece ser o final do adjunto do centríolo, e, à medida que se segue o flagelo, estes começam a se afastar e não se conectam mais (Fig. 18, 19 e 20).



Figuras 18-20: Elétron-micrografia da região entre núcleo e flagelo. Início do flagelo mostrando derivados mitocondriais (DM) conectados por uma região eletrondensa (cabeça de seta) e afastados (seta curta) em *T. br. macromelasoma* (18) e *T. juazeirensis* (19 e 20). N: núcleo.

A partir daí, a única conexão dos derivados mitocondriais passa a ser com o axonema por meio de pontes aderidas a cisternas entre os derivados mitocondriais e os microtúbulos, e o formato geral do flagelo (derivados mitocondriais+axonema), em corte transversal, lembra um coração (Fig. 21, 22 e 23).



Figuras 21-23: Elétron-micrografia da região do flagelo. *T. sherlocki* (21), *T. brasiliensis* (22) e *T. melanica* (23). Pontes entre os microtúbulos e os derivados mitocondriais (cabeça de seta). Ax: axonema, DM: derivados mitocondriais.

O axonema do flagelo segue o padrão de arranjo microtubular 9 + 9 + 2 (9 microtúbulos acessórios periféricos, 9 microtúbulos duplos em uma posição intermediária e 2 microtúbulos centrais); e dois derivados mitocondriais de mesmo tamanho (Fig. 21, 22 e 23).

Cada derivado mitocondrial apresenta três regiões distintas: dois corpos cristalinos elétronicamente lucentes, circundadas pela área de material cristalino elétron-denso e uma área cristalina periférica (Fig. 24).

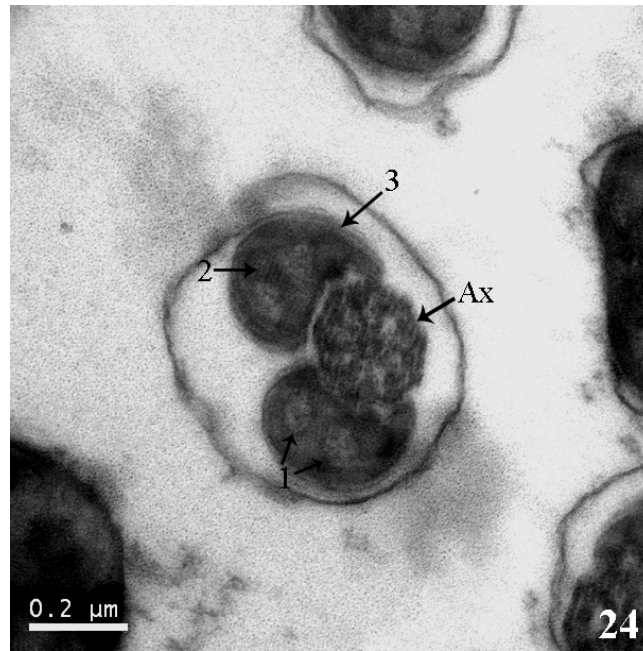


Figura 24: Elétron-micrografia das regiões dos derivados mitocondriais no espermatozoide de *T. brasiliensis*: duas áreas eletrôn-densas (1), área de material cristalino (2) e área cristalina periférica (3). Axonema (Ax).

Em secção longitudinal as cristas mitocondriais aparecem perpendiculares ao longo do eixo dos derivados mitocondriais (Fig. 25 e 26). Estes encerram antes do final do axonema; logo, o final do flagelo é composto somente pelo axonema (Fig. 22).

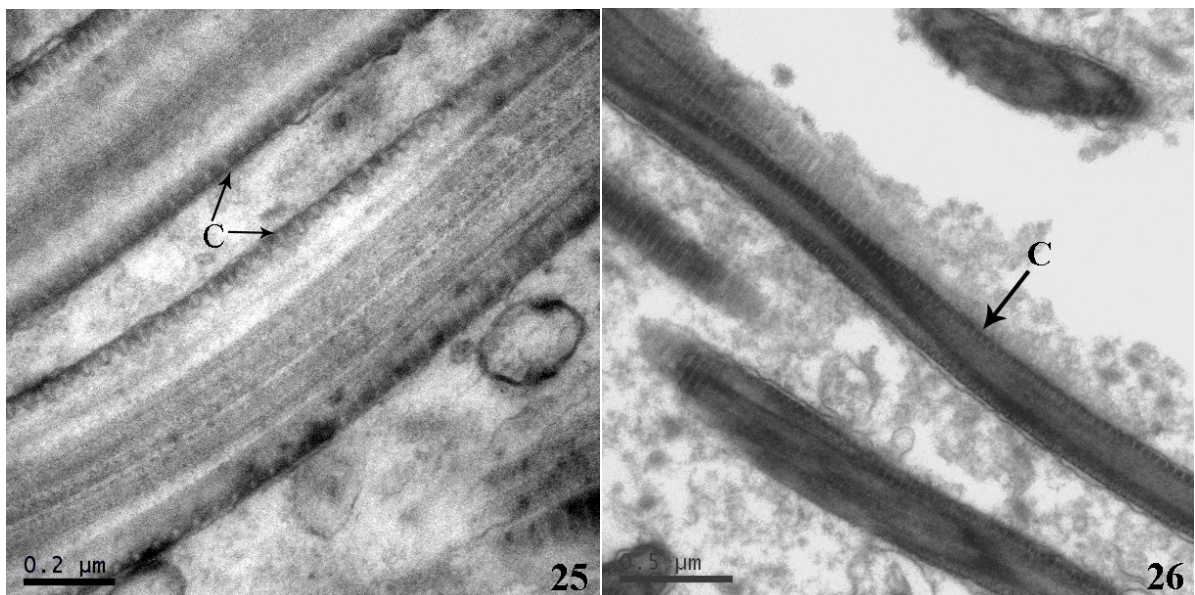


Figura 25 e 26: Elétron-micrografia da região do flagelo no espermatozoide de *T. brasiliensis* (25) e *T. sherlocki* (26), evidenciando as cristas dos derivados mitocondriais (C).

5. DISCUSSÃO:

A produção de mais de um tipo de espermatozoide, como observado nos cinco táxons aqui apresentados, já foi registrada para outros Hemiptera, como nas famílias Pentatomidae (Araújo et al., 2011), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006) e Largidae (Araújo et al., 2012). Em todas as espécies, o polimorfismo dos espermatozoides se deve a diferenças nos comprimentos totais, do núcleo e do flagelo.

O comprimento total dos espermatozoides curtos e longos dos integrantes do complexo “brasiliensis” foram maiores do que os anteriormente descritos em Hemiptera (Báo & De Souza, 1994; Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006; Araújo et al., 2010, 2011, 2012). O maior tamanho até então pertencia a *Brontocoris tabidus* (Pentatomidae) (Araújo et al., 2011), com os curtos medindo 278µm e os longos 322µm, consideravelmente menores do que os dos táxons aqui estudados, com os maiores curtos medindo 479µm e os longos, 1636 µm, ambos pertencentes a *Triatoma brasiliensis macromelasoma*. Em relação aos Triatominae, somente Báo & De Souza (1994) citam o tamanho de *Rhodnius prolixus* como sendo de aproximadamente 350µm. No entanto, não é feita nenhuma referência à presença de mais de uma classe de comprimento dos espermatozoides dessa espécie, logo é possível inferir que a característica do espermatozoide dimórfico pode ser em nível de gênero na subfamília Triatominae.

De acordo com a análise estatística realizada, tanto os espermatozoides curtos quanto longos de *Triatoma br. macromelasoma* se diferenciaram de todos os demais táxons estudados. *Triatoma sherlocki* também apresentou variação significativa em seus espermatozoides curtos, se diferenciando de todos os outros membros do complexo, e em seus espermatozoides longos quando comparados a *Triatoma melanica*. Embora *T. brasiliensis* e *T. br. macromelasoma* sejam consideradas as formas mais intimamente relacionadas do complexo “brasiliensis” (Costa et al., 2013), nesse estudo, elas se diferenciaram com base no comprimento de seus espermatozoides e a espécie mais próxima de *T. brasiliensis* na análise aqui realizada foi *T. juazeirensis*. Para esse estudo, os espécimes de *T. br. macromelasoma* utilizados são provenientes de um “pool” de diferentes formas fenotípicas, coletadas em 10 localidades no estado do Pernambuco (Rocha, 2011). E, cada um dos demais táxons foi proveniente de uma mesma população, coletadas em uma localidade. Com base nisso, levanta-se a hipótese de que a diferenciação apresentada em *T. br. macromelasoma* pode ser devido aos cruzamentos entre populações, causando uma variação no tamanho dos espermatozoides. Além disso, em casos de cruzamento entre os diferentes táxons do complexo, resultando em híbridos férteis, como previamente observado (Costa et al., 2003b;

Correia et al., 2013), os machos *T. br. macromelasoma* poderiam ter vantagem na fertilização dos ovos, uma vez que espermatozoides mais longos, caso estejam relacionados a derivados mitocondriais mais extensos, teriam mais energia para a locomoção.

Uma das implicações mais curiosas sobre a manutenção da produção de tipos diferentes de espermatozoides pelo mesmo macho foi abordada por Swallow & Wilkison (2002), no qual os autores sugerem que um deles pode ser menos apto ou inapto para a fertilização, caso já comprovado em algumas espécies de Lepidoptera (Cook & Wedell, 1999; Garvey et al., 2000; Mancini & Dolder, 2001). Segundo eles, os espermatozoides menos aptos ou inaptos, chamados de *paraesperma*, podem servir para: fornecer energia tanto para a fêmea quanto para os zigotos em formação; ajudar no transporte e dissociação dos feixes de espermatozoides mais longos (*eusperma*) até o órgão de armazenamento da fêmea; a mobilidade e o volume do *paraesperma* na fêmea podem servir como sinal para que ela altere a absorção, armazenamento ou a utilização do *eusperma*; funcionar como tampão para impedir a entrada de espermatozoides de cópulas posteriores e incapacitar espermatozoides de outros machos armazenados anteriormente pela fêmea. Além disso, também é levantada a hipótese de que em espécies que produzem mais de uma classe de espermatozoides, e ambos são competentes para a fertilização, esse fenômeno pode representar adaptações para fertilização em diferentes estágios de vida reprodutiva da fêmea ou sob diferentes condições de cópula.

Em *Drosophila* spp. (Diptera: Drosophilidae) machos produzem espermatozoides de duas ou mais classes de comprimento diferentes e as fêmeas armazenam preferencialmente os espermatozoides maiores nas suas espermatecas. Uma análise quantitativa dos tipos de espermatozoides em *D. subobscura* Collin in Gordon, 1936 mostrou que os espermatozoides mais compridos eram preferencialmente estocados na espermateca para serem usados na fertilização dos ovos, embora os espermatozoides menores também tenham sido observados, mas em menor quantidade (Bressac & Hauschteck-Jungen, 1995). Além disso, foi observado que em seis espécies de *Drosophila* Fällén, 1823, os espermatozoides mais curtos não participam da fertilização (Snook & Karr, 1998; Takamori & Kurokawa, 1986). Pasini et al. (1996) criticam essa teoria ao encontrar espermatozoides longos e curtos na espermateca de fêmeas copuladas de *D. subobscura*; segundo eles, os curtos podem ser usados em casos de fertilização tardia, não imediatamente após a cópula, já que estudos anteriores (Bressac & Hauschteck-Jungen, 1995) demonstraram que os mesmos podem sobreviver por bastante tempo no órgão de armazenamento feminino.

Em *Graptopsaltria nigrofuscata* Sueur, 2001 (Cicadidae), ambos os espermatozoides, curtos e longos, foram transferidos do macho para a fêmea (Kubo-Irie et al., 2003). Neste caso, os autores concluíram que o espermatozoide longo é o tipo competente para a fertilização, uma vez que somente ele foi encontrado no ovo. Além disso, sugeriram uma deficiência no curto, possivelmente no genoma, uma vez que em todos os outros aspectos os espermatozoides são similares.

Em *Largus rufipennis* Laporte, 1832 (Largidae), Araújo et al. (2012) observaram uma maior proporção de espermatozoides longos do que curtos tanto na vesícula seminal quanto na espermateca. No presente estudo as medições foram feitas apenas com os espermatozoides das vesículas seminais dos machos, nas quais foi observada uma predominância de curtos. Apenas *T. brasiliensis* teve os espermatozoides armazenados na espermateca medidos e foram encontrados apenas espermatozoides longos, podendo-se inferir que este tipo é o usado para a fertilização dos ovos (Baffa et al., dados não publicados).

Um fenômeno comum nos insetos é a organização dos espermatozoides em feixes nas vesículas seminais (Kubo-Irie et al., 2003; Lino-Neto et al., 2008) e, na maioria das vezes, estes 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, 2006; Araújo et al., 2010). Entretanto, essa condição não foi vista em Largidae (Heteroptera) (Araújo et al., 2012) e nos membros do complexo “brasiliensis”, o que sugere que em Heteroptera os espermatozoides são mantidos individualizados nas vesículas seminais.

Os espermatozoides de todos os táxons do complexo “brasiliensis” são longos e filiformes, compostos pela cabeça e flagelo, característica comum entre os insetos. Exceções a esse padrão já foram observadas em: Ephemeroptera, em que três espécies de Leptophlebiidae apresentaram espermatozoides muito pequenos, de até 2µm, aflagelados e imóveis (Gaino & Mazzini, 1991); Hemiptera, em que três espécies de Aleyrodidae também apresentaram espermatozoides aflagelados e imóveis (Báo et al., 1997); e Hymenoptera, em que os espermatozoides de duas espécies de Eulophidae são finos e longos, mas espiralados (Santos et al., 2013).

Em relação às estruturas dos espermatozoides, em *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Auchenorrhyncha: Aethalionidae) o núcleo tem formato oval na extremidade anterior e é preenchido por cromatina condensada com espaços elétron-lucentes, presentes em todo seu comprimento (Araújo et al., 2010). Em algumas espécies de Pentatomidae (Heteroptera) já estudadas, esses espaços elétron-lucentes também foram observados (Araújo et al., 2011). Diferindo destes, o núcleo dos cinco táxons aqui estudados é linear, tendo sua extremidade

anterior mais afilada que a posterior, e é preenchido por cromatina condensada homogênea, não apresentando os espaços elétron-lucentes descritos acima.

O adjunto centriolar nos membros do complexo “brasiliensis” é uma estrutura formada ao redor do centríolo na região de transição entre o núcleo e o flagelo, e segundo Chawanji et al. (2006) e Araújo et al. (2011) pode ter uma função mecânica, prendendo a cabeça e o flagelo juntos.

Em relação aos derivados mitocondriais, algumas espécies de Lepidoptera apresentam dois de tamanhos diferentes (Garvey et al., 2000; Mancini & Dolder, 2004). Em algumas famílias de Diptera (Sciariidae, Mycetophilidae, Ptychopteridae e Psychodidae) pode ser visto apenas um derivado mitocondrial, enquanto em outras (Drosophilidae, Syrphidae, Sepsidae e Muscidae) são observados dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes, e em Culicidae e Simuliidae, os dois têm tamanhos semelhantes. (Phillips, 1970; Dallai & Afzelius, 1991, Fausto et al., 1995).

Os dois derivados mitocondriais dos espermatozoides do complexo “brasiliensis” são de mesmo tamanho, conforme já foi observado em outros Heteroptera, como *L. rufipennis* (Araújo et al., 2012), *Edessa mediatubunda* (Fabricius, 1794), *Piezodorus guildini* (Westwood, 1837), *Thyanta perditor* (Fabricius, 1794) (Fernandes & Bão, 2001), *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Bão & De Souza, 1994), *Raphigaster nebulosa* (Poda, 1761), *Coptosoma scutellatum* (Geoffroy, 1785) e *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Mercati et al., 2009), além dos Auchenorrhyncha, *Monomatapa matoposa* Boulard, 1980, *Diceroprocta biconica* (Walker, 1850) e *Kongota punctigera* (Walker, 1850) (Chawanji et al., 2007).

O espermatozoide de Heteroptera tem certas características que não são encontradas em outros insetos e consideradas sinapomorfias dentro da subordem: dois ou três corpos cristalinos dentro dos derivados mitocondriais e pontes aderidas a cisternas, conectando os derivados mitocondriais aos microtúbulos do axonema. Essas características foram encontradas em Pentatomidae (Fernandes & Bão, 2001; Mercati et al. (2009), em Pentatomidae, Plataspidae e Pyrrhocoridae (Mercati et al., 2009), em Hydrometridae, Corixidae, Nepidae, Coreidae, Pyrrhocoridae, Lygaeidae, Reduviidae e Cimicidae (Dallai & Afzelius, 1980) e em Reduviidae (Bão & De Souza, 1994; Dolder, 1988). No presente estudo essas características foram observadas em todos os táxons do complexo “brasiliensis”, corroborando a hipótese da sinapomorfia, indicando ser este um caráter útil em estudos filogenéticos.

Segundo Fernandes & Bão (2001), os corpos cristalinos podem servir como reserva energética ou ter função mecânica, sendo um elemento estabilizante para esses espermatozoides tão longos. A presença das pontes estabelece uma relação estrutural e funcional entre os

componentes do flagelo, sendo essencial para produzir movimento coordenado (Báo & De Souza, 1994).

O arranjo microtubular do axonema dos espermatozoides aqui estudados segue o padrão de 9+9+2, o mais comum encontrado entre os insetos, porém variações no número de elementos centrais podem ser vistas em algumas ordens. Os exemplos mais impressionantes são: a substituição do par central de microtúbulos por sete microtúbulos centrais arranjados simetricamente em duas espécies de Trichoptera (Phillips, 1970); um único microtúbulo central, apresentando padrão microtubular 9+9+1, como sendo característico de espécies de mosquito (Breland et al., 1966, 1968); e um padrão microtubular 9+9+0 observado no espermatozoide de Psychodidae (Diptera) (Fausto et al., 1995).

Estruturas frequentemente encontradas em espermatozoides de insetos são os corpos acessórios, que flanqueiam os derivados mitocondriais (Baccetti & Afzelius, 1976). Já foram observadas em diversas ordens, como Phasmatodea (Gottardo et al., 2012), Hymenoptera (Santos et al., 2013; Oliveira et al., 2013) e Coleptera (Dias et al., 2013) No presente estudo não foi observada a presença destes. Os corpos acessórios são possivelmente uma característica homoplástica em Hemiptera, considerando que a presença destas estruturas já foi relatada na subordem Auchenorrhyncha (Araújo et al., 2010).

6. CONCLUSÃO:

- Os espermatozoides de todos os membros do complexo “brasiliensis” são dimórficos, considerados como curtos e longos;

- Houve diferenciação significativa dos espermatozoides de *Triatoma brasiliensis macromelasoma*, tanto curtos quanto longos, quando comparados aos dos demais táxons aqui estudados. Além disso, os espermatozoides curtos de *T. sherlocki* também se diferenciaram dos demais táxons e, os longos se diferenciaram dos de *T. melanica*.

- A morfologia ultraestrutural de todos os integrantes do complexo “brasiliensis” são semelhantes;

- Duas características identificadas no espermatozoide dos cinco táxons (dois corpos cristalinos no interior de cada derivado mitocondrial e as pontes aderidas a cisternas entre os derivados mitocondriais e os microtúbulos) são consideradas sinapomorfias da subordem Heteroptera.

7. PERSPECTIVAS:

- Realizar a morfometria dos espermatozoides de *T. br. macromelasoma* coletados na sua localidade tipo (Petrolina – PE).
- Realizar a morfometria de núcleos separadamente de todos os táxons do complexo “brasiliensis”.
- Analisar o conteúdo das espermatecas de *T. br. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*.

8. BIBLIOGRAFIA:

Afzelius, B.A.; Dallai, R.; Lindskog, P., 1985. Spermatozoa of Saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). *J. Ultrastr. Res.* 90: 304-312.

Araújo, V.A., Bão, S.N., Lino-Neto, J., 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Acta Zoologica* 93: 239–244.

Araújo, V.A., Bão, S.N., Moreira, J., Neves, C.A., Lino-Neto, J., 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron* 41 (4): 306–311.

Araújo, V.A., Lino-Neto, J., Ramalho, F.S., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Micron* 42: 560-567.

Baccetti, B. & Afzelius, B.A., 1976. The biology of the sperm cell. Karger, Basel, New York, vol. 10. 254 p.

Bão, S.N. & De Souza, W., 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue & Cell* 26 (3): 299–308.

Bão, S.N., Kitajima, E.W., Callaini, G., Lupetti, P., Dallai, R., 1997. Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera, Aleyrodidae). *Acta Zool.* 78(2): 163-170.

Barth, R., 1958. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 56 (1): 209-238.

Breland, O.P., Eddleman, C.D., Biesele, J.J., 1968. Studies of insect spermatozoa. I. *Entomol. News.* 79:197 .

Breland, O.P., Gassner, G., Riess, R.W., Biesele, J.J., 1966. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. *Can. J. Genet. Cytol.* 8: 759.

Bressac, C. & Hauschteck-Jungen, E., 1995. *Drosophila subobscura* females preferentially select long sperm for storage and use. *J. Insect Physiol.* 42 (4): 323-328.

Chapman, R.F., 1998. Male reproductive system. In: *The Insects: Structure and Function*. 4th ed. India: Cambridge University Press. pp. 268-294.

Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., 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., Villet, M.H., 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue & Cell* 38: 373-388.

Chawanji, A.S., Hodgson, A.N., Villet, M.H., Sanbornand, A.F., Phillips, P.K., 2007. Spermiogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Zool.* 88: 337-348.

Cook, P.A. & Wedell, N., 1999. Non-fertile sperm delay female remating. *Nature* 397:486

Correia, N., Almeida, C.E., Lima-Neiva, V., Gumiel, M., Donark, L.L., Lima, M.M., Medeiros, L.M.O., Mendonça, V.J., da Rosa, J.A., Costa, J., 2013. Cross-mating experiments detect reproductive compatibility between *Triatoma sherlocki* and other members of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Tropica* 128: 162-167.

Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E.M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A.C., Beard, C.B., 2003a. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 443-449.

Costa J., Almeida C.E., Dujardin J.P., Beard C.B., 2003b. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 637-639.

Costa, J., Almeida, J.R., Britto, C., Duarte, R., Marchon-Silva, V., Pacheco, R.S., 1998. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93(1): 7-13.

Costa J., Argolo A.M., Felix M., 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.

Costa, J., Barth, O.M., Marchon-Silva, V., Almeida, C.E., Freitas-Sibajev, M.G., Panzera, F., 1997a. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 493-498.

Costa, J., Correia, N.C., Neiva, V.L., Gonçalves, T.C.M., Félix, M., 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and a identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(6):785-789.

Costa, J., Dornak, L.L., Almeida, C.E., Peterson, A.T., 2014. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. *Parasites & Vectors* 7: 238.

Costa J., Felix M., 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. Nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.

Costa, J., Freitas-Sibajev, M.G.R., Marchon-Silva, V., Pires, M.Q., Pacheco, R.S., 1997b. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz* 92(4): 459-464.

Costa, J. & Marchon-Silva, V., 1998. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores* 5:23-34.

Costa, J., Peterson, A.T., Beard, C.B., 2002. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg* 67(5): 516-520.

Dallai, R. & Afzelius, B.A., 1980. Characteristics of the sperm structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). *J. Morphol.* 164: 301-309.

Dallai, R. & Afzelius, B.A., 1991. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) and *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae) (Diptera). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 20: 215-222.

Danilova, L.V., Gaber, E.S., Shinyaeva, L.I., 1984. Spermiogenesis and the ultrastructure of mature sperm in *Eurygaster intergriceps*. *Gamete Res.* 9: 75–86.

Dias, G., Oliveira, C.M., Lino-Neto, J., 2013. Sperm morphology and phylogeny of lagriids (Coleoptera, Tenebrionidae). *Arthropod Struct. Dev.* 42(5): 379-384.

Dolder, H., 1988. Cytoskeletal bridges between organelles in sperm flagellum of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Ultrast Res. Mol. Stru. Res.* 101(2-3): 159-164.

Dujardin, J.P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., Catalá, S., 2009. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica* 110(2): 101-111

Fausto A.M., Mazzini M., Maroli M., Feliciangeli D., 1995. Spermatozoon of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) (Diptera, Psychodidae). *Boll. Zool.* 62: 339-343

Fernandes, A.P. & Bão, S.N., 2001. Ultrastructural studies on spermiogenesis and spermatozoa of insect pests (Hemiptera: Pentatomidae). *Curr. Res. Adv. Agric. Entomol.*(1): 13-26.

Fox, J., Weisberg, S., 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.

Freitas, S.P.C., Gonçalves, T.C.M., Serrão, J.E., Costa, J., Santos-Mallet, J.R., 2010. Male reproductive system structure and accessory glands ultrastructure of two species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* 41:518-525.

Freitas, S.P.C., Santos-Mallet, J.R., Costa, J., Souza, A.L.B., Serrão, J.E., Gonçalves, T.C.M., 2008. A comparative study of testis follicles in species of *Triatoma* (Hemiptera, Triatominae). *Animal Biol.* 58: 227–233.

Gaino, E. & Mazzini, M., 1991. Aflagellate sperm in three species of Leptophlebiidae (Ephemeroptera). *In. J. Insect Morphol. & Embryol.* 20(3): 119-125.

Galvão, A.B., 1956. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Bras. Mal. D. Trop.* 7: 455-457.

Garvey, L.K., Gutierrez, G.M., Krider, H.M., 2000. Ultrastructure and morphogenesis of the apyrene and eupyrene spermatozoa in the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 93(5): 1147-1155.

Gottardo, M., Mercati, D., Dallai, R., 2012. The spermatogenesis and sperm structure of *Timema poppensis* (Insecta: Phasmatodea). *Zoomorphology* 131: 209-223.

Jamieson, B.G.M., 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insects Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 320.

Jurberg, J., Rodrigues, J.M.S., Moreira, F.F.F., Dale, C., Cordeiro, I.R.S., Lamas-Junior, V.D., Galvão, C., Rocha, D.S., 2014. Atlas Icnográfico dos Triatomíneos do Brasil. (Vetores da doença de Chagas). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 52p.

Klowden, M.J., 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2^a ed. Academic Press. p. 210.

Kubo-Irie, M., Irie, M., Nakazawa, T., Mohri, H., 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *J. Insect Physiol.* 49: 983-991.

Lee, Y.H., 1985 Spermatogenesis of the water strider *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). *J. Ultrastr. Res.* 90: 235-250.

Lent, H. & Wygodzinsky, P., 1979. Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bul. Amer. Mus. Nat. History* 163: 123-520.

Lino-Neto, J., Dolder, H., Mancini, K., Mercati, D., Dallai, R., 2008. The short spermatodesm of *Arge pagana* (Hymenoptera: Symphyta). *Tissue & Cell* 40: 185-193.

Mancini, K., Dolder, H., 2001. Ultrastructure of apyrene and eupyrene spermatozoa from the seminal vesicle of *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Tissue & Cell* 33(3): 301-308.

Mancini, K., Dolder, H., 2004. Dichotomic spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(1): 13-23.

Mendonça VJ, da Silva MT, de Araújo RF, Júnior JM, Júnior MB, Almeida CE, Costa J, Graminha MA, Cicarelli RM, da Rosa JA. 2009. Phylogeny of *Triatoma shelocki* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 858-864

Mercati, D., Giusti, F., Dallai, R., 2009. A novel membrane specialization in the sperm tail of bug insects (Heteroptera). *J. Morphol.* 270: 825-833

Monteiro, F.A., Donnelly, M.J., Beard, C.B., Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:46-56

Neiva, A. & Lent, H., 1941. Sinopse dos Triatomíneos. *Revista de Entomologia* 12: 61-92.

Oliveira, C. M., Fraga, F. B., Brito, P., Gomes, L. F., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2013. Morphology of spermatozoa of *Dissomphalus connubialis* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Bethyridae). *Micron* 44: 268-274

Pasini, M.E., Redi, C.A., Cavilglia, O., Perotti, M.E., 1996. Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue & Cell* 28: 165-175.

Phillips, D.M., 1970. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol.* 44(2): 243–277

RCore Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rocha, M.X.G., 2011. Estudo da variabilidade morfológica e do perfil isoenzimático em triatomíneos do complexo *Triatoma brasiliensis* do Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação. Rio de Janeiro, *Inst. Oswaldo Cruz*, 92p.

RStudio Team, 2012. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Santos, H. P., Zama, U., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2013. Sperm morphology of *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eulophidae). *Micron* 51: 36-40

Sherlok, I.A., 2000. Vetores. In Brener, Z., Andrade, Z.A, Barral-Neto, M., *Trypanosoma cruzi e doença de chagas*. 2^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-40.

Snook, R.S. & Karr, T.L., 1998. Only long sperm are fertilization-competent in six sperm-heteromorphic *Drosophila* species. *Curr. Biol.* 8: 291–294.

Swallow, J.G. & Wilkinson, G.S., 2002. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol. Rev.* 77: 153-182.

Takamori, H. & Kurokawa, H., 1986. Ultrastructure of the long and short sperm of *Drosophila bifasciata* (Diptera: Drosophilidae). *Zool. Sci.* 3: 847–858.

Triplehorn, C.A. & Jonhson, N.F., 2011. Ordem Hemiptera. In *Estudo dos insetos*. 7^a ed. São Paulo: Cengage Learning. pp. 270-334.

Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.

Weirauch, C., Schuh, R.T., 2011. Systematics and Evolution of Heteroptera: 25 Years of Progress. *Ann. Rev. Entomol.* 56: 487-510.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Elphick, C.S., 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Meth. Ecol. Evol.* 1: 3-14.

APÊNDICE

Spermatozoa of Triatominae

*Corresponding author:

e-mail: sfreitas2@gmail.com

Journal of Medical Entomology

phone: ++55 21. 2562.1232

fax: ++55 21.2573.4468

Sperm dimorphism in *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Triatominae)

Aline Fernandes Baffa^{a,b}, Jacenir Reis Santos-Mallet^a, Elidiomar Ribeiro Silva^b, Simone Patrícia Carneiro Freitas^a

^aSetor de Entomologia Médica e Forense, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ^bLaboratório de Insetos aquáticos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Abstract

The sperm is between the most diverse type of cells and its features can provide reliable data to distinguish taxas and phylogenetic relationships. The studies about the Heteroptera sperm are scarce and this is the first record in the genus *Triatoma*. For measurement, seminal vesicles and spermathecae of *Triatoma brasiliensis* were dissected and squashed on glass slides, spread and fixated with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodilate buffer, pH 7.2, and observed under Zeiss Primo Star photomicroscope AxioCam ICc1 equipped. For SEM, the drops of sperm suspension was spread on histological cover slips, fixated with glutaraldehyde 2,5% in 0,1 M sodium cacodylate buffer, pH 7,2, mounted on metallic support, covered with gold and observed under scanning electron microscope JEOL JSM 6390. The sperm of *T. brasiliensis* is thin and of two classes of length, short and long. The both types were observed in the seminal vesicle, with average sizes 465µm and 1263µm; in spermathecae only the long type was found, with 1327µm average size. The sperm is formed by the nucleus, anteriorly, and flagellum, comprising the axoneme and two mitochondrial derivates. The two mitochondrial derivates of *T. brasiliensis* are symmetric and is considered a synapomorphy in Hemiptera.

Key words: male reproductive system, Heteroptera, insect vector

1. Introduction:

The spermatozoon is between the most diverse type of cells and its morphology and ultrastructure can provide reliable data to distinguish taxa and phylogenetic relationships. The most diversity of these cells is found among the invertebrates, mainly in insects (Jamieson, 1987).

In insects, the spermatozoa are formed by the head and tail. The greater part of the head region is occupied by the nucleus, which have homogeneous appearance. Forward of the nucleus is the acrosome. This is a membrane-bound structure of glycoprotein with, in most insects, a granular extra-acrosomal layer and an inner rod or cone (Chapman, 1998). The motor portion of the flagellum is called axoneme, located on the nucleus base, and is compound by microtubules from the centriole. The spermatozoon of the most Pterygota has a flagellum with 9+9+2 microtubule arrangement (nine outermost single accessory microtubules, nine doublets and a central pair) with two mitochondrial derivatives which flank the axial filament (Klowden, 2007).

The rapid and divergent evolution of sperm is a widespread pattern that occurs in some insect groups. An example of diversification of sperm morphology is the sperm polymorphism, in which two or more types of sperm are found in a single male ejaculate. This phenomenon can include variations in length and structure of these cells (Swallow & Wilkinson, 2002).

Some species of *Drosophila* produce nucleated sperm with two different sizes, a kind of polymorphism called polymegaly (Pasini et al., 1996). Another type of sperm polymorphism is recorded in Lepidoptera, with males producing nucleated (eupyrene) and non-nucleated (apyrene) sperm (Silberglie et al., 1984).

The most intriguing implication of the sperm polymorphism is the reason of production maintenance of two different types of cells with different probability to fertilize

the eggs. There are some possible explanations for this phenomenon: the increasing of male fertilization success, when the sperm function as a buffer (Woodward, 1940, Baker & Bellis, 1988, Ladle & Foster, 1992); supply of nutrients to females (Sivinski, 1980) and as different fertilization strategy of “bundles” of sperm (Joly et al., 1991, Till-Bottraud et al., 2005).

In Hemiptera, the production of polymorphic sperm that differ in the length of the head and/or flagellum have been already recorded in Pentatominae (Araújo et al., 2011), Largidae (Araújo et al., 2012) and Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003; Chawanji et al., 2005, 2006). In Cicadidae, the movement of both sperm types are similar in both the male and female organs. Both sperm are transferred alive from the male to the female without any clear preference (Kubo-Irie et al., 2003).

Beatty and Burgoyne (1971) reported that in *Drosophila obscura* the frequency of occurrence of the shortest class of sperm was considerably reduced in the female storage organs. A similar phenomenon was reported in *D. bifasciata*, that short sperm were hardly found in either the spermatheca or the seminal receptacles (Takamori & Kurokawa, 1986). These authors concluded that short sperm are not involved in fertilization of eggs.

Morphological variation has been observed in the ultrastructure of spermatozoa between insects (Danilova et al., 1984, Afzelius et al., 1985, Bão and De-Souza, 1994, Lee, 1985, Chawanji et al., 2005, 2006, 2007; Araújo et al., 2010, 2011, 2012) showing enough diversity to justify descriptive studies that may support taxonomic analysis, reproductive biology and phylogeny.

This is the first study of sperm morphometry in Triatominae subfamily. Thereby, this may contribute to the knowledge of the sperm morphology in Triatominae and may be further used in phylogenetic analyses of Heteroptera.

2. Materials and methods:

2.1 Insect rearing:

The insects were obtained from F1 colonies of specimens collected in the intradomicile and peridomicile, in rural localities of Varzea Alegre municipality, Ceará States, according Manual de Normas Técnicas da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (MS 1980). These were maintained in the Setor de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, in a dark glass vial (30 cm height X 15 cm diameter) covered with nylon screen, at $29\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ RH, and 12h photoperiod. A folded filter paper was placed inside the vial to increase the contact surface and refuge, as well as to remove the humidity excess. The insects were fed weekly with blood of Swiss mice (Protocol CEUA- FIOCRUZ LW-14/10).

2.2 Light microscopy:

Seminal vesicles and spermathecae were dissected and squashed on clean glass microscope slides, followed by spreading and fixation with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodilate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the slides were observed with Zeiss Primo Star photomicroscope AxioCam ICc1 equipped, to allow measurement of the spermatozoa. Approximately 50 spermatozoa of males and 50 of females were analyzed and measured using the software Image Pro-Plus 4.5 and the lengths were expressed as the mean of the total number examined.

2.3 Scanning electron microscopy (SEM):

To evaluate the general structure of the spermatozoon, was followed the same methodology for measuring, but the drops of sperm suspension was spread on histological cover slips. After fixation with glutaraldehyde 2,5% in 0,1 M sodium cacodylate buffer, pH 7,2, and the cover slips drying, these were mounted on metallic support (stub), covered

with a thin layer of gold and observed under scanning electron microscope JEOL JSM 6390 from Eletron Microscopy Platform of IOC.

3. Results:

The sperm of *Triatoma brasiliensis* is thin and of two classes of length, being classified as short and long (Fig. 1). The both types were observed together only in the seminal vesicle of the males; in females, only the long type were found. The morphometry, on males, was based on 100 short sperm and 37 long sperm. On females, 93 long sperm were measured. For the males, the average size of short sperm was 465 μ m, and of the long sperm was 1263 μ m; for the females, the average of the long sperm was 1327 μ m.

The sperm is formed by the nucleus, inserted in the anterior region, and flagellum, comprising the double axial wire and two mitochondrial derivates. The nucleus has the anterior extremity more thin than the posterior one (Fig. 2), and ends on the anterior region of the flagellum (Fig. 3). The two mitochondrial derivates flank the axoneme, and end before the final of this structure. Therefore, on the posterior extremity of the flagellum, only the axoneme is observed (Fig. 4).

4. Discussion:

The production of more than one type of sperm by the same male, as observed here in *T. brasiliensis*, have been already recorded in other Hemiptera, as Pentatomidae (Araújo et al., 2011), Cicadidae (Kubo-Irie et al., 2003, Chawanji et al., 2005, 2006, 2007) and Largidae (Araújo et al., 2012). In all species, the sperm polymorphism is due to differences in total and nuclear lengths. As well as Largidae, Cicadidae and Pentatomidae, *T. brasiliensis* shows sperm with two different sizes.

The total lengths of the short and long sperm of *Triatoma brasiliensis* are larger than previously described for Hemiptera (Báo & De Souza, 1994, Kubo-Irie et al., 2003, Araújo et al., 2010, 2011). The larger size belongs to *Brontocoris tabidus* (Pentatomidae), with short sperm measuring 278µm and the long ones, 322µm (Araújo et al., 2011), considerably smaller than sperm of the species studied here. In relation to Triatominae, only Báo & De Souza (1994) cited sperm size of *Rhodnius prolixus* to be approximately 350µm. However, it is not clear if this size refers to the short or the long sperm, then we can infer that the characteristic of dimorphic sperm can be at genus at the Triatominae.

In *Drosophila* spp., males produce sperm of two classes of size and the females preferably store the largest sperm in their spermathecae. In a quantitative analysis of two kinds of sperm showed that in *D. subobscura*, the females preferentially select long sperm for store and utilize them for fertilization (Bressac & Hauschteck-Jungen, 1996). Similarly, only longer sperm were found in eggs of six *Drosophila* species with polymorphic sperm (Snook & Karr, 1998).

Of Hemiptera already studied, in *G. nigrofusca* (Cicadidae), both types of sperm, short and long, are transferred from the male to the female without priority, and the authors concluded that only the long sperm is competent for fertilization, once only this type was found on the egg, and suggested a deficiency of the short sperm, possibly a defective genome, since they are similar in all other aspects (Kubo-Irie et al., 2003). In *Largus rufipennis* (Largidae), Araújo et al., (2012) observed a higher proportion of long than short sperm both in seminal vesicle and in spermathecae. These authors believed that the maintenance of polymorphic sperm ensures the sperm competition, increasing the probability of paternity. In the present study, only long sperm were observed in the female spermathecae of *T. brasiliensis*, and that is, probably, the type selected for fertilization, as observed in other insects.

In species of Lepidoptera studied were observed two mitochondrial derivates with different sizes (Phillips, 1970). The sperm of some Diptera (Sciariadae, Mycetophilidae, Ptychopteridae e Psychodidae) has only one mitochondrial derivate; in the families Drosophilidae, Syrphidae, Sepsidae e Muscidae, are observed two mitochondrial derivates of different sizes, and in Culicidae e Simuliidae, they have the similar size (Phillips, 1970, Fausto et al., 1995).

The two mitochondrial derivates of *T. brasiliensis* are symmetric, as observed in *L. rufipennis* (Heteroptera) (Araújo et al., 2012). In this last study, the authors considered this feature a synapomorphy in Hemiptera. However, have been shown asymmetric mitochondrial derivates in *Jalysus* (Berytidae) (Phillips, 1970), indicating that this synapomorphy feature is invalid for the order Hemiptera.

The present study shows the first record of sperm dimorphism in Triatominae, as well as basic features of the sperm structure of *T. brasiliensis*, information that may be further used in phylogenetic analyses.

Acknowledgements

We thank the Platform of Electron Microscopy Rudolph Barth, IOC, FIOCRZ for support and to CAPES for grants.

References

- Afzelius BA, Dallai R, Lindskog P 1985. Spermatozoa of Saldid bugs (Insecta, Hemiptera, Leptopodomorpha). *J Ultrastr Res* 90: 304-312.
- Araújo VA, Bão SN, Lino-Neto J 2012. Polymorphism of spermatozoa in *Largus rufipennis* Laporte 1832 (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Acta Zool* 93: 239–244.

Araújo VA, Bão SN, Moreira J, Neves CA, Lino-Neto J 2010. Ultrastructural characterization of the spermatozoa of *Aethalion reticulatum* Linnaeus 1767 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Aethalionidae). *Micron* 41: 306–311.

Araújo VA, Lino-Neto J, Ramalho FS, Zanuncio JC, Serrão JE 2011. Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Micron* 42: 560-567.

Baker RR, Bellis MA 1988. “Kamikaze” sperm in mammals. *Anim Behav* 36: 936–939.

Bão SN, De Souza W 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*; Hemiptera, Reduviidae). *Tissue Cell* 26: 299–308.

Beatty RA, Burgoyne PS 1971. Size classes of the head and flagellum of *Drosophila* spermatozoa. *Cytogenetics* 10, 177–189.

Chapman RF 1998. Male reproductive system. In: *The Insects: Structure and Function*. 4th ed. India: Cambridge University Press. pp. 268-294.

Chawanji AS, Hodgson AN, Villet MH 2005. Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 37: 257-267.

- Chawanji AS, Hodgson AN, Villet MH 2006. Sperm morphology in five species of cicadettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38: 373-388.
- Chawanji AS, Hodgson AN, Villet MH, Sanbornand AF, Phillips PK 2007. Spermiogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Zool* 88: 337–348.
- Danilova, LV, Gaber ES, Shinyaeva LI 1984. Spermiogenesis and the ultrastructure of mature sperm in *Eurygaster intergriceps*. *Gamete Res* 9: 75–86.
- Fausto AM, Mazzini M, Maroli M, Feliciangeli D 1995. Spermatozoon of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) (Diptera, Psychodidae). *Boll Zool* 62, 339-343.
- Jamieson BGM 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insects Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 320.
- Joly D, Cariou ML, Lachaise D 1991. Can sperm competition explain polymorphism in *Drosophila teissieri*? *Evol Biol* 5: 25–44.
- Klowden MJ 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2^a ed. Academic Press. p. 210.
- Kubo-Irie M, Irie M, Nakazawa T, Mohri H 2003. Ultrastructure and function of long and short sperm in Cicadidae (Hemiptera). *J Insect Physiol* 49: 983-991.
- Ladle RJ, Foster E 1992. Are giant sperm copulatory plugs? *Acta Oecol.* 13: 635–638.

Lee YH 1985 Spermatogenesis of the water strider *Gerris paludum* (Heteroptera, Gerridae). *J Ultrastr Res* 90: 235-250.

MS - Ministério da Saúde 1980. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Manual de normas técnicas da Campanha de Controle da Doença de Chagas. Brasília, 166 pp.

Pasini ME, Redi CA, Cavilglia O, Perotti M.E 1996. Ultrastructural and cytochemical analysis of sperm dimorphism in *Drosophila subobscura*. *Tissue Cell* 28: 165-175.

Phillips DM 1970. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* 44, 243–277.

Silberglied RE, Shepherd JG, Dickinson JL 1984. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera. *Am Nat* 123: 255-265.

Sivinski J 1980. Sexual selection and insect sperm. *Fla Entomol* 63: 99–111.

Swallow JG, Wilkinson GS 2002. The long and short of sperm polymorphisms in insects. *Biol Rev* 77: 153-182.

Takamori H, Kurokawa H 1986. Ultrastructure of the long and short sperm of *Drosophila bifasciata* (Diptera: Drosophilidae). *Zool Sci* 3: 847–858.

Till-Bottraud I, Joly D, Lachaise D, Snook RR 2005. Pollen and sperm heteromorphism: convergence across kingdoms? *J Evol Biol* 18: 1–18.

Woodward TM 1940. The function of the apyrene spermatozoa of *Goniobasis laqueata*. *J Exp Zool* 85: 103–125.

Figures



Figure 1: Schematic drawing of the short and long sperm of *T. brasiliensis*.

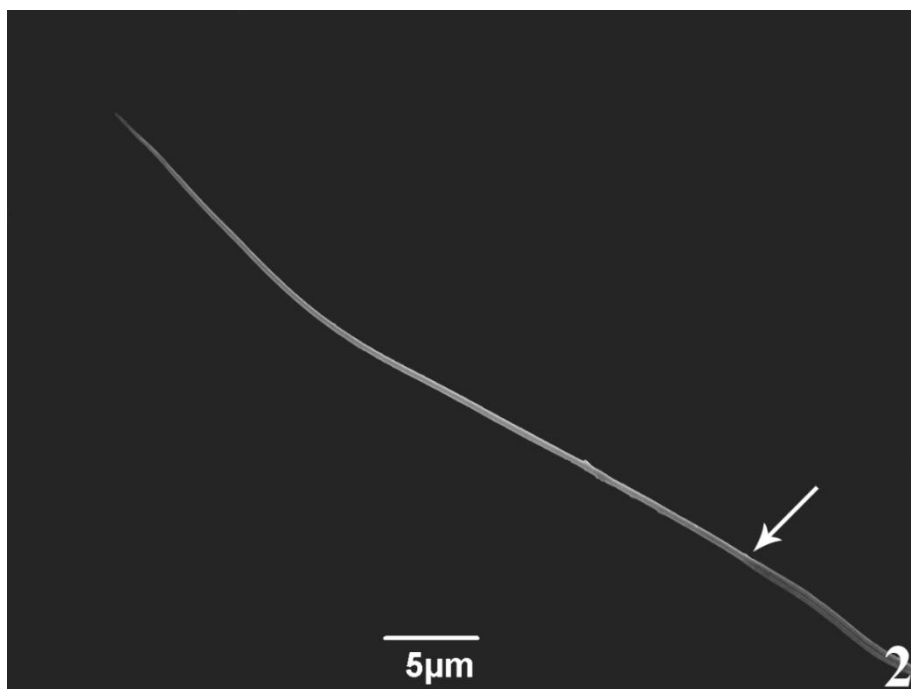


Figure 2: Electron micrograph of the nucleus of *T. brasiliensis* sperm. Star of region of flagellum (arrow).

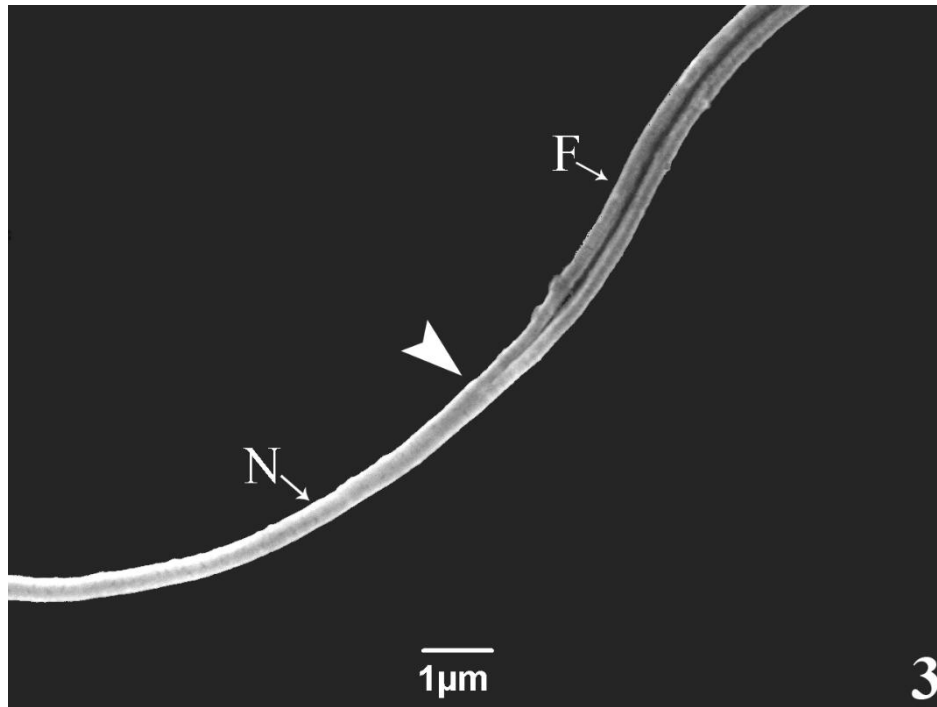


Figure 3: Electron micrograph of the junction region of nucleus (N) and flagellum (F) (arrowhead) in *T. brasiliensis* sperm.

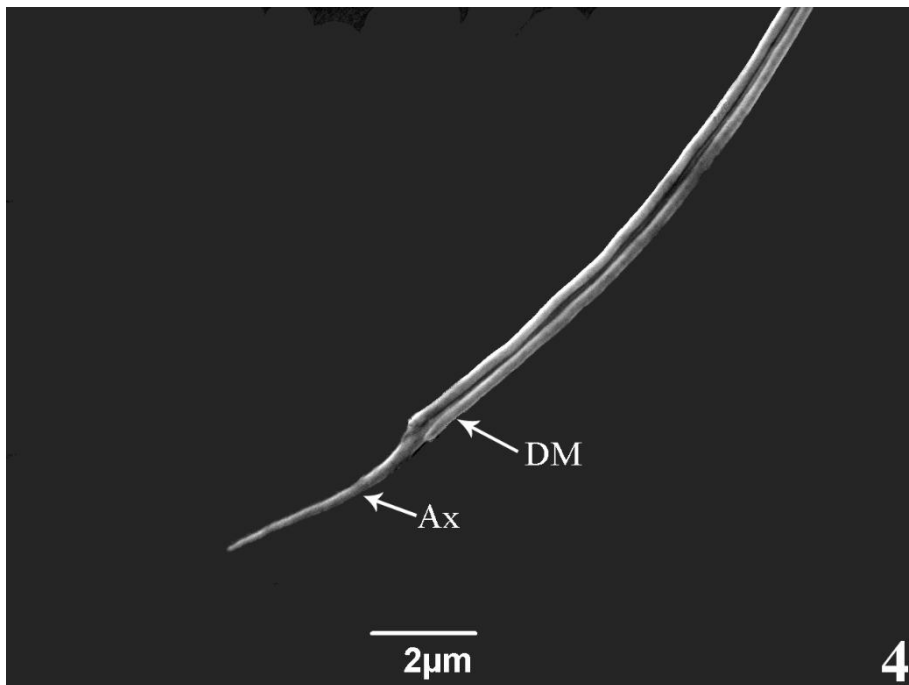


Figure 4: Electron micrograph of flagellum region in *T. brasiliensis* sperm. Axoneme (Ax), derived mitochondrial (DM).