

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Análise morfológica das espermátides e dos
espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius)
(Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores**

Khesller Patrícia Olázia Name

Dissertação de Mestrado

2008

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Análise morfológica das espermátides e dos
espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius)
(Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores**

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do
título de Mestre em Biologia Animal.

Brasília-DF
2008

Ficha Cartográfica

Name, Khesller Patrícia Olázia

Análise morfológica das espermátides e dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores.

Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília. 2008.

xiv + 80p: il.

Dissertação: Mestrado em Biologia Animal

1. Espermatozóide de inseto; 2. Calliphoridae; 3. *Chrysomya megacephala*; 4. Análise estrutural e ultra-estrutural; 5. Espermiogênese.

I – Universidade de Brasília

II - Título

“A vontade de se tornar algo melhor a cada dia é que faz do ser humano uma máquina de sonhar. Projetar idéias e desejos e lutar para transformar o que um dia foi um simples pensamento em uma situação real. Nunca desistir de algo que se deseja muito e que se almeja fazer parte da vida. O ser humano sonha!!! Mas se ele apenas sonhasse nunca saberia do que é capaz... É preciso conquistar os sonhos....”.

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

À minha querida avó Maria (*in memoriam*) um exemplo de humanidade, humildade e sabedoria. Obrigada por estar sempre ao meu lado e nortear minhas decisões nos momentos difíceis!

Agradecimentos

A Deus, pela vida.

À Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão, pela orientação, incentivo, amizade e credibilidade em mim depositados. Professora, obrigada pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho, à atenção à mim dispensada e também pela paciência.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol-Luz pela ajuda incondicional, pelas explicações mesmo quando eu não estava entendendo muita coisa, pelas conversas, pelo apoio e por ter permitido a utilização de seu laboratório. E não se esqueça: "A culpa também é sua".

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição e sugestões para melhorar este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de Apoio Técnico.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB-UnB pela oportunidade e condições oferecidas.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia IB-UnB, que sempre me trataram muito bem.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia pela amizade, colaboração e carinho.

Especialmente ao Marcelo e à Juliana "Julia" pelas madrugadas que passaram em claro ao meu lado, sempre dispostos a dar um pouquinho mais de seu carinho, amor, amizade e apoio na realização deste trabalho. Vocês são tudo de bom!

Ao Bruno Forillo e à Leonora. Bruno, obrigada pelas dicas e pela leitura do manuscrito. Leonora, obrigada pelo apoio, pelas conversas e por toda a ajuda, assim que cheguei ao Laboratório (lembra da 1^a prancha??? E dos cálculos das barras???? Pois é, jamais esquecerei tá?).

À Suzane Funk pela amizade, pelas palavras de conforto e por estar sempre disposta à ajudar. Suzi, obrigada pela ajuda com o MEV, sem vc, teria sido muito mais difícil.

Ao Públio e ao Victor Hugo. Públio, obrigada pela ajuda com o MEV e pela amizade. Victor, obrigada pela ajuda com o Confocal. Vocês foram muito prestativos para comigo.

Ao Prof. Dr. Alejandro Vexenat e ao Leandro Mencarinni. Alejandro, obrigada pela amizade e por ter cedido sua propriedade para algumas

coletas dos espécimes. Léo, sua ajuda na captura dos espécimes, e a troca de idéias foram muito importantes para mim.

À Thaís "Tátá", a quem devo muito pela amizade, pelo companheirismo e pelas palavras de incentivo (APA) nos momentos quase impossíveis.

À minha família, especialmente minha mãe "Nina" e meu querido filho "Gustavo", que apesar de não entenderem meu desespero, sempre respeitaram meu "stress". Vocês certamente são o "motivo" de todo esforço e da necessidade constante de me tornar alguém melhor.

Ao José Carlos, pelo "amor que remove montanhas" e pelo apoio que certamente não poderia faltar, "o financeiro". Serei-lhe sempre grata por sua bondade e generosidade! Deus abençoe sua existência!

Aos meus queridos e amados Calliphoridae que deram suas vidas para que eu pudesse estudá-los.

Enfim, a todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da Biologia dos Calliphoridae	1
1.2 Considerações sobre os espermatozoides e suas tendências evolutivas	5
1.3 Espermiogênese e ultra-estrutura dos espermatozoides em insetos	7
1.4 Aspectos morfológicos dos espermatozoides em Brachycera	9
2.OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção e criação dos espécimes.....	14
3.2. Microscopia Ótica	15
3.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	15
4. RESULTADOS	17
4.1 Organização testicular.....	17
4.2 Estrutura e ultra-estrutura da espermateca	20
4.3 Espermiogênese.....	23
4.3.1 Região da cabeça	23
Formação do acrossoma	23
Transformações nucleares	24
4.3.2 Região de transição núcleo-flagelo	25
Adjunto do centríolo	25
Zona de “overlap”	26
4.3.3 Região flagelar	26

Formação dos derivados mitocondriais	26
Formação do axonema	27
4.4 Análise citoquímica – Ácido Etanólico-Fosfotúngstico (E-PTA)	39
5. DISCUSSÃO	41
5.1 Organização testicular	41
5.2 Organização da espermateca	43
5.3 Espermiogênese.....	45
5.4 Análise citoquímica – Ácido Etanólico-Fosfotúngstico (E-PTA)	51
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografias dos Espécimes de <i>Chrysomya megacephala</i>	4
Figura 2: Micrografias do testículo em MO.....	18
Figura 3: Micrografias do testículo em MET.....	19
Figura 4: Micrografias da espermateca em MO e MET.	21
Figura 5: Micrografias da espermateca em MET.	22
Figura 6: Micrografias das espermátides - Região da cabeça em MET.....	29
Figura 7: Micrografias das espermátides - Região da cabeça em MET.....	30
Figura 8: Micrografias das espermátides - Região da cabeça em MET.....	31
Figura 9: Micrografias das espermátides - Região da cabeça em MET.....	32
Figura 10: Micrografias das espermátides – Região de transição núcleo-flagelo em MET	33
Figura 11: Micrografias das espermátides – Região de transição núcleo-flagelo em MET.....	34
Figura 12: Micrografias das espermátides – Região do Flagelo em MET	35
Figura 13: Micrografias das espermátides – Região do Flagelo em MET	36
Figura 14: Micrografias dos espermatozóides – Região do Flagelo em MET.....	37
Figura 15: Micrografias das espermátides e dos espermatozóides em MO.....	38
Figura 16: Micrografias do espermatozóide utilizando E-PTA em MET	40

Lista de Abreviaturas

DAPI = 4,6-diamino-2-phenylindole

E-PTA = Ácido etanólico-fosfotúngstico

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO = Microscopia Óptica

RESUMO

Os Diptera constituem uma das quatro maiores ordens de insetos. *Chrysomya megacephala* (Fabricius), a mosca-das-latrinas do Oriente, pertence à família Calliphoridae e encontra-se associada a questões médico-veterinárias, sanitárias e forenses. O objetivo desse trabalho foi caracterizar os aspectos ultra-estruturais da espermiogênese e do espermatozóide na referida espécie, incluindo a anatomia dos testículos e dos órgãos de armazenamento de espermatozóides nas fêmeas – as espermatecas. Estes dados são particularmente importantes em análises taxonômicas e filogenéticas, uma vez que tais células apresentam estruturas altamente conservadas. Nesta espécie, assim como na maioria dos insetos, a espermiogênese é caracterizada pelos seguintes eventos: formação do acrossoma, alongamento nuclear com condensação da cromatina, formação do flagelo e perda do excesso de citoplasma. No final do processo de espermiogênese, o espermatozóide em *C. megacephala* apresenta-se longo e delgado, medindo aproximadamente 590µm de comprimento. O espermatozóide é formado por acrossoma, núcleo com cromatina densamente compactada, centríolo, adjunto do centríolo, dois derivados mitocondriais preenchidos por material paracristalino e um axonema contendo: dois microtúbulos centrais, nove duplas periféricas e nove microtúbulos acessórios intercalados por fibras densas. O sistema reprodutor interno de machos e fêmeas possui modificações morfológicas que podem ser constantes em todos os ciclórrafos. O testículo de *C. megacephala* consiste de um único folículo e a parede do órgão é formada por uma camada de células pigmentadas e uma camada de tecido muscular. A espermateca consiste, externamente, de uma camada de células secretoras e internamente, de uma camada de cutícula que circunda a cavidade do órgão.

ABSTRACT

Diptera constitutes one of the four largest orders of insects. The Oriental latrine-fly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) belongs to the family Calliphoridae and is associated with medic, veterinary, sanitary and forensic issues. The aim of this research was to characterize the ultrastructural aspects of the spermiogenesis and spermatozoa of the *C. megacephala*, including the anatomy of testis and female sperm storage organs – the spermatheca. This data is particularly important in taxonomic and phylogenetic analysis, since in these cells their structure is highly conserved. In this species as with insects in general, the spermiogenesis is characterized by the following events: acrosome formation, nuclear elongation with chromatin condensation, flagellar formation and sheading of excess cytoplasm. At the end of spermiogenesis process, the spermatozoon in *C. megacephala* is a long and thin cell measuring 590 μm in length. The spermatozoon comprises acrosome, nucleus with compact dense chromatin, centriole, centriolar adjunct, two mitochondrial derivatives with paracrystalline material and axoneme with: two central microtubules, nine peripheral doublets, nine accessory microtubules and dense fibers. The internal reproductive system of the male and female has morphological modifications that may be constant in all Cyclorrhaphous. The testis of the *C. megacephala* consists of a unique follicle and the wall of the organ is formed by a layer of pigmented cells and a layer of muscular tissue. The spermatheca consists externally of a secretory cell layer, and internally of a cuticle layer witch surrounds the cavity of the organ.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da biologia dos Calliphoridae

De acordo com Borror & DeLong's (2005), os insetos têm vivido na Terra por aproximadamente 350 milhões de anos, fazem parte de um grupo dominante, ocorrem praticamente em todos os lugares e acredita-se que o número total de seus diferentes tipos aproxime-se de 30 milhões. Eles formam um grupo extremamente rico e abundante, representando cerca de 80% dos organismos já descritos no mundo, estimados em quase um milhão de espécies. Assumem um importante papel, pois são extremamente atuantes em processos indispensáveis para a manutenção da vida no planeta, por possuírem a maior biomassa, a maior variabilidade genética e o maior número de interações com outros seres.

A ordem Diptera, representada pelas moscas e mosquitos, conta com mais de 150.000 espécies catalogadas, sendo que para a região Neotropical, cerca de aproximadamente 24.000 espécies já foram descritas (Amorim *et al.*, 2002).

Os Calliphoridae constituem uma família de dípteros muscóides caliptrados, que fazem parte da Superfamília Oestroidea (infra-ordem Brachycera). Apresentam distribuição mundial, sendo considerada uma das mais importantes e freqüentes quando se trata de matéria orgânica animal em decomposição, pois concentram, em sua maioria, espécies saprofágicas e necrobiontófagas. São popularmente conhecidas como varejeiras e acredita-se que no Brasil, assim como em outras regiões tropicais, essa seja uma das famílias mais importantes na ciclagem de matéria orgânica na natureza – eliminando carcaças do ambiente, o que despertou o interesse da perícia criminal pelo seu potencial na estimativa do intervalo *post-mortem* (Catts & Goff, 1992; Mello, 2003). Alguns representantes desta família encontram-se envolvidos, ainda, na polinização de determinados tipos de plantas (Castañeda-Vildózola *et al.*, 1999).

Os califorídeos possuem importância médica, veterinária, sanitária e sócio-econômica. Do ponto de vista médico-veterinário, são considerados veiculadores de entomopatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (Furlaneto *et al.*, 1984). Algumas espécies são responsáveis pelo ataque ao tecido vivo de hospedeiros vertebrados de sangue quente, cujas larvas histiófagas produzem lesões denominadas miíases, conhecidas popularmente como “bicheiras”, podendo ocorrer ainda

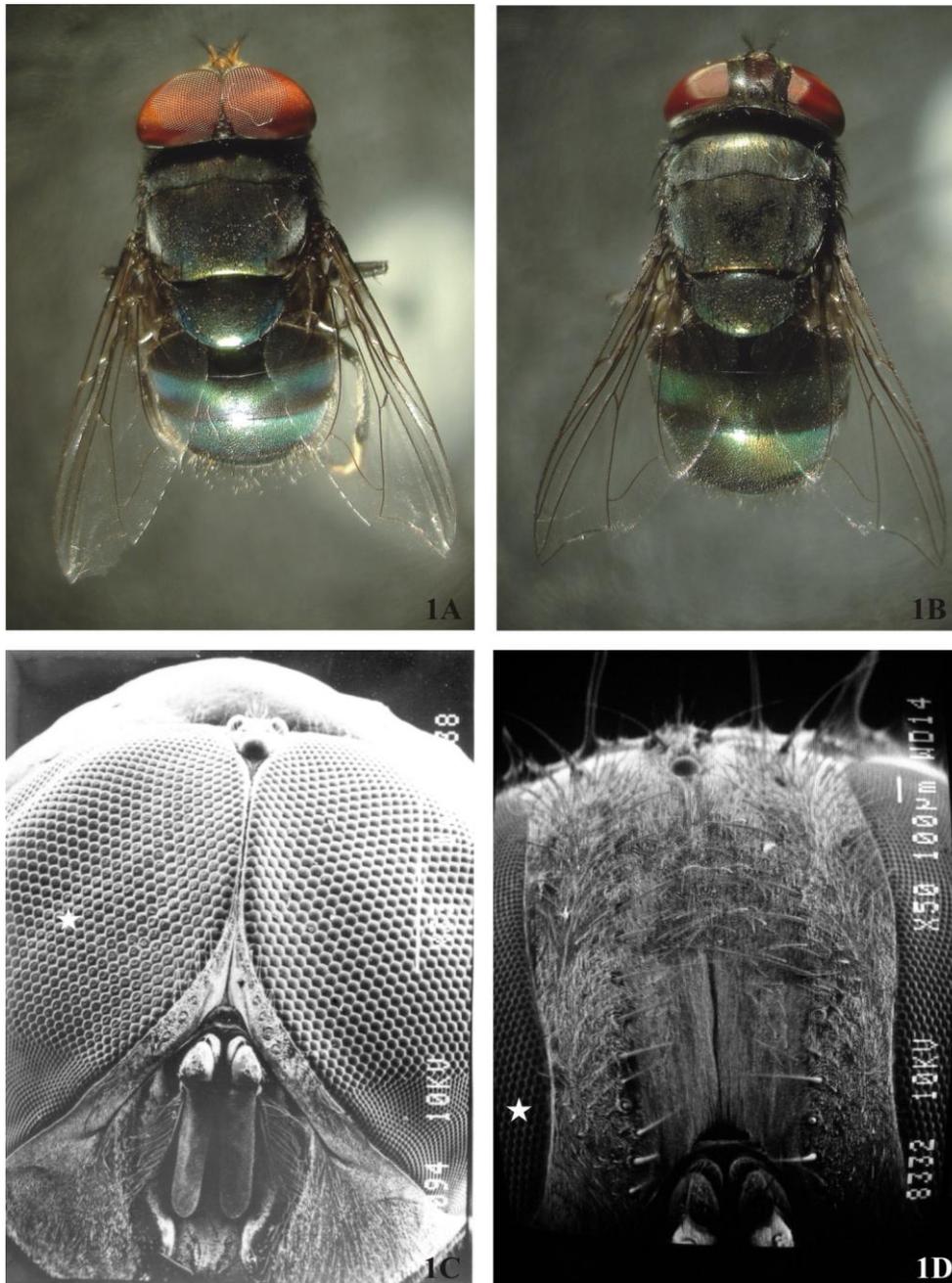
pseudomiíases, caracterizadas pelo ataque ao tecido vivo, com ou sem manifestações patológicas, que por sua vez afetam o homem e os animais (James, 1970; Guimarães & Papavero, 1999; Mello, 2003).

Algumas moscas dessa família são cosmopolitas, sendo conhecidas mais de 1.000 espécies em cerca de 150 gêneros organizados em cinco subfamílias – Mesembrinellinae, Calliphorinae, Chrysomyinae, Toxotarsinae e Rhiniinae –, sendo que a última não ocorre no Brasil (James, 1970; Carvalho & Ribeiro, 2000; Mello 2003). No catálogo de dípteros da América do Sul, James (1970) lista cerca de 100 espécies válidas de Calliphoridae para a região, sendo que 60 espécies foram listadas para o Brasil.

Os califorídeos de gênero *Chrysomya* não são naturais do continente americano, tendo sido introduzidos na América do Sul e Central, de onde se dispersaram rapidamente até o sul dos Estados Unidos (Guimarães *et al.*, 1978, 1979; Guimarães & Papavero, 1999). Acredita-se que a introdução tenha sido feita por meio de embarcações que traziam refugiados do continente africano e aportavam no litoral sul. O primeiro registro no Brasil ocorreu em 1975 no Paraná e, desde então, espalharam-se para os estados de Goiás e Minas Gerais, chegando a algumas cidades das regiões Norte e Nordeste (Guimarães *et al.*, 1978, 1979). Destacam-se por serem exóticas e invasoras causando impacto na comunidade de dípteros endêmicos (Wells & Greenberg, 1992).

Chrysomya megacephala (Fabricius), originária das regiões Oriental e Australiana, onde são popularmente conhecidas como mosca-das-latrinas, apresentam um alto grau de sinantropia e são atraídas pela presença de lixo e fezes. Como muitas outras espécies de moscas varejeiras, *C. megacephala* também utiliza substratos efêmeros, como por exemplo, carcaças em decomposição e fezes para sua alimentação e postura dos ovos, tornando-se desta forma vetores de agentes patogênicos (d'Almeida & Almeida, 1998). Esse se caracteriza por ser um inseto holometábolo, apresentando os seguintes estádios de desenvolvimento: ovo, larvas (primeiro (L1), segundo (L2) e terceiro (L3) instares), pupa e adulto (Shewell, 1987). Os adultos são de tamanho médio, coloração metálica azulada ou esverdeada (Fig. 1A-B) e possuem dimorfismo sexual que pode ser observado na região da cabeça (olhos holóptico no macho e dicóptico na fêmea) e nos omatídeos, que apresentam simetria nas fêmeas e são assimétricos nos machos (Fig. 1C-D).

Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese em *C. megacephala* foram descritos por Messias Jr. (1990), que destacou a relevância de tais informações no sentido de uma melhor compreensão a respeito da reprodução da espécie. Os dados obtidos, segundo o autor, poderiam contribuir tanto para a aplicação de técnicas de controle biológico, como permitir o estabelecimento de relações filogenéticas e/ou taxonômicas através de comparação com espécies relacionadas. Entretanto, a biologia da reprodução em *C. megacephala* ainda encontra-se pouco documentada e a literatura não dispõe de descrições detalhadas da ultra-estrutura dos espermatozoides.



Figuras 1A-D. Micrografias de espécimes de *Chrysomya megacephala*. **(A-B):** Adultos de *C. megacephala* em Microscópio Estereoscópico. **(A):** Macho (8 mm). **(B):** Fêmea (10 mm). **(C-D):** Detalhes da cabeça em Microscopia Eletrônica de Varredura. **(C):** Macho. **(D):** Fêmea. Região dos omatídeos (asterisco).

1.2 Considerações sobre os espermatozóides e suas tendências evolutivas

Os espermatozóides são geralmente células pequenas, compactadas e altamente especializadas para a fertilização do óvulo. São otimizados para transferir o material genético paterno para o óvulo, processo essencial na transmissão da hereditariedade e posterior desenvolvimento do organismo. Caracterizam-se por serem células dotadas de um flagelo, cujo papel principal é impulsioná-las através de meio aquoso. Esse modelo celular apresenta-se destituído de muitas organelas citoplasmáticas relacionadas com o metabolismo celular, uma vez que elas são desnecessárias para a tarefa de transferir seu DNA ao óvulo. Apresenta-se livre, móvel e direcionado a proporcionar rapidez e eficiência no processo de fertilização. Tal definição aplica-se apenas aos espermatozóides de animais e de plantas mais primitivas, uma vez que, em plantas superiores, as células germinativas masculinas – os microgametas, não apresentam-se livres, sendo reduzidos a pequenas células dentro do gametófito no grão de pólen. O espermatozóide é uma célula altamente complexa e tem passado por diversas modificações morfológicas ao longo dos processos evolutivos, diferentemente do que é observado em outros tipos celulares (Baccetti & Afzelius, 1976).

A extensa diversidade morfológica observada entre os organismos é o resultado de milhões de anos de evolução, incluindo os processos de adaptação aos diversos habitats e nichos ecológicos. A sobrevivência, bem como a propagação das espécies depende essencialmente de adaptações reprodutivas que permitam a transferência do material genético e a fertilização (Anderson & Personne, 1973).

O espermatozóide é um modelo de diferenciação celular extrema, com variações fenotípicas e genéticas marcantes. A diversidade de estruturas encontradas nesse modelo celular está relacionada às demandas fisiológicas do ambiente em que ocorre a fertilização. Os espermatozóides de invertebrados e de vertebrados são adaptados para exercer funções como: sobreviver em órgãos de estoque com pouca capacidade de oxigenação; alcançar e selecionar o gameta feminino; perfurar as barreiras encontradas no óvulo depositando seu material genético dentro desta célula; e, por fim, ativar o desenvolvimento do zigoto (Anderson & Personne, 1973).

Segundo Baccetti & Afzelius (1976), a colonização do ambiente terrestre pode ser vista como um passo muito importante na evolução de animais e plantas, o que não seria possível, sem a evolução das estratégias reprodutivas. Várias características

na morfologia do espermatozóide podem ser traçadas de acordo com as mudanças no modo de fertilização, o que torna o espermatozóide um importante indicador da biologia reprodutiva.

A diversidade morfológica encontrada em animais e plantas terrestres é, de forma geral, bem maior do que a encontrada entre os organismos aquáticos, uma vez que o ambiente aquático apresenta uma maior uniformidade. Desta forma, a diversidade estrutural do espermatozóide é bem maior em animais com fertilização interna do que em animais que se reproduzem através de fertilização externa, em ambientes aquáticos (Franzén, 1970).

Na fertilização interna o espermatozóide tem que nadar ou ser transportado para conseguir alcançar o gameta feminino. Modelos mais complexos com estruturas específicas e características fisiológicas se desenvolveram para conseguir superar os riscos deste tipo de fertilização. A adição de fibras locomotoras mais eficientes e mudanças no metabolismo celular proporcionaram ao espermatozóide uma maior capacidade de sobreviver e superar o aumento da viscosidade do meio. Esse espermatozóide conhecido como “modificado”, difere do tipo “primitivo” por possuir modificações em certas regiões de sua estrutura, como na cabeça e na peça intermediária, com um evidente alongamento destas estruturas. Na peça intermediária pode-se observar a fusão das mitocôndrias e na região flagelar, observa-se com frequência, um grupo extra de 9 microtúbulos e fibras densas acessórias, externamente ao complexo axial 9+2 (Franzén, 1970; Baccetti, 1970).

Observações a cerca dos aspectos evolutivos do espermatozóide e sua especificidade – uma vez que constituem um caráter único de identidade para a espécie que o produz –, têm feito com que a utilização de sua ultra-estrutura seja amplamente aceita em estudos de filogenia e taxonomia, por demonstrar eficiência na resolução de arranjos taxonômicos (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Quando dados referentes aos caracteres morfológicos destas células são usados em associação com outras informações como, por exemplo, dados moleculares e da morfologia externa, o conjunto de dados obtidos torna-se mais consistente e confiável para a compreensão de suas relações filogenéticas. A especificidade da ultra-estrutura dos espermatozóides foi inicialmente observada em mamíferos e subsequentemente confirmada para vários grupos de animais, inclusive, dos insetos, justificando, assim, o uso destas células em estudos taxonômicos e filogenéticos (Dallai *et al.*, 1993a; Curcupino *et al.*, 1995; Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

1.3 Espermio gênese e ultra-estrutura dos espermatozoides em insetos

Durante a gametogênese masculina, cada espermatogônia pré-definitiva se associa às células somáticas dando origem a um espermatocisto. A espermatogônia, agora no interior de um cisto, passará por divisões sincrônicas (divisões mitóticas goniais), das quais resultarão os espermatócitos primários. Estes, por sua vez, passarão por duas divisões meióticas sucessivas e darão origem a um feixe de espermátides. Durante a espermio gênese, as espermátides sofrerão profundas transformações morfofuncionais, que as tornarão estrutural e funcionalmente espermatozoides aptos para fecundar o ovócito.

Nos invertebrados, e em alguns vertebrados inferiores, as espermátides se desenvolvem no interior de cistos. O cisto é essencialmente um conjunto de células germinativas circundado por uma célula somática de natureza epitelial e o número de espermatozoides encontrados em seu interior é quase sempre constante e específico para cada espécie, sendo representados por uma função de 2^n – onde “n” corresponde ao número total de divisões mitóticas goniais, contemplando, ainda, o processo meiótico que ocorre nos espermatócitos primários. Os folículos contêm vários cistos e cada um deles abriga um conjunto de espermátides interconectadas que se diferenciam sincronicamente (Virkki, 1969; Phillips, 1970; Baccetti, 1972; Dumser, 1980; Quagio-Grassiotto & Lello, 1996).

O número de células espermáticas por cisto é considerado um indicador da posição filogenética ocupada pela espécie dentro do grupo ao qual pertence. Os insetos das ordens mais basais possuem um número maior de células espermáticas por cisto do que àqueles das ordens mais derivadas. Portanto, no interior de categorias sistemáticas, grupos e espécies mais recentes tendem a possuir menos espermatozoides por cisto. O decréscimo do número de espermatozoides por cisto reflete uma redução geral na produção de espermatozoides, o que parece representar um valor adaptativo para as populações especializadas, as quais provavelmente apresentam uma redução de variabilidade genética (Virkki, 1969; Báó, 1992).

Os primeiros eventos da espermio gênese estão relacionados à formação do acrossoma e do complexo mitocondrial. O acrossoma origina-se a partir do complexo de Golgi (Yasuzumi, 1974; Báó *et al.*, 1989), determinando o pólo anterior da célula. O complexo mitocondrial, que é freqüentemente denominado “Nebenkern” – especialmente em trabalhos mais antigos onde esta estrutura foi descrita – (Pratt,

1970), resulta da fusão das mitocôndrias no pólo posterior da célula. Posteriormente observa-se a divisão do complexo mitocondrial em dois derivados mitocondriais, os quais posicionam-se lateralmente ao axonema (Tokuyasu, 1974). Os derivados mitocondriais são, geralmente, preenchidos, ao longo de sua extensão, por uma estrutura de natureza protéica, organizada num padrão paracristalino (Rosati *et al.*, 1976). O cristalóide, como também é denominado, é formado por uma proteína denominada “cristalomitina” (Baccetti *et al.*, 1977).

Embora no início da espermiogênese as espermátides sejam ovóides, com núcleo de mesmo formato, com o prosseguimento da mesma, nota-se o alongamento do núcleo e o aumento gradual na condensação da cromatina (Schrankel & Schwalm, 1974). O que acontece, no entanto, é um alongamento gradual de toda a célula, sendo a presença de microtúbulos fundamental para a aquisição da forma celular definitiva (Dustin, 1978).

Simultaneamente a todos os fenômenos descritos anteriormente, tem-se a formação da estrutura flagelar, com a organização de um axonema típico, a partir do centríolo, que é apenas um nas espermátides de insetos. O axonema em insetos segue, geralmente, o padrão 9+9+2 de microtúbulos, embora existam exceções. Em alguns representantes da subordem Nematocera é comum encontrar o arranjo 9+9+1, enquanto em efemérides predomina o arranjo 9+9+0 (Phillips, 1970). Podem ser encontrados ainda, arranjos considerados aberrantes, como a organização 13+0, descrita em dípteros cecidomídeos e sciarídeos (Dallai *et al.*, 1993b) e em proturos (Yin *et al.*, 1985).

O axonema dos insetos encontra-se, geralmente, ancorado no envelope nuclear por uma estrutura de natureza ribonucleoprotéica, conhecida como adjunto do centríolo (Cantacuzéne, 1970).

Ao final da espermiogênese a célula espermática apresenta-se altamente diferenciada e o grau de diferenciação pode ser inferido, inclusive por alterações que ocorrem na membrana plasmática. Entretanto, poucos estudos analisem as alterações sofridas pela membrana plasmática durante o processo de diferenciação das espermátides em invertebrados (Baccetti *et al.*, 1971; Dallai & Afzelius, 1982), domínios específicos foram encontrados na membrana plasmática de alguns insetos e acredita-se que o estabelecimento destes domínios possa relacionar-se às mudanças na distribuição das moléculas de fosfolipídeos e esteróis, que por sua vez, possuem um importante papel na regulação da permeabilidade da membrana, nas atividades de

fluidez, nas atividades enzimáticas e, ainda, no reconhecimento e fusão do espermatozóide com o ovócito (Lopez & De Souza, 1991; Bão & De Souza, 1992).

1.4 Aspectos morfológicos dos espermatozóides em Brachycera

Ainda são insuficientes os estudos morfológicos envolvendo a ultra-estrutura de espermatozóides na infra-ordem Brachycera. Segundo Jamieson *et al.* (1999), existem poucos trabalhos envolvendo estudos estruturais ou ultra-estruturais de espermatozóides das espécies que fazem parte da divisão Orthorrhapha, e não são conhecidas informações envolvendo tais estudos para Cyclorrhapha, envolvendo as superfamílias Conopoidea, Micropiezoidea, Tanypezoidea, Opomyzoidea e Asteioidea.

As informações disponíveis na literatura envolvendo ultra-estrutura de espermatozóides para a divisão Cyclorrhapha, restringem-se a 11 famílias – Tephritidae, Sepsidae, Sarcophagidae, Muscidae, Coelopide, Drosophilidae, Phoridae, Scatophagidae, Calliphoridae, Gasterophilidae e Cuterebridae; e para a divisão Orthorrhapha, apenas 2 famílias - Empididae e Bombyliidae. À exceção de Tephritidae e Drosophilidae, todas as outras famílias possuem apenas uma espécie ou gênero relatado e nem sempre toda a ultra-estrutura do espermatozóide encontra-se descrita – em alguns casos, apenas regiões celulares tiveram suas estruturas analisadas.

Na família Tephritidae, três espécies possuem a ultra-estrutura do espermatozóide estudada até o momento. Em *Dacus dorsalis* foi descrita a formação do acrossoma e, ainda, alguns caracteres do espermatozóide (Lee *et al.* 1975). Em *Dacus oleae* o espermatozóide apresenta as seguintes estruturas: acrossoma, núcleo, adjunto do centríolo, centríolo e dois derivados mitocondriais simétricos (Baccetti & Bairati, 1964; Dallai & Afzelius, 1991). *Ceratitis capitata* apresenta a região do acrossoma bem definida – sendo este formado a partir do complexo de Golgi e localizado lateralmente em relação ao núcleo. Foi observada uma membrana intersticial em uma interface entre o núcleo e o acrossoma, presente durante a espermiogênese e permanecendo no espermatozóide. Na região flagelar, encontra-se descrita a organização dos derivados mitocondriais (Baccetti, 1972; Bão & Dolder 1990; 1991a; 1991b).

A família Sepsidae teve somente a ultra-estrutura da região flagelar do espermatozóide do gênero *Sepsis* descrito por Phillips (1966), até o momento.

Na Família Sarcophagidae, o espermatozóide de *Sarcophaga bulatta* possui o acrossoma formado por filamentos estriados e circundado por uma série de elementos lamelares concêntricos. Na região flagelar o adjunto do centríolo está presente apenas nas espermátides (Warner, 1970; 1971).

Na família Muscidae encontram-se descritos, o processo de espermiogênese e a formação do adjunto do centríolo em *Musca domestica*. O acrossoma nessa espécie é curto - em forma de haste e lateralmente localizado em relação ao núcleo. Foi observado na região flagelar a presença do adjunto do centríolo bastante longo – 105 µm, e de dois derivados mitocondriais com comprimentos muito diferentes – 76 µm e 226 µm, preenchidos com material paracristalino em toda sua extensão (Gasner, 1970; Gasner *et al.* 1972).

Na família Coelopidae, *Coelopa frigida* foi descrita por Schrankel & Schwalm (1974; 1975). Na região nuclear foram observadas as membranas adjacentes, descritas como camadas acessórias do envelope nuclear de espermátides jovens. O adjunto do centríolo, na região posterior do núcleo está em contato direto com a cromatina nuclear durante sua condensação e, segundo os autores, uma abertura na membrana nuclear parece facilitar a passagem de material entre essas duas estruturas.

A família Drosophilidae é, atualmente, a mais estudada e também a que possui um maior número de espécies descritas. Nessa família, o comprimento do espermatozóide varia de 0,3 mm em *D. pseudoobscura* a 58 mm em *D. bifurca* (Jamieson *et al.*, 1999). Em *Drosophila* existe até três tamanhos de espermatozóides em cada macho, sendo esse número espécie-específico. O modelo clássico do espermatozóide em *Drosophila* é: acrossoma localizado lateralmente ao núcleo, a cromatina nuclear bastante compactada, centríolo, dois derivados mitocondriais de tamanhos diferentes e, ainda, a presença de fibras densas no axonema.

Na família Phoridae, a ultra-estrutura do espermatozóide de *Megaselia scalaris* Loew foi descrita por Curtis *et al.* (1989). A proporção observada entre a região da cabeça e do flagelo no espermatozóide desta espécie sugere uma vigorosa capacidade de movimento, uma vez que a região do flagelo é sete vezes maior em relação à região da cabeça. Nessa espécie é encontrada a zona de “overlap” - espaço compreendido pela região total de sobreposição entre núcleo e axonema, e ainda, pela região denominada “peg” – uma pequena indentação nuclear onde ocorre a inserção

do flagelo. Uma parte do flagelo, próxima à região posterior do núcleo é reforçada por um corpo acessório. Na região flagelar, os derivados mitocondriais são proeminentes e se estendem completamente por quase toda sua extensão.

Nas famílias Scatophagidae e Empididae, Dallai & Afzelius (1990) descreveram a ultra-estrutura do flagelo dos espermatozoides de *Scatophaga* sp. e *Ramphomyia* sp. Os derivados mitocondriais de *Scatophaga* sp. apresentam-se simétricos, enquanto em *Ramphomyia* sp. possuem tamanhos diferentes. Ambos apresentam 13 protofilamentos nos microtúbulos acessórios. No material intertubular de *Scatophaga* sp. são observados uma fileira reta de quatro pontos elétron-lúcidos, ao invés de três observados para *Ramphomyia* sp.

Nas famílias Calliphoridae e Gasterophilidae, Dallai *et al.* (1993a) descreveram a ultra-estrutura dos espermatozoides de *Calliphora vomitoria* e *Gasterophilus intestinalis*, que apresentam na região flagelar, dois derivados mitocondriais de igual tamanho e separados por material elétron-denso, apresentam 13 protofilamentos nos microtúbulos acessórios e material intertubular margeado por uma fileira reta de quatro pontos elétron-lúcidos.

Na família Bombyliidae, *Bombylius* sp. foi descrito por Dallai *et al.* (1993a). Em *Bombylius* sp. os derivados mitocondriais apresentam simetria, 13 protofilamentos foram observados nos microtúbulos acessórios e material intertubular margeado por uma fileira reta de três pontos elétron-lúcidos.

A família Cuterebridae teve os aspectos ultra-estruturais da espermatogênese de *Dermatobia hominis* descrita por Quagio-Grassiotto (1993). Os espermatozoides dessa espécie apresentam o formato alongado; o acrossoma encontra-se posicionado lateralmente ao núcleo e possui formato de ampola - com conteúdo heterogêneo; possui dois derivados mitocondriais simétricos e praticamente preenchidos por material elétron-denso em arranjo paracristalino; e o axonema possui fibras densas e material denso de conexão.

O padrão de compactação da cromatina, bem como as demais transformações que ocorrem no núcleo da espermátide durante o processo de espermiogênese, culminando com a cromatina completamente compactada e o formato alongado do núcleo no espermatozoide, foi descrito em praticamente todos os Brachycera estudados até o momento.

Os microtúbulos observados no axonema de todas as famílias descritas são típicos da infra-ordem Brachycera, possuindo a organização “9+9+2”, com dois

microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (Dallai *et al.* 1993a), padrão este também observado para a maioria dos insetos.

2. OBJETIVOS

Na tentativa de possibilitar uma melhor compreensão das relações filogenéticas, esse trabalho teve como objetivo ampliar as informações que possam contribuir para um melhor conhecimento da biologia e taxonomia dentro da família Calliphoridae.

2.1 Objetivos específicos

- Descrever a morfologia das espermatídes (espermiogênese) e dos espermatozóides;
- Descrever a morfologia da espermateca e dos espermatozóides nela armazenados;
- Comparar a estrutura do espermatozóide em ambos os tratos reprodutores;
- Destacar os caracteres morfológicos relevantes para estudos taxonômicos e filogenéticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e criação dos espécimes

Os espécimes adultos de *Chrysomya megacephala* foram coletados no Campus da Universidade de Brasília – Brasília (DF) e no município de Valparaíso (GO), nos períodos de setembro a novembro/06 e fevereiro a abril/07. As coletas foram feitas com o auxílio de redes entomológicas, utilizando como isca matéria orgânica de origem animal em decomposição (carne bovina moída e sardinha).

Casais foram colocados em gaiola de criação e mantidos no Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense do Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. A dieta alimentar oferecida foi uma solução de mel e água (50%), e água pura. Para obtenção de gerações seguintes, foi oferecida uma dieta rica em proteínas (carne moída e fígado bovino macerado), como forma de estimular a oviposição.

As massas de ovos, coletadas após um intervalo de 12 – 18 horas da oferta da dieta de postura, foram divididas em potes contendo 50 g de dieta composta de carne moída putrefata, trocada diariamente durante o desenvolvimento das larvas. A partir dessa etapa, foram mantidas em estufa tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand) (Marconi LTDA) à 25°C e 70 a 80% de umidade relativa, durante todo o período de desenvolvimento larval, pupação e emergência do adulto, período que variou entre 10 e 15 dias. A metodologia de criação foi modificada de Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991).

Para dissecação, os espécimes foram submetidos à letargia por frio (em geladeira) e em seguida, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, os testículos, as espermatecas e demais estruturas foram removidas. Tais estruturas, tanto nos machos quanto nas fêmeas localizam-se na região posterior do abdômen. Após separar a região torácica da região abdominal, o abdômen foi cortado longitudinalmente e as estruturas retiradas. Os testículos possuem formato piriforme e sua coloração pode variar de amarelo-pálido a vermelho brilhante. As espermatecas possuem formato circular e parede quitinizada, cuja coloração varia de marrom a preta.

3.2 Microscopia Óptica (MO)

Testículos e espermatecas processados para microscopia eletrônica de transmissão foram seccionados em cortes semi-finos (3 μm), e corados com azul de toluidina-borato de sódio, com o objetivo de observar, tanto a organização em cistos dos espermatozoides presentes no testículo, quanto à presença de espermatozoides no interior das espermatecas.

Espermatozoides extraídos dos testículos e das espermatecas (através do rompimento de tais estruturas) foram espalhados em lâminas histológicas, fixados em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, 5 mM CaCl_2 e sacarose 3% a 4°C, por aproximadamente 12 horas e posteriormente corados com Giemsa, com o objetivo de observar a forma e comprimento do espermatozoide.

Para medir o núcleo, algumas das lâminas contendo espermatozoides foram fixadas com paraformaldeído e lavadas em água corrente. Após secas à temperatura ambiente, foram coradas por 15 minutos com DAPI (4,6-diamino-2-phenyndole), lavadas e montadas com Mowiol. Todas as preparações foram fotografadas utilizando o Microscópio Axiophot Zeiss®, equipado com contraste interferencial e fluorescência - filtro de excitação BP 360-370 nm e Microscópio Confocal Leica SP5 - utilizando o filtro de 405 nm.

Espécimes adultos – machos e fêmeas, após mortos por letargia ao frio foram montados com auxílio de alfinetes entomológicos e fotografados em microscópio estereoscópico Tecnival binocular equipado com câmera fotográfica Sony W5 (Laboratório de Dipterologia – Departamento de Zoologia)

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão, testículos e espermatecas foram fixados em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, 5 mM CaCl_2 e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, a 4°C por aproximadamente 24 horas. Após-fixação durante 1h foi em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, seguida de contrastação “*in bloc*” em solução de acetato de uranila 0,5% “overnight”. O material foi desidratado em séries crescentes de acetona (30-100%) e embebido em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de

chumbo, examinados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

Para análise da estrutura dos microtúbulos o material foi fixado, por 24h em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% e ácido tânico 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 seguido de contrastação “*in bloc*” em solução de acetato de uranila 1% em água destilada “overnight” (Dallai & Afzelius, 1990). A desidratação, inclusão e observação do material transcorreram de acordo com o protocolo de rotina descrito anteriormente.

Para a detecção de proteínas básicas, foi empregado o método do ácido etanólico fosfotúngstico. Testículos e espermatecas foram fixados apenas em uma solução tamponada de glutaraldeído por 24 h a 4°C. Após lavagem em tampão cacodilato e desidratado em álcool, o material foi tratado “*in bloc*” com uma solução de PTA 2% em etanol absoluto durante 2 h, à temperatura ambiente e embebida em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram observados sem contrastação e parte foi contrastada com acetato de uranila.

4. RESULTADOS

4.1 Organização testicular

Em *Chrysomya megacephala* os machos possuem um par de testículos, alojados na porção final do abdômen. Os testículos são piriformes e possuem pigmentação que varia de amarelo-pálido em indivíduos recém emergidos, a vermelho brilhante naqueles com mais de uma semana de vida. Em secções semi-finas (3 µm) do testículo é possível observar duas camadas distintas de tecidos que o recobre: uma camada mais externa, composta pelas células pigmentadas, e uma camada interna de tecido muscular (Figs. 2A-B). No que diz respeito à anatomia interna do órgão, apresenta apenas um único folículo, cujo interior encontra-se preenchido por uma grande quantidade de cistos em diferentes estágios de diferenciação (Figs. 2A, C).

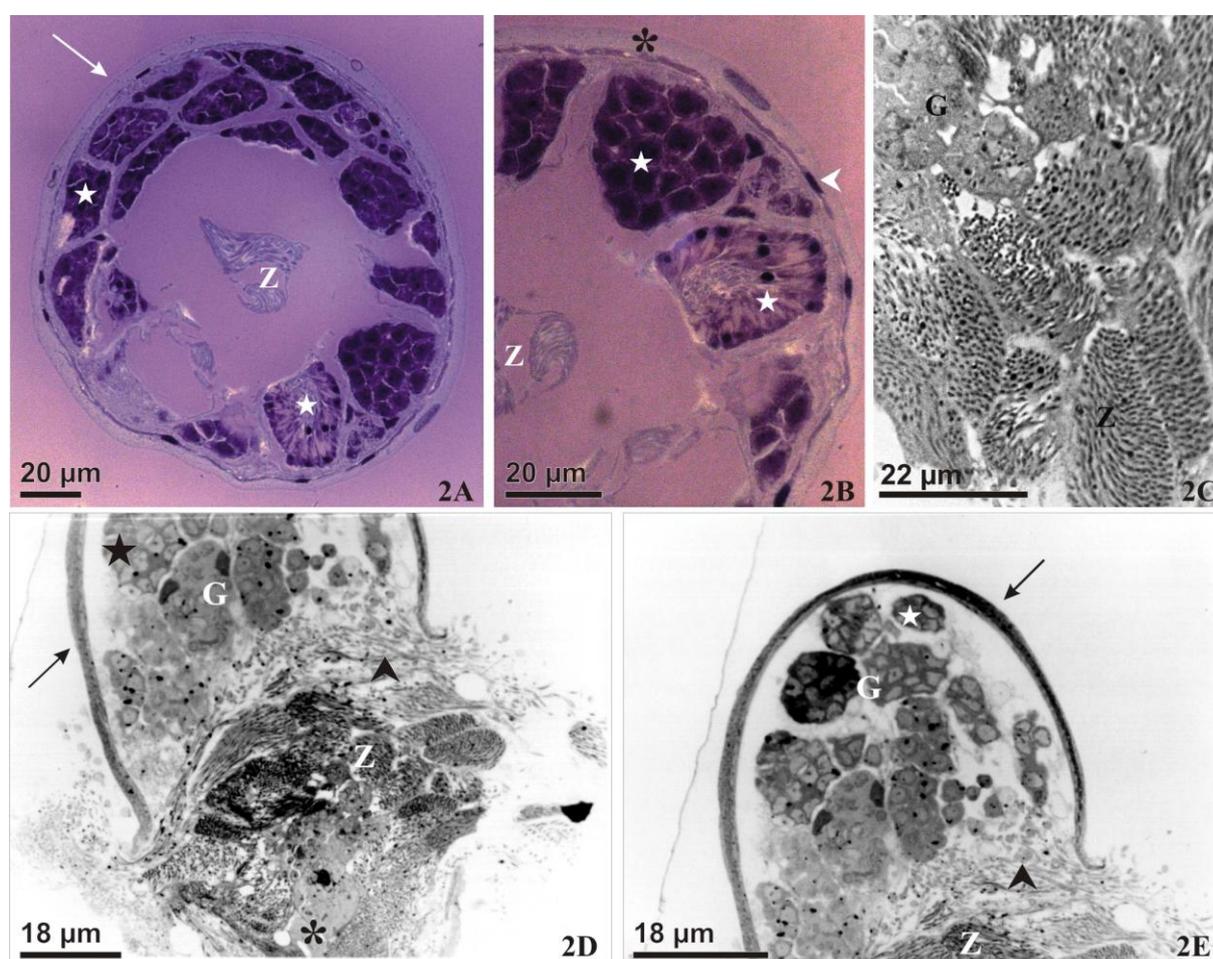
Tomando-se a gônada em seu eixo longitudinal, três regiões podem ser distinguidas – o terço proximal, o terço médio e o terço distal – em relação ao ducto deferente. No terço proximal e médio os cistos encontram-se em estádios de maturação mais avançados, enquanto que, no terço distal um grande número de espermatogônias são encontradas (Figs. 2D-E). Entretanto, é no terço proximal onde a maior quantidade de espermatozóides é encontrada.

Na microscopia eletrônica de transmissão, a camada superficial da gônada é composta por células achatadas, que contém os pigmentos responsáveis por sua coloração (Figs. 3A-B). Os pigmentos parecem estar contidos em grânulos elétrondensos – esféricos e delimitados por membrana, que têm sua elétrondensidade e quantidade aumentadas, de acordo com a idade dos indivíduos. Uma lâmina basal ocorre logo abaixo desta camada, algumas vezes bastante espessa, separando-a das células musculares. Abaixo das células musculares pode ser observada outra lâmina basal, separando as células musculares dos cistos no interior da gônada (Figs. 3A-B).

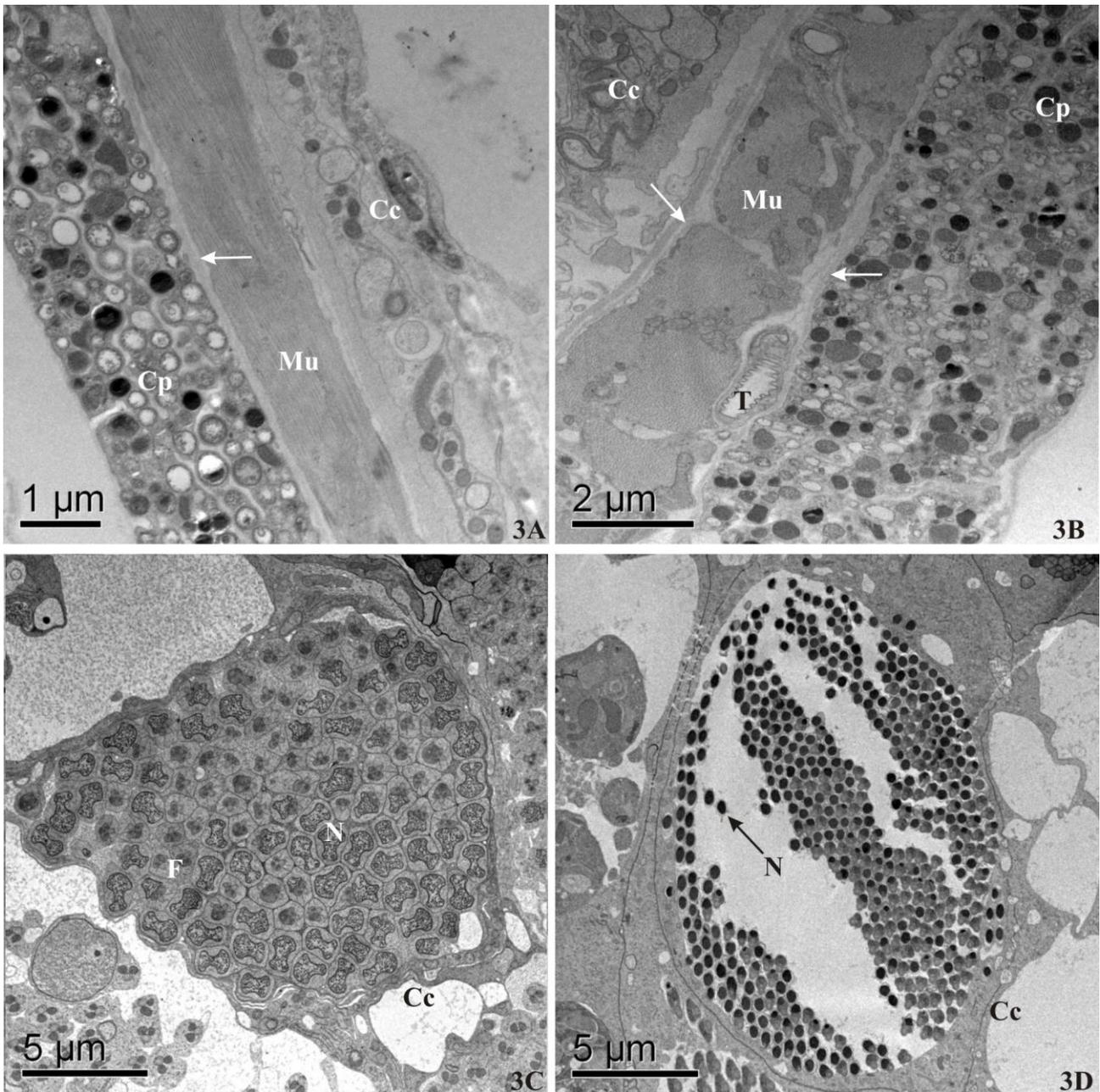
Em *C. megacephala* a diferenciação das espermátides em espermatozóides completa-se no interior de cistos. O folículo é preenchido por cistos e cada um deles abriga um conjunto de espermátides interconectadas que se diferenciam sincronicamente. Na espécie em estudo, o número de células germinativas encontradas com frequência em cada cisto é de aproximadamente 2^7 (representando

128 células), embora cistos com número de células superior a este tenham sido também encontrados (Figs. 3C-D).

Os cistos podem assumir diferentes formatos, variando de esféricos a alongados, de acordo com as alterações morfológicas das células germinativas que se encontram em seu interior durante o processo de diferenciação. Essa alteração de formato acontece em decorrência, principalmente do alongamento sofrido pelas espermatídes. Ao final do processo, a parede dos cistos se rompe e os espermatozóides são liberados no lúmen do testículo (Figs. 2A-B).



Figuras 2A-E. Micrografias de testículo em MO. (A-B): O órgão é envolvido por uma delgada parede (seta) formada por células pigmentadas (asterisco) e tecido muscular (cabeça de seta). Espermatozóides (Z), cistos de espermatídes (estrela), são observados no interior do folículo. (C): Cistos em diferentes estádios de maturação. Espermatozóides (Z); espermatogônias (G). (D-E): Região do terço proximal (asterisco), terço médio (cabeça de seta), terço distal (estrela).



Figuras 3A-D. Micrografias de testículo em MET. **(A-B):** Na parede do testículo são observadas células pigmentadas (Cp) com numerosos grânulos elétron-densos e células musculares (Mu). Traquéia (T); lâmina basal (setas). **(C-D):** Células císticas (Cc) circundam cisto de espermatídes e de espermatozóides. Flagelo (F); núcleo (N).

4.2 Estrutura e Ultra-estrutura da Espermateca

O aparelho reprodutor da fêmea de *Chrysomya megacephala*, observado em microscópio estereoscópico, segue o padrão já observado em outros *Chrysomya*, possuindo dois ovários, três espermatecas, duas glândulas acessórias, dois ovidutos laterais, um oviduto comum e um canal vaginal (vagina). As três espermatecas são observadas, em vista frontal, um pouco abaixo dos ovários, ligadas na base do oviduto através dos ductos espermáticos; em relação à disposição, uma delas é parcialmente deslocada para o lado direito e as outras duas, um pouco mais para a esquerda. Encontram-se lateralmente posicionadas em relação às glândulas acessórias e superiormente ao canal vaginal.

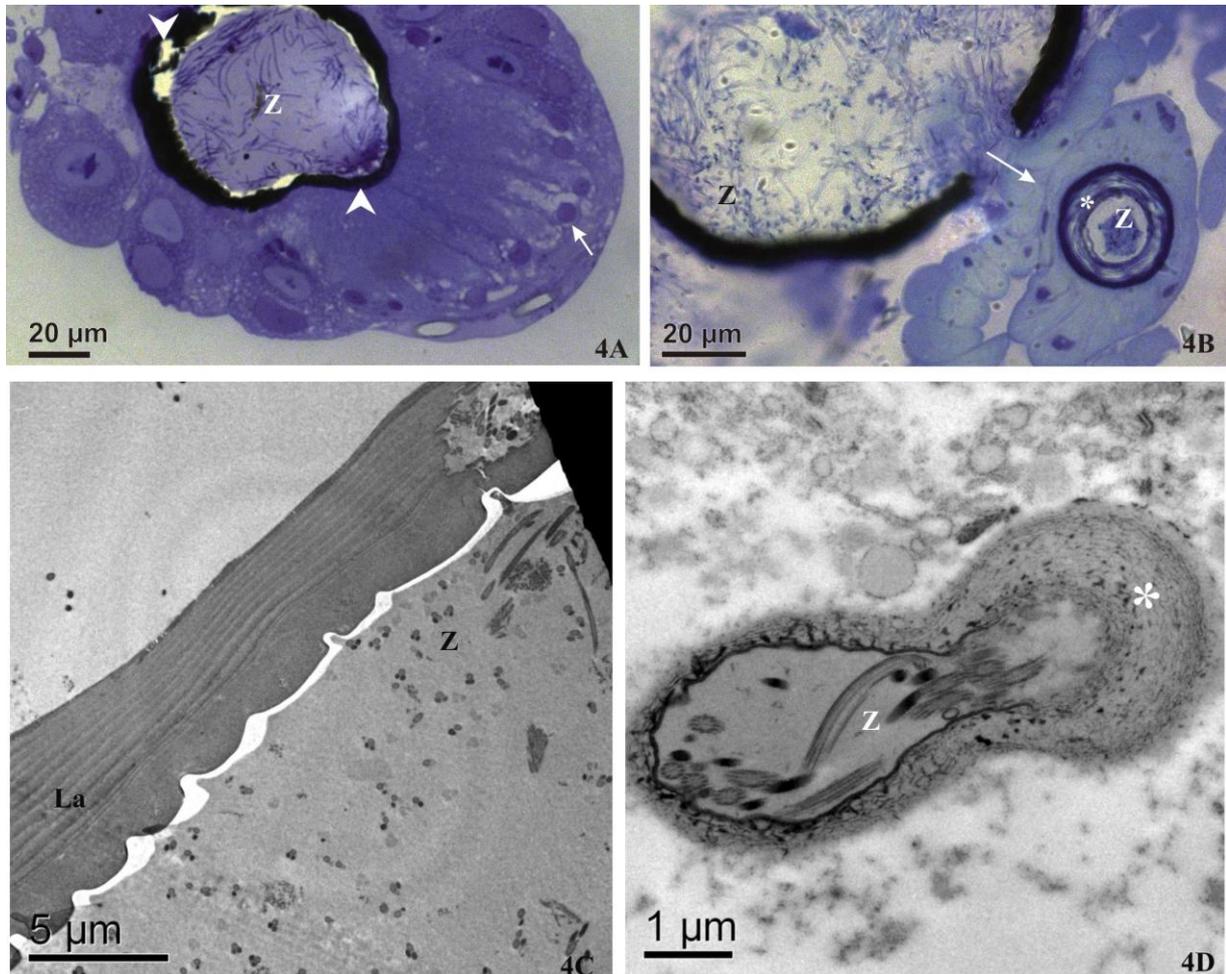
A espermateca é constituída por uma camada externa de células epiteliais secretoras e uma cápsula quitinizada, cuja coloração varia de marrom-escura a preta. A referida cápsula circunda todo o lúmen do órgão, apresentando um alto grau de rigidez, o que lhe confere uma capacidade fixa de armazenamento (Figs. 4A-C). Na camada de células epiteliais secretoras que circundam a cápsula quitinizada, células com formato colunar podem ser observadas (Fig. 4A). É no interior da espermateca que os espermatozóides transferidos no momento da cópula são armazenados (Figs. 4A-B) e permanecerão por tempo indeterminado.

Próximo a uma região descontínua da parede da espermateca foi observado um ducto espermático cujo lúmen, circundado por tecido muscular, encontra-se preenchido por espermatozóides (Fig. 4B-D).

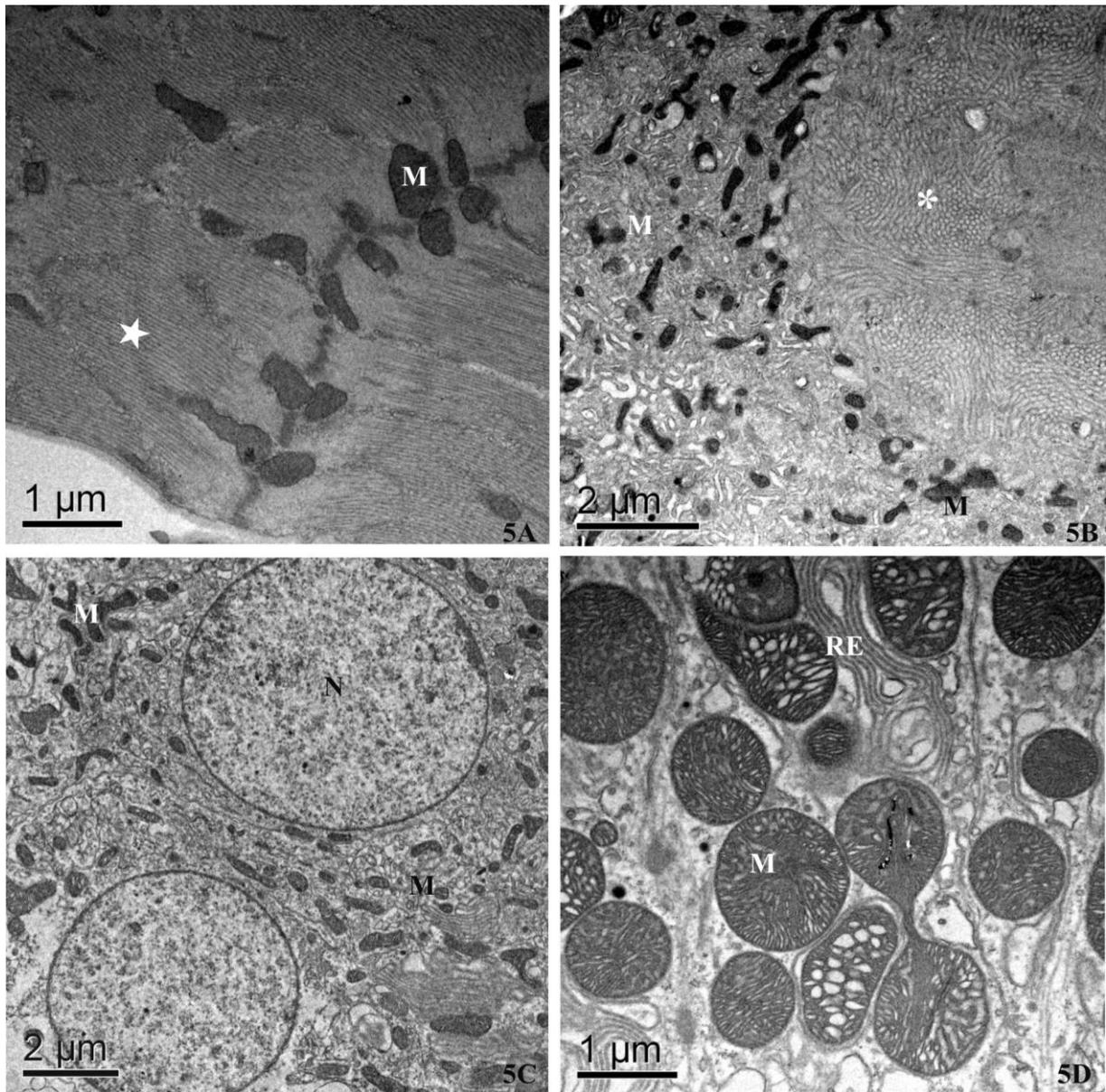
Em microscopia eletrônica de transmissão, a parede quitinizada presente na espermateca possui aproximadamente 3 μm de espessura e em secção transversal exibe uma organização lamelar com aproximadamente dez camadas elétron-densas alternadas com um número similar de camadas elétron-transparentes (Fig. 4C). O ducto espermático, estrutura que liga a espermateca à vagina, teve sua ultra-estrutura observada em secção longitudinal, e uma espessa parede muscular pôde ser observada (Figs. 4D-5A).

A análise ultra-estrutural das células epiteliais secretoras que circundam a espermateca demonstrou a presença de organelas citoplasmáticas tipicamente envolvidas em atividade de síntese e secreção. O núcleo dessas células possui formato esférico e a cromatina parcialmente condensada – com aspecto de grumos, encontra-se dispersa. O citoplasma é rico em ribossomos livres, cisternas de retículo

endoplasmático, complexos de Golgi, e ainda, numerosas mitocôndrias e vesículas (Figs. 5B-D). As células secretoras possuem ainda, uma região de microvilosidades bastante desenvolvida, próximo da qual um grande número de mitocôndrias de diferentes tamanhos e formatos podem ser observadas (Figs. 5B).



Figuras 4A-D. Micrografias de espermateca em MO (A, B) e MET (C, D). (A): Um revestimento quitinoso (cabeça de seta) pode ser observado circundando a luz do órgão contendo espermatozoides (Z). Células secretoras colunares circundam o órgão (seta). (B): Ducto espermático (seta). Parede muscular (asterisco). (C): Revestimento quitinoso interno da espermateca mostrando organização lamelar (La). (D): Secção longitudinal de ducto espermático.



Figuras 5A-D. Micrografias de espermateca em MET. Em (A) observa-se o tecido muscular que constitui a parede do ducto espermático (estrela). Em (B) é evidenciada a região de microvilosidades das células secretoras que circundam a espermateca (asterisco). (C-D): Detalhe das células secretoras. Núcleo (N); mitocôndrias (M); retículo endoplasmático (RE).

4.3 Espermiogênese

Como forma de facilitar a compreensão da espermiogênese em *Chrysomya megacephala*, este processo foi dividido em 10 estádios – classificados em iniciais, intermediários e finais, com base nas alterações estruturais que ocorrem nas regiões da cabeça e cauda. Trata-se de uma classificação sumária baseada em trabalhos anteriores desenvolvidos com insetos por Quagio-Grassiotto (1983; 1993), que trabalhou com *Ceratitis capitata* e *Dermatobia hominis* (Diptera: Tephritidae e Cuterebridae), respectivamente; Bão (1987), cujo trabalho foi desenvolvido com *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) – mutante do “olho-roseo” e linhagem selvagem; Messias JR. (1990), que trabalhou com *C. megacephala* (Diptera: Calliphoridae) e Lino-Neto (1993), cujo trabalho foi desenvolvido com *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae).

Como estádios iniciais, estão sendo considerados do 1° ao 4° estádios, cujas principais modificações estruturais são: a formação do complexo mitocondrial ou “nebenkern” e sua posterior diferenciação em derivados mitocondriais; formação do acrossoma, do adjunto do centríolo e, ainda, as fases iniciais da formação do axonema e do alongamento nuclear.

Estão sendo considerados estádios intermediários, do 5° ao 8° estádios, cujas principais características envolvem a compactação progressiva da cromatina nuclear, a formação do flagelo, e o conseqüente alongamento celular.

Os estádios finais, compreendidos pelo 9° e 10° estádios, caracterizam-se pela eliminação do excesso de citoplasma e o surgimento do espermatozóide.

4.3.1 Região da Cabeça

Formação do Acrossoma

Nas espermátides em estádios iniciais o complexo de Golgi apresenta-se bastante desenvolvido, com sua face côncava geralmente voltada para o envoltório nuclear. Numerosas vesículas de secreção aparecem entre o Complexo de Golgi e o núcleo (Figs. 6A-B) fusionando-se para darem origem à vesícula acrossômica (Figs.

6B-C), e posteriormente ao acrossoma, que determinará o pólo anterior da espermátide.

À medida que o núcleo alonga-se, perdendo seu formato esférico, a vesícula acrossomal ainda pode ser vista como um corpo esférico (Fig. 6C). Nos estádios intermediários, o acrossoma possui formato ovóide com contorno e conteúdo elétron-densos (Fig. 6D). Nos estádios mais avançados de alongamento do núcleo, o acrossoma passa por sucessivas mudanças e assume sua posição definitiva alojando-se numa depressão lateral da região apical do núcleo. Nos estádios finais o acrossoma possui estrutura homogênea e elétron-lúcida, é circundado por uma membrana acrossomal e uma membrana plasmática e apresenta-se pequeno em relação ao núcleo (Figs. 8D, 9A).

Transformações Nucleares

O núcleo nos estágios iniciais de diferenciação da espermátide é marcado por uma rápida alteração na forma e tamanho. Logo após a segunda divisão meiótica apresenta-se esférico e a cromatina finamente granular ocupa todo o volume nuclear (Fig. 6A). Nos estádios subseqüentes, porém ainda iniciais, ele se caracteriza por apresentar aumento gradual na condensação da cromatina. Por volta do 4° estágio, toda a cromatina apresenta aspecto granular, entretanto, áreas elétron-transparentes podem ser observadas, juntamente com o discreto alongamento nuclear (Figs. 6C).

Nos estádios intermediários de diferenciação o núcleo sofre alterações marcantes, seu formato passará de esférico a fusiforme e simultaneamente aparecerá, no citoplasma, um grande número de microtúbulos orientados longitudinalmente em fileira única, e paralelos ao envoltório nuclear. No final do 5° estágio as áreas elétron-transparentes começam a desaparecer e a cromatina passa a apresentar um aspecto densamente granular (Figs. 6D, 7A-B). Nas fases subseqüentes, as principais alterações que ocorrem no núcleo são: o seu alongamento e, simultaneamente, a compactação cromatínica. A partir do 7° estágio, a cromatina, que antes assumia um aspecto grânulo-fibrilar, torna-se filamentosa (Figs. 7C).

No 8° estágio a cromatina, que até então se apresentava filamentosa, assume o aspecto de massas cromatínicas (Figs. 7D, 8A), as áreas elétron-transparentes encontram-se reduzidas. Ao final desse estágio, observa-se um acréscimo no grau de agregação da cromatina, entretanto, algumas lacunas elétron-transparentes de

distribuição irregular ainda podem ser observadas, permeando a massa cromatínica (Figs. 8A-B).

Nos estádios finais de maturação das espermatídes e formação dos espermatozóides, a cromatina encontra-se completamente compactada, o núcleo apresenta-se circular em secção transversal (Figs. 8C) e fusiforme em secção longitudinal (Fig. 9A), desaparecem as pequenas lacunas elétron-transparentes e o diâmetro nuclear encontra-se reduzido. A camada de microtúbulos, bem como as membranas adjacentes (já afastadas do contorno nuclear), ainda presentes no início deste estádio (Figs. 8C-D), encontram-se ausentes ao final do mesmo, no espermatozóide (Fig. 9B).

4.3.2 Região de Transição Núcleo-Flagelo

Adjunto do Centríolo

Em *Chrysomya megacephala* o adjunto do centríolo começa a ser formado já nos primeiros estádios da espermiogênese (provavelmente a partir do 3º estádio), sendo que o início de seu desenvolvimento é marcado por uma rápida deposição de material elétron-denso no pólo caudal da célula (Figs. 10A-B).

No início do 4º estádio, o adjunto do centríolo apresenta o formato de anel (Fig. 10C), e nos estádios intermediários um aumento significativo no tamanho desta estrutura foi observado. O aspecto observado no material que constitui o adjunto do centríolo é o de uma massa elétron-densa permeada por áreas elétron-lúcidas (Figs. 10D-11A). Em secção longitudinal tal estrutura foi observada na região posterior do núcleo, em processo de alongamento (Fig. 11B) como todas as demais organelas celulares.

No espermatozóide o adjunto do centríolo foi observado na região posterior do núcleo ao lado do axonema – em secção longitudinal (Fig. 11F), e entre os derivados mitocondriais – em secção transversal da região flagelar (Fig. 14C).

Zona de “Overlap”

No espermatozóide, a região de contato entre o núcleo e o axonema é conhecida como zona de “overlap” e as estruturas que compõem essa região podem ser visualizadas em um mesmo plano de corte. Tal região é identificada, em cortes longitudinais, por uma aparência chanfrada do núcleo – uma indentação em forma de “U”, produzida pela origem e emergência dos componentes flagelares, que pode ser evidenciada nos estádios intermediários e finais de diferenciação das espermátides (Figs. 11B, 11F, 16G). No espermatozóide observa-se em secções longitudinais a extensa região de sobreposição “overlap” entre o núcleo e o axonema (Figs. 11F, 16G), podendo a mesma região ser observada em secções transversas (Figs. 11C, 16E).

A cavidade nuclear onde o flagelo é inserido pode ser visualizada como uma estrutura circular pequena - denominada “peg”. Quando observada em secção transversal, assemelha-se a um pequeno círculo de citoplasma, excentricamente localizado em relação ao núcleo (Figs. 11D-E).

4.3.3 Região Flagelar

Formação dos Derivados Mitocondriais

Em *Chrysomya megacephala*, nos estádios iniciais de diferenciação da espermátide observa-se uma grande quantidade de mitocôndrias de tamanhos e formatos variados, posicionadas em um dos pólos da célula (Fig. 12A).

As mitocôndrias fusionam-se para formar o complexo mitocondrial, também conhecido como “Nebenkern”, (Figs. 12B-D, 13A). À medida que o citoplasma da espermátide sofre alongamento (Fig. 12D) tais estruturas também se alongam, e iniciam seu processo de divisão (Fig. 13A)

No início dos estádios intermediários o complexo mitocondrial separa-se, formando os dois derivados mitocondriais, que são observados dispostos próximos e paralelos entre si, ao lado do axonema (Fig. 13B). Ainda nos estádios intermediários inicia-se a formação da estrutura paracristalina encontrada no interior dos derivados mitocondriais. Nos estádios finais da diferenciação e no espermatozóide uma matriz

paracristalina é observada preenchendo quase totalmente os derivados mitocondriais (Fig. 13D, 14D-F).

Os dois derivados, apesar de possuírem áreas equivalentes em secções transversas, apresentam comprimentos diferentes. Essa diferença pode ser evidenciada em secções no final do flagelo, com o axonema ladeado por apenas um dos derivados mitocondriais (Figs. 14A, C).

Formação do Axonema

No início da espermiogênese o axonema começa sua organização a partir do centríolo, que nos estádios iniciais se diferencia em corpúsculo basal e dará origem ao axonema. Em *Chrysomya megacephala* a origem e a inserção do flagelo no núcleo podem ser observadas nos estágios iniciais da diferenciação da espermátide (Fig. 12C).

Por volta do 5º estágio observa-se, simultaneamente ao alongamento do citoplasma, o crescimento do axonema (Fig. 13C). Ainda durante os estádios intermediários, o axonema – no qual se inicia a formação dos microtúbulos acessórios, mostra-se contornado por cisternas lisas, que parecem separá-lo dos derivados mitocondriais (Figs. 13D).

No final dos estádios intermediários e início dos estádios finais, o axonema já se encontra organizado na sua configuração definitiva, formado por 2 microtúbulos centrais, nove duplas periféricas de microtúbulos e 9 microtúbulos acessórios. O axonema apresenta, então, o padrão de “9+9+2” microtúbulos (Figs. 13D, 14B-E).

Nenhum indício de ligação física entre o axonema e os derivados mitocondriais foi encontrado. Porém, quando analisado o alinhamento espacial do axonema em relação aos derivados mitocondriais, percebe-se que os pares de microtúbulos 2 e 4 do axonema encontram-se sempre angularmente relacionados aos derivados mitocondriais (Fig. 14E).

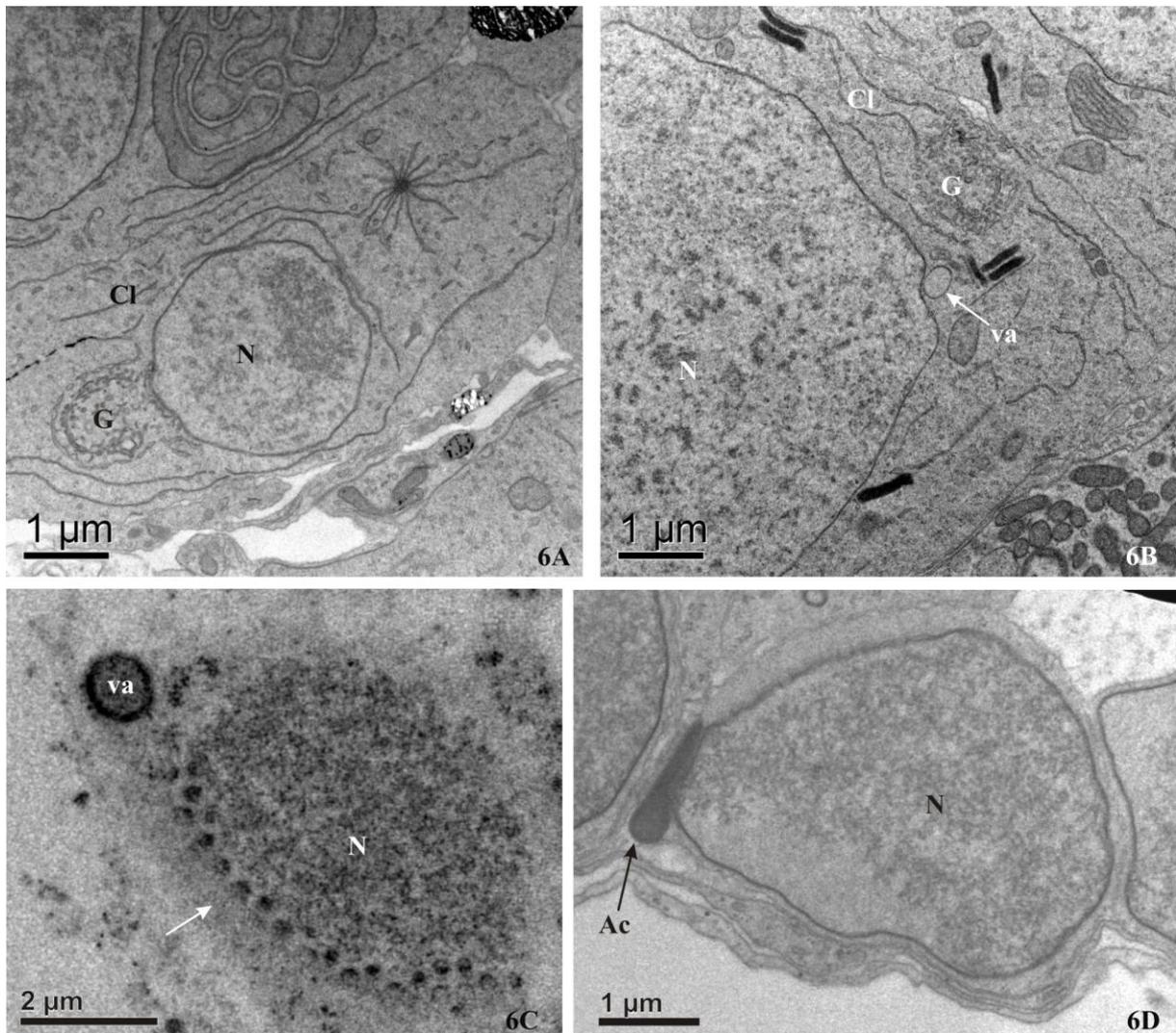
Ao final do processo de diferenciação, o espermatozóide de *C. megacephala* apresenta o formato alongado; o acrossoma lateralmente posicionado em relação ao núcleo, com conteúdo homogêneo; o formato do núcleo varia de circular a oval – em secções transversais, com cromatina totalmente compactada; presença de adjunto centriolar (bastante elétron-denso); axonema com dois microtúbulos centrais, nove

duplas de microtúbulos periféricos, nove microtúbulos acessórios intercalados por fibras densas; dois derivados mitocondriais de comprimentos diferentes, quase completamente preenchidos por material elétron-denso em arranjo paracristalino e circundados por membranas.

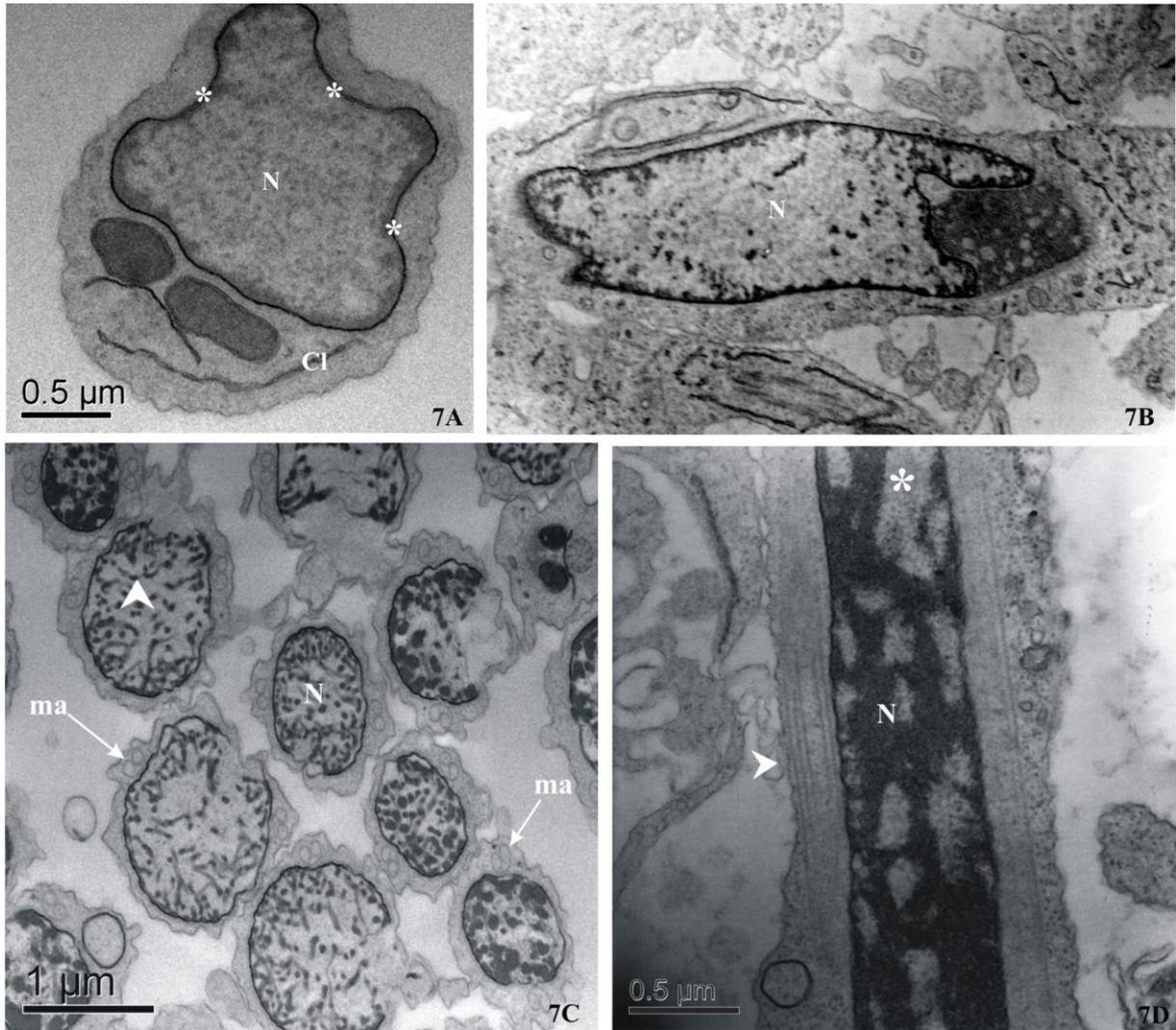
Quando examinados em microscopia óptica com contraste interferencial, os espermatozóides coletados nos testículos e nas espermatecas possuem aparência alongada, medindo aproximadamente 590 μm de comprimento total (Figs. 15C-D), sendo que a região da cabeça (compreendida pelo acrossoma e núcleo) mede aproximadamente 60 μm (Figs. 15A, D), e região do flagelo (representado por um adjunto do centríolo, dois derivados mitocondriais e um axonema), aproximadamente 530 μm (Figs. 15C-D).

Espermatozóides preparados com fluorocromo específico para marcar região de núcleo (DAPI: 4,6-diamino-2-phenyndole), tiveram sua estrutura analisada em microscopia óptica (fluorescência), e o resultado das medições nucleares foram muito semelhantes às obtidas anteriormente por contraste interferencial (Fig. 15D). As espermátides em processo de diferenciação possuem aparência arredondada, enquanto os espermatozóides possuem seus núcleos alongados (Fig. 15B).

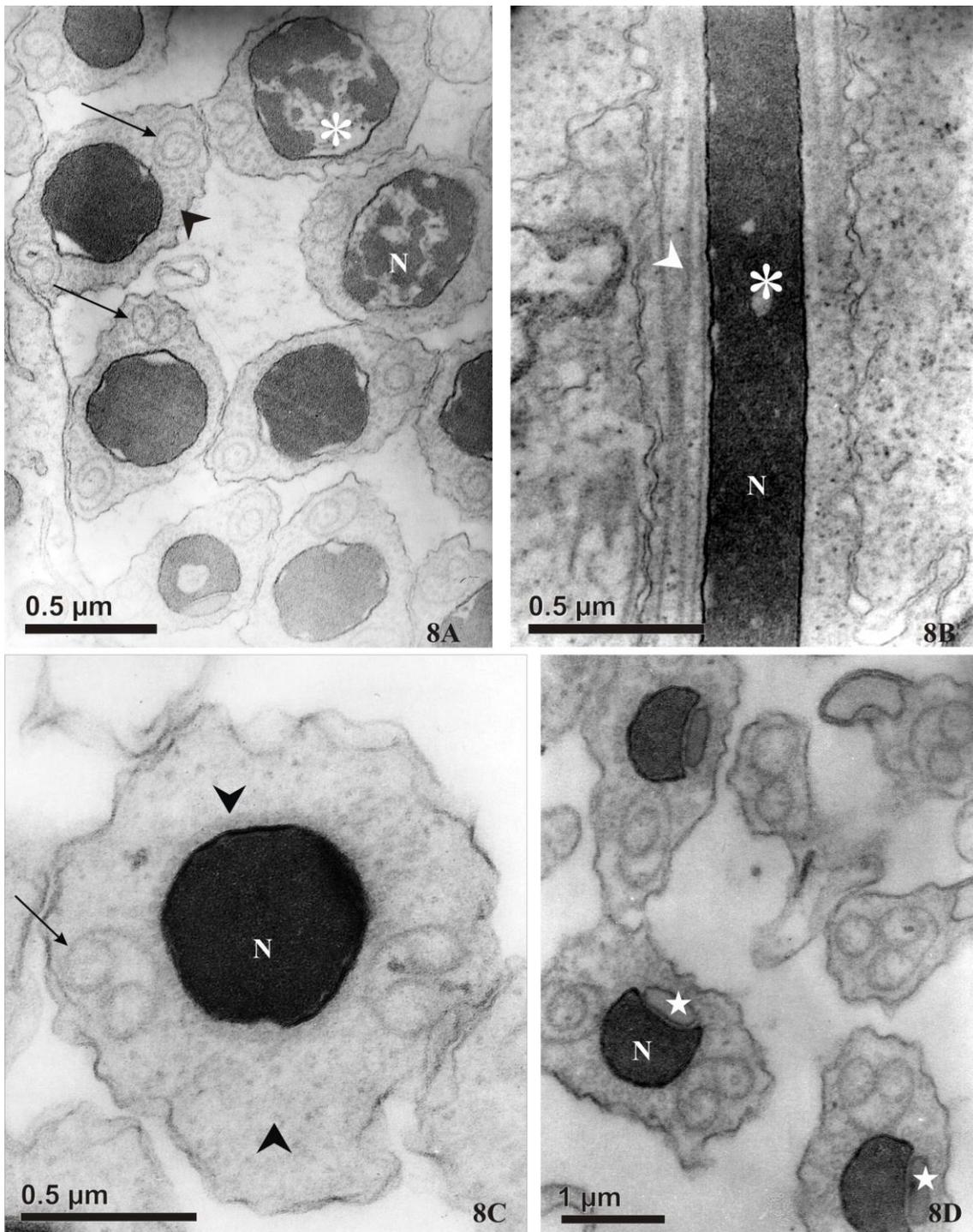
Não foram observadas diferenças morfológicas quando foram comparados os espermatozóides encontrados no testículo dos machos e os armazenados no interior das espermatecas das fêmeas.



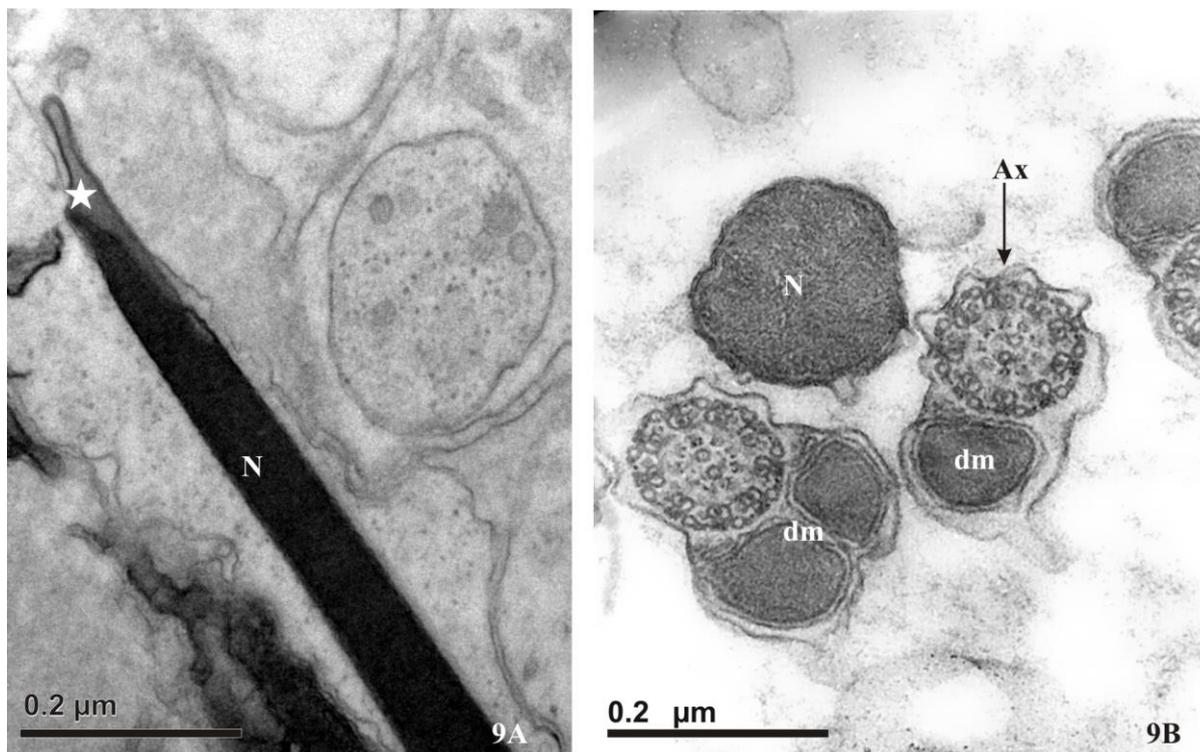
Figuras 6A-D. Micrografias de espermátides – região da cabeça. **(A-B):** Cisternas do complexo de Golgi (G) e cisternas de retículo endoplasmático (CI) são observadas no citoplasma. **(B):** A vesícula acrossomal (va) é observada na região apical do núcleo (N). **(C):** Material fixado com ácido tânico. Inúmeros complexos de poros (seta) são observados no envoltório nuclear. **(D):** Acrossoma (Ac) em alongamento.



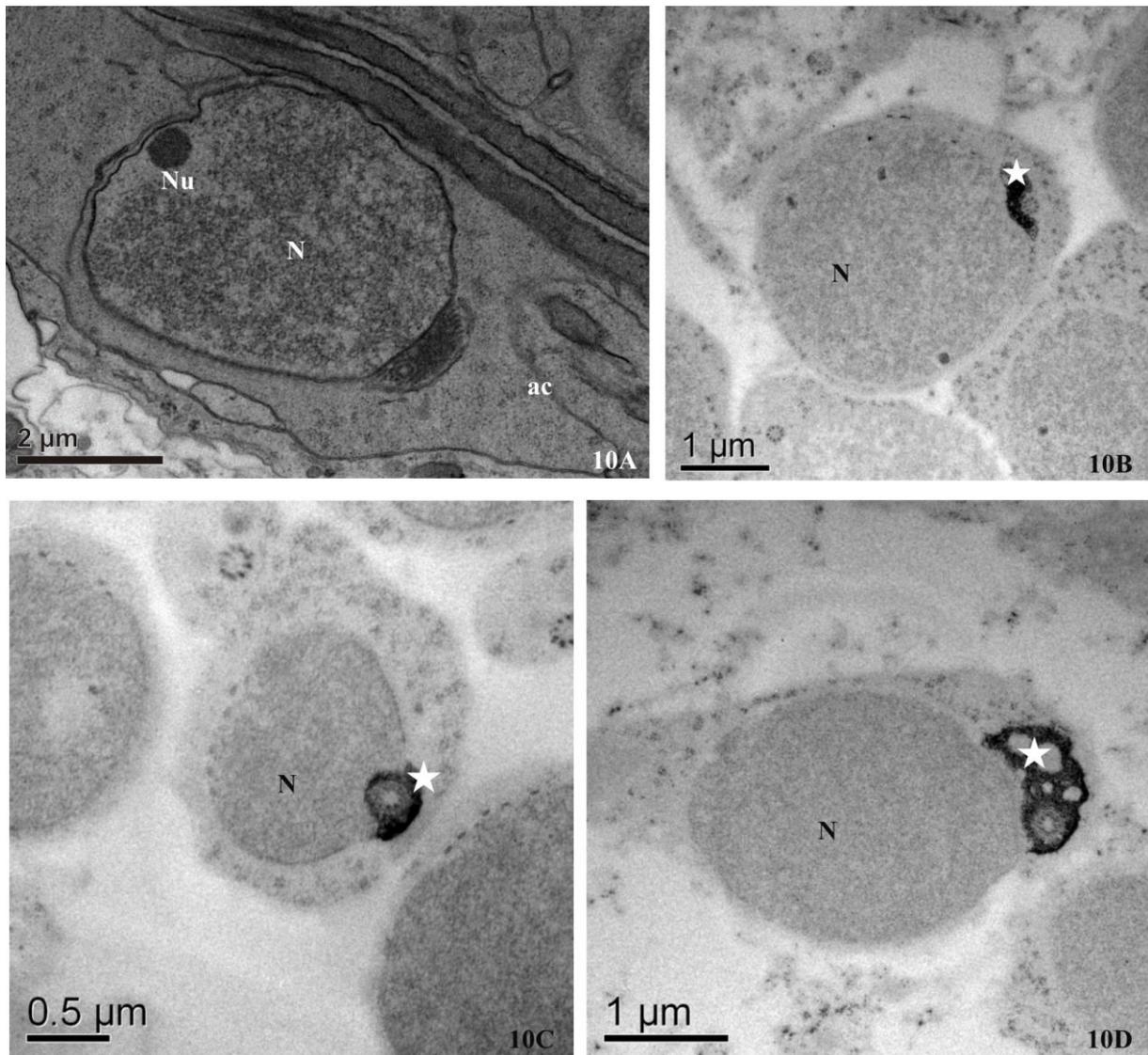
Figuras 7A-D. Micrografias de espermátides – região da cabeça. **(A):** Núcleo (N) apresentando concavidades (asteriscos). Cisternas de retículo endoplasmático (CI). **(B):** Núcleo em fase de alongamento. **(C):** Cromatina em forma de filamentos (cabeça de seta); membranas adjacentes (ma). **(D):** Núcleo possui aspecto de massas cromatínicas entremeadas por lacunas elétron-lúcidas (asterisco); microtúbulos (cabeça de seta).



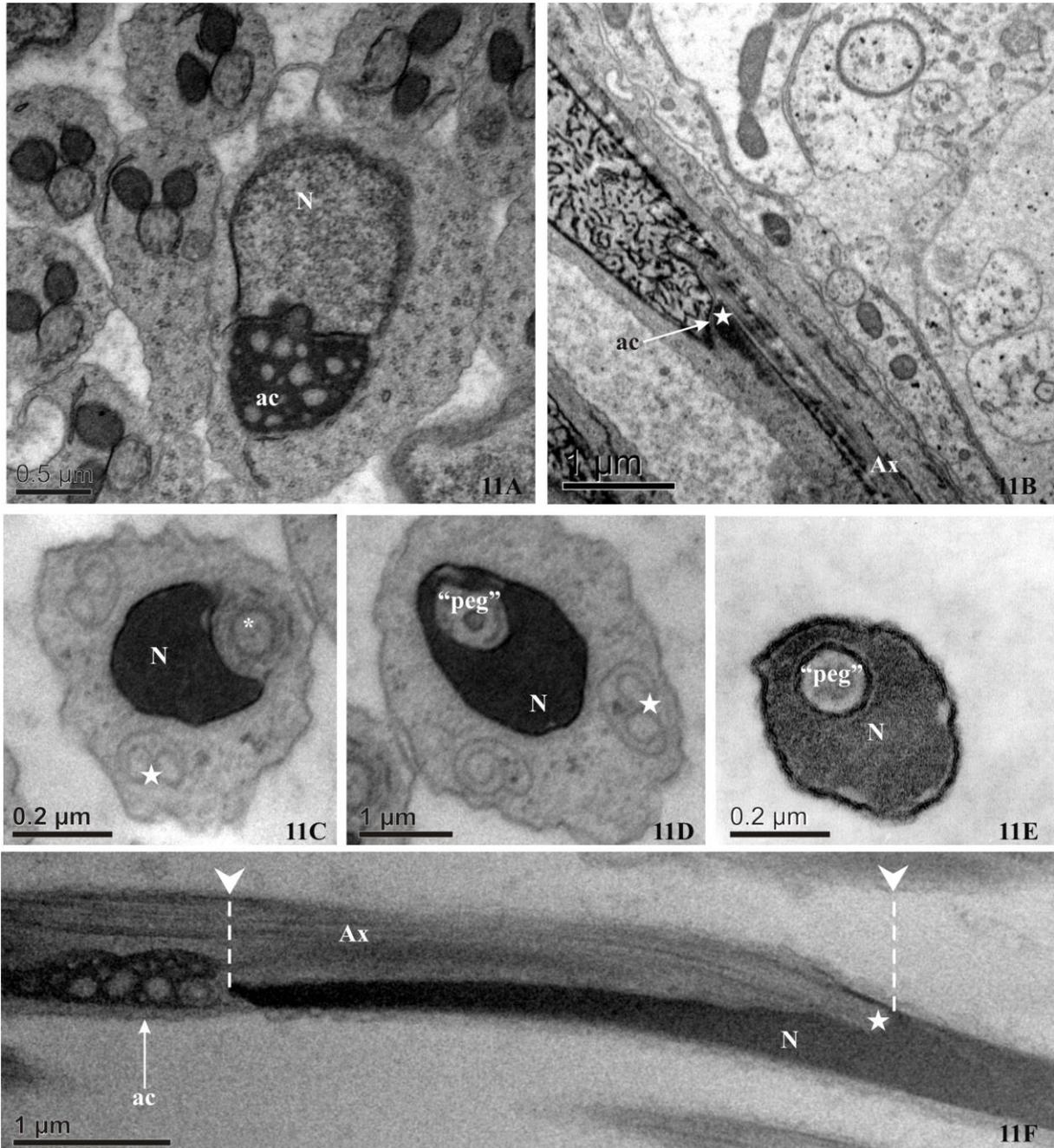
Figuras 8A-D. Micrografias de espermátides – região da cabeça. **(A-B):** Núcleo (N) com aspecto de massas cromatínicas entremeadas por lacunas elétron-lúcidas (asterisco). Membranas adjacentes (setas) e microtúbulos (cabeça de seta) são observados no citoplasma. **(C-D):** Núcleo circular em secções transversas demonstrando cromatina densamente compactada. Em **(D)** observa-se o acrossoma (estrela) lateralmente ao núcleo.



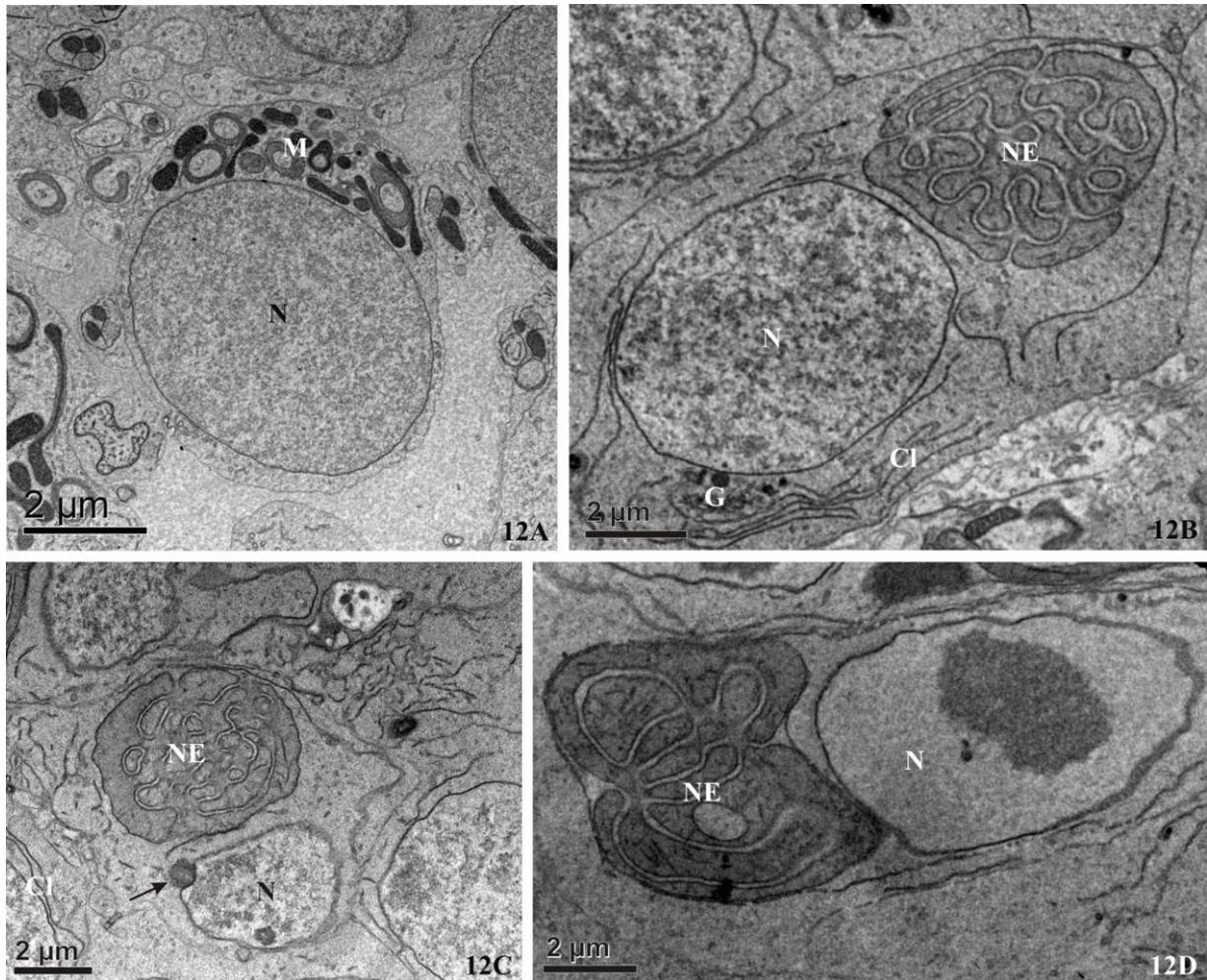
Figuras 9A-B. Micrografias de espermatíde e espermatozóide – região da cabeça. **(A-B):** Núcleo (N) com cromatina compactada. **(A):** Acrossoma (Ac) lateral ao núcleo. **(B):** Material obtido da espermateca. Axonema (Ax); derivados mitocondriais (dm).



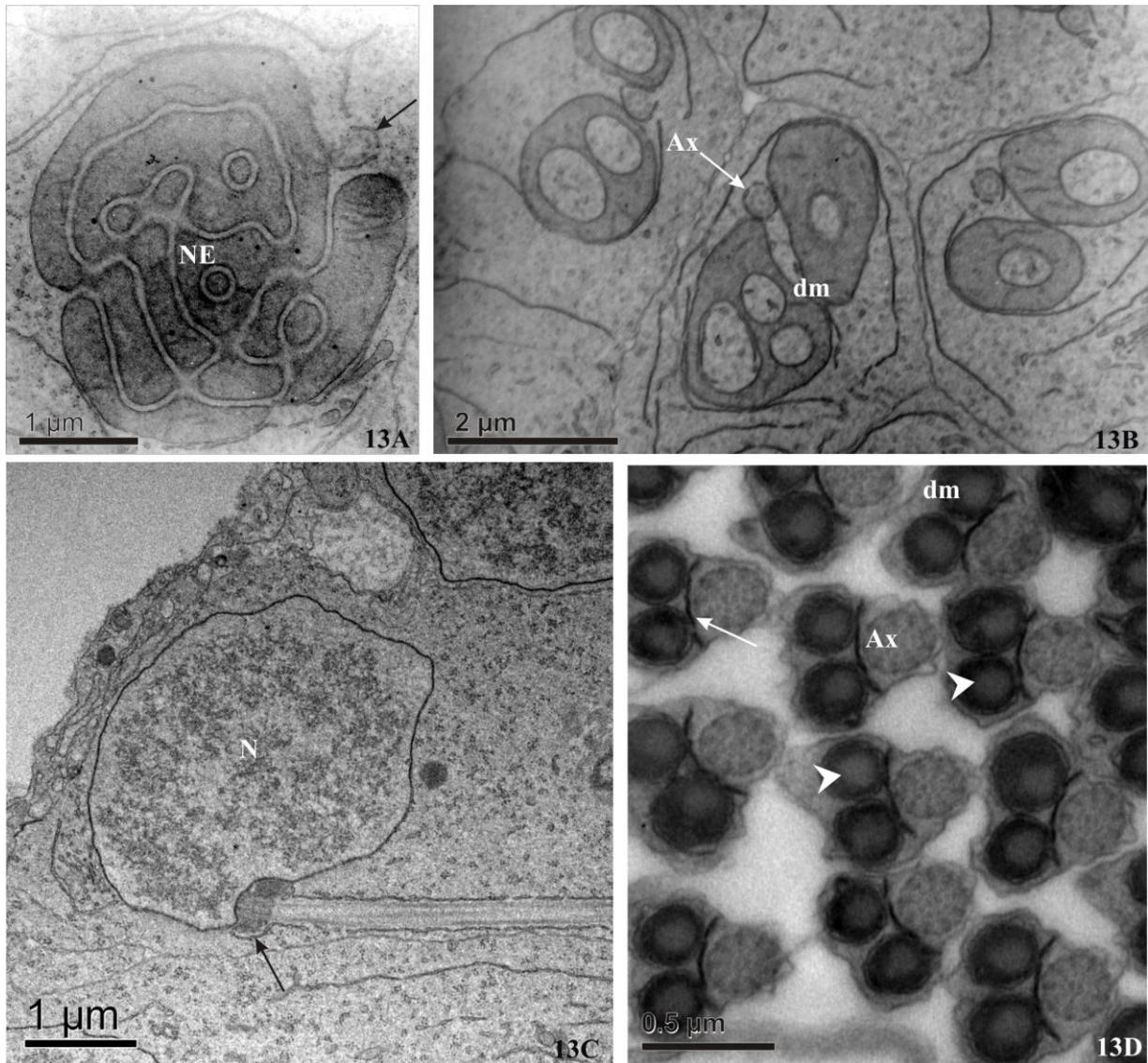
Figuras 10A-D. Micrografias de espermátides – região de transição núcleo-flagelo. **(A):** Adjunto do centríolo (ac) definindo o pólo caudal da espermátide. Núcleo (N); Nucléolo (Nu). **(B-D):** Material fixado com ácido tânico. Seqüência de micrografias demonstrando a deposição gradual do material elétron-denso que constitui o adjunto do centríolo (estrela), em uma depressão do núcleo (N).



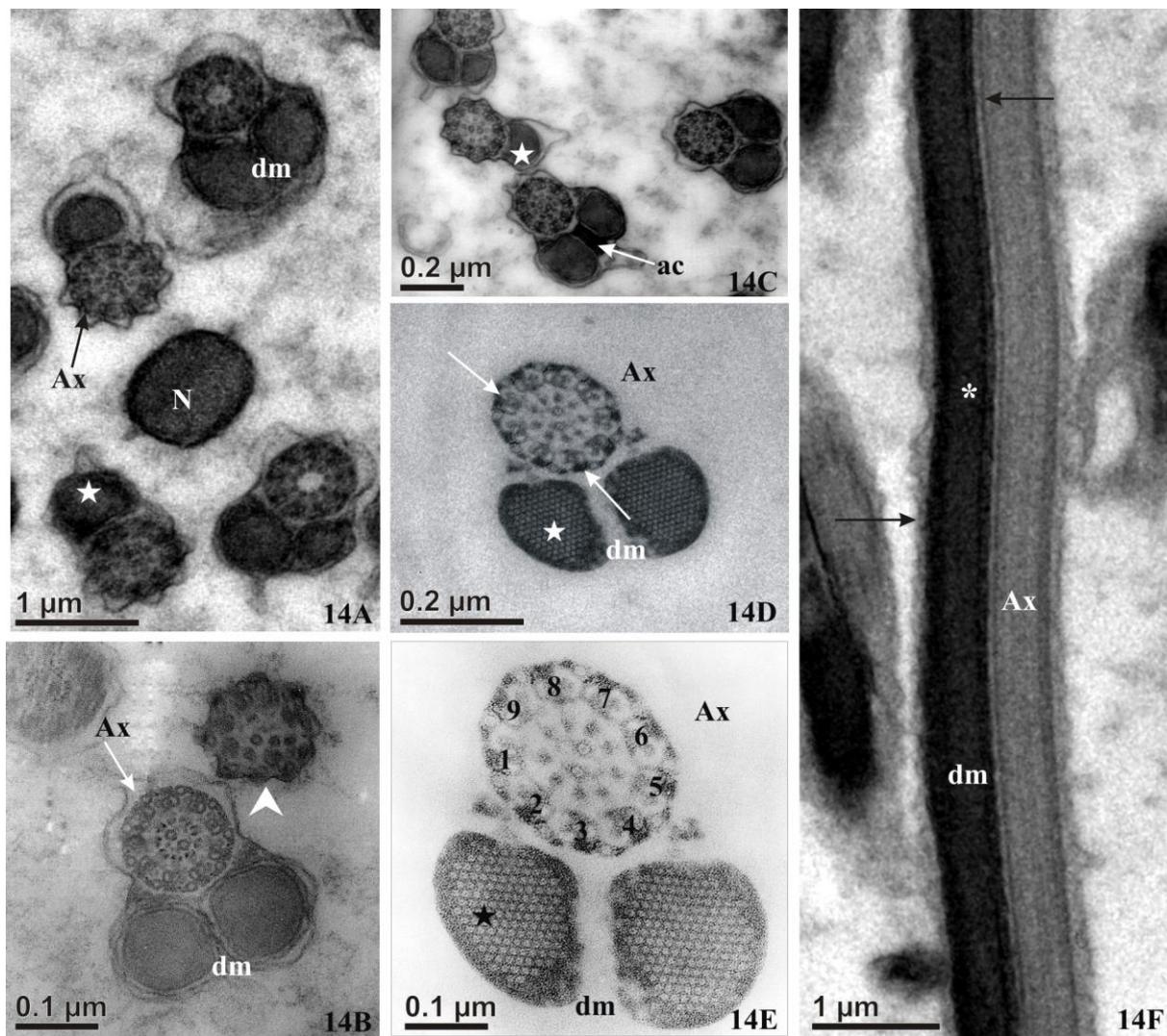
Figuras 11A-D. Micrografias de espermátides – região de transição núcleo-flagelo. **(A-B):** Adjunto do centríolo (ac) localizado na região posterior do núcleo (N). **(B):** Observa-se a inserção do flagelo na base do núcleo. Axonema (Ax). **(C):** Secção transversal da região de sobreposição núcleo-flagelo - “overlap”. Membranas adjacentes (estrela) são observadas afastando-se do núcleo; axonema (asterisco) **(D-E):** Núcleo circundando a região de “peg”. **(F):** Secção longitudinal da região de sobreposição núcleo-flagelo - “overlap” (delimitada por cabeças de seta).



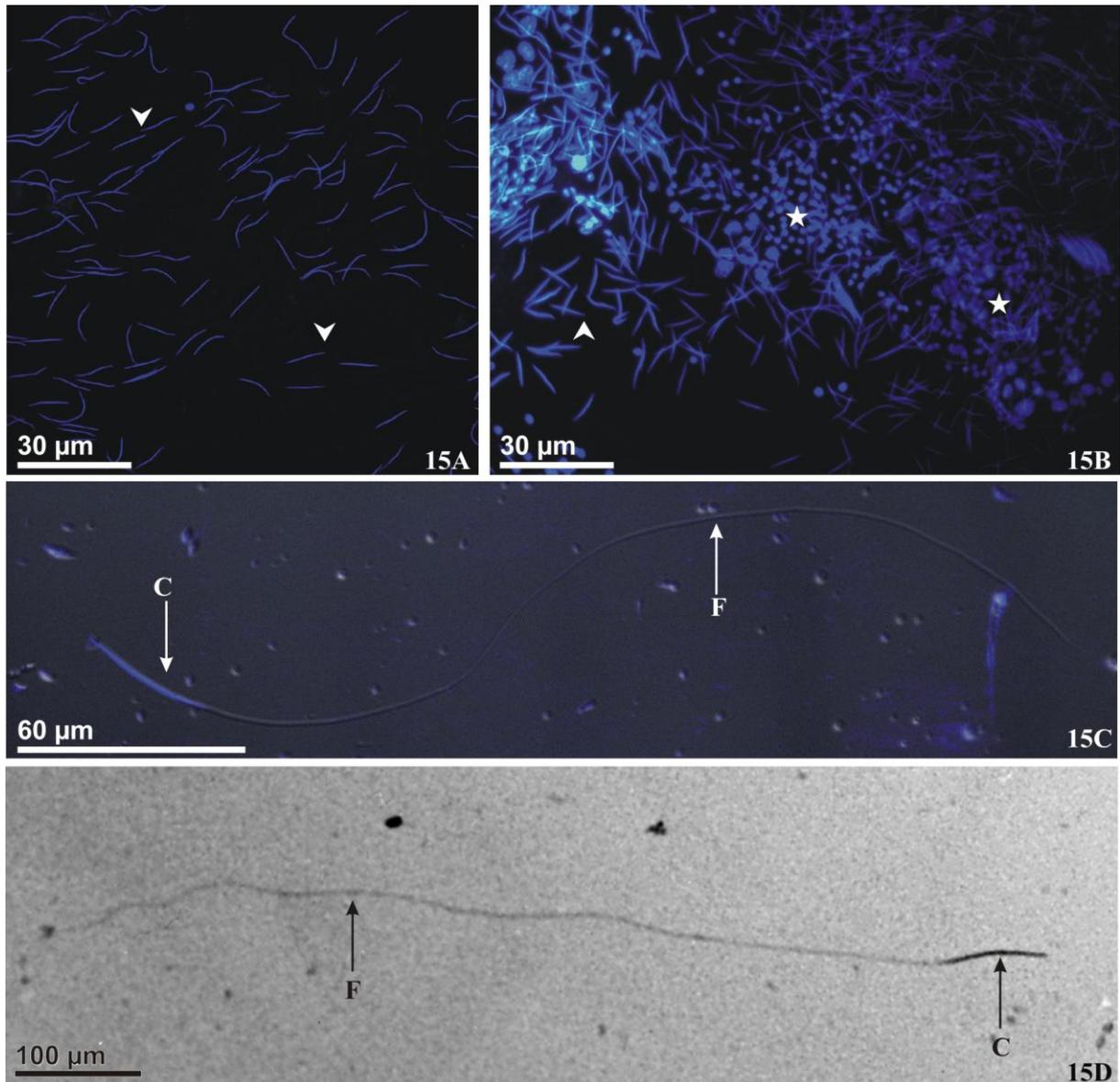
Figuras 12A-D. Micrografias de espermátides – região do flagelo. **(A):** O núcleo (N) ocupa quase todo o citoplasma da célula e um conjunto de mitocôndrias (M) podem ser visualizadas em um dos pólos. **(B-C):** Cisternas do complexo de Golgi (G) e cisternas de retículo endoplasmático (CI) são observadas no citoplasma. “Nebenkern” (NE); inserção do flagelo (seta) em uma depressão do núcleo da espermátide. **(D):** “Nebenkern” em preparação para divisão.



Figuras 13A-D. Micrografias de espermátides – região do flagelo. **(A):** Surgimento do axonema (seta) em uma das reentrâncias do “nebenkern” (NE). **(B):** Axonema (Ax) presente entre os derivados mitocondriais (dm). **(C):** Inserção do axonema (seta) na região posterior do núcleo (N). **(D):** Secção transversal de flagelo. Derivados mitocondriais (dm) praticamente preenchidos por material paracristalino (cabeça de seta); axonema (Ax); cisterna de retículo endoplasmático (seta).



Figuras 14A-F. Micrografias de espermatozoides – região do flagelo. **(A-C):** Espermatozoides obtidos da espermateca nos quais podem ser observados: derivados mitocondriais (dm); axonema (Ax); núcleo (N); regiões terminais do derivado mitocondrial (estrela); região terminal do axonema (cabeça de seta); adjunto do centríolo (ac). **(D-E):** Espermatozoides obtidos da espermateca, fixados com ácido tânico. Derivados mitocondriais (dm) preenchidos com material paracrystalino (estrela). Fibras densas são observadas entre os microtúbulos acessórios (setas); pares 2 e 4 de microtúbulos do axonema mostram-se alinhados aos derivados mitocondriais (dm). **(F):** Material obtido do testículo. Secção longitudinal da região do flagelo. Cristas mitocondriais (setas); material paracrystalino (asterisco).



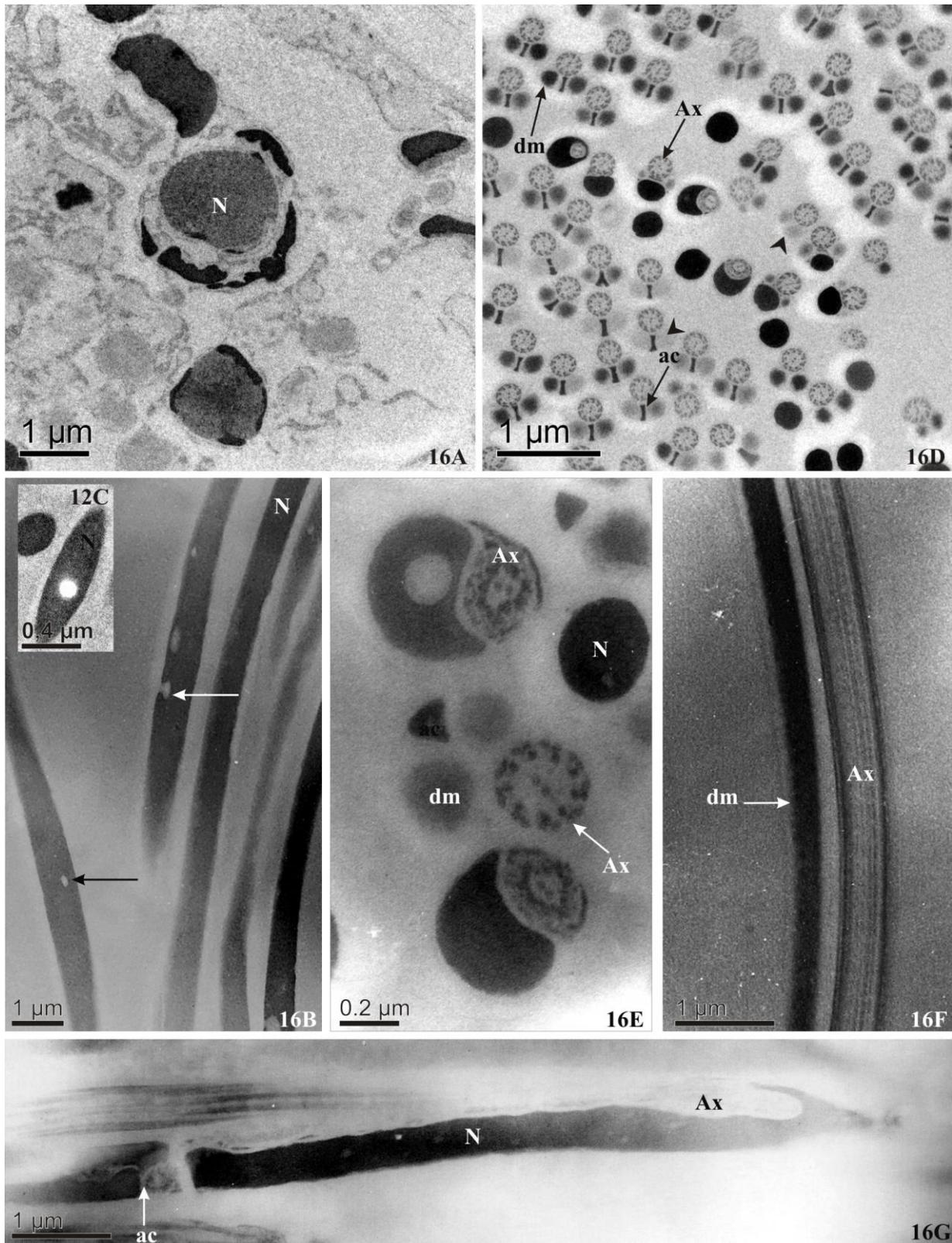
Figuras 15A-D. Micrografias de espermátides e espermatozóides em MO. **(A-B):** Núcleo de espermatozóides e de espermátides. Observar a marcação com fluorocromo (DAPI). Núcleo no espermatozóide apresenta-se alongado (cabeça de seta), e nas espermátides arredondado (asterisco). **(C):** Espermatozóides observados em fluorescência com sobreposição de contraste interferencial; **(D):** Espermatozóide observado somente com contraste interferencial. Cabeça (C); flagelo (F). **(A, C):** Imagens adquiridas em Microscópio Confocal Leica. **(B, D):** Imagens adquiridas em microscópio Axiophot Zeiss.

4.4 Análise Citoquímica – Ácido Etanólico Fosfotúngstico (E-PTA)

A técnica do ácido etanólico-fosfotúngstico – que possibilita o reconhecimento de proteínas básicas - revelou que em células espermáticas do testículo de *Chrysomya megacephala*, tais proteínas encontram-se presentes em baixas concentrações nos núcleos das espermátides em estádios iniciais de diferenciação (Fig. 16A). Porém, nos núcleos dos espermatozóides, uma forte reação foi observada em toda região de cromatina condensada (Figs. 16B-E, G). Ainda se tratando de região nuclear, não foi observada reação onde existem lacunas nucleares, uma vez que tais estruturas apresentaram-se completamente translúcidas (Figs. 16B-C).

Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo observado em secções transversais (Figs. 16D-E), e em secção longitudinal na base do núcleo (Fig. 16G), apresentou-se marcado positivamente pelo EPTA.

Na região flagelar, os derivados mitocondriais podem ser observados ora positivamente marcados (Figs. 16D-F), ora sem marcação (Figs. 16D). No axonema todos os microtúbulos, assim como as fibras densas (Figs. 16D-F) apresentam reação positiva para EPTA.



Figuras 16A-G. Micrografias em MET de espermatídes e espermatozóide utilizando E-PTA. **(A):** Espermatíde em estágio inicial de desenvolvimento com núcleo (N) fracamente marcado. **(B-C):** Núcleo (N) do espermatozóide fortemente marcado; lacunas nucleares translúcidas (setas). **(D-E):** Nos espermatozóides, núcleo (N); adjunto do centríolo (ac) e axonema (Ax) são E-PTA positivos. Derivados mitocondriais (dm) marcados positivamente (seta) e não marcados (cabeça de seta). **(G).** Região de transição núcleo-flagelo e seus componentes E-PTA positivos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Organização testicular

Os aspectos ultra-estruturais observados nos tecidos que compõem a parede do testículo em *Chrysomya megacephala* são os mesmos descritos por Bairati (1967) para *Drosophila melanogaster*; por Bão (1987) para *Ceratitis capitata*, e corrobora os dados anteriormente obtidos por Messias JR. (1990) para *C. megacephala*. Tal órgão é recoberto por dois tipos de tecidos – uma camada de células pigmentadas e uma de células musculares. A função atribuída às células pigmentadas, ao que tudo indica, seria a de barreira testicular, envolvida na proteção do referido órgão. A camada muscular é constituída por células musculares estriadas do tipo visceral comum em insetos (Harwood, 1988), e teria contribuição significativa no sentido de promover o deslocamento dos feixes de células espermáticas, e a posterior liberação do espermatozóide no interior dos testículos.

Foi observado que em *C. megacephala* as células germinativas masculinas desenvolvem-se em cistos, no interior do folículo testicular. Apesar da maioria dos cistos encontrados apresentarem com frequência aproximadamente 2^7 , ou seja, 128 células, quantidades diferentes também foram observadas. Quando a diferença entre o número de células encontradas de um cisto para outro sofre pequenas variações, acredita-se que a mesma possa estar sendo estabelecida por dois fatores: a eliminação de células inviáveis ao processo de fertilização – em razão de alterações morfofuncionais; ou ainda, que os pequenos conjuntos de espermatozoides agrupados possam ser resultantes da reorganização do conteúdo de um cisto, em função da degeneração da célula cística e conseqüente eliminação de inúmeras células em processo de diferenciação. Resultados semelhantes aos obtidos para *C. megacephala* foram observados por Kiefer (1966) no mutante X/0 de *Drosophila melanogaster* e Anderson (1967) na espermiogênese da mesma espécie; e por Quagio-Grassiotto (1983) e Bão (1987) na linhagem selvagem, e no mutante “olho-róseo”, respectivamente, de *Ceratitis capitata*.

Observações envolvendo a análise e descrição da espermiogênese, abordando a quantidade de células espermáticas presentes no interior dos cistos têm sido estudadas em várias ordens de insetos, como Diptera (Tokuyasu *et al.*, 1972a, 1972b; Quagio-Grassiotto, 1983, 1993; Bão, 1987; Messias JR., 1990); Coleoptera (Lino-

Neto, 1993; Name *et al.*, 2007); Hemiptera (Chawanji *et al.*, 2007); Homoptera (Báo *et al.*, 1997); Hymenoptera (Cruz-Landim, 2001; Conte, 2004; Zama *et al.*, 2007); Lepidoptera (Mancini, 2003); Orthoptera (Cruz-Landim, 1979); Zygentoma (Dallai *et al.*, 2002); entre outros.

De acordo com Virkki (1973), Cruz-Landim (2001) e Zama *et al.* (2007), no que diz respeito ao número de células espermáticas encontradas no interior dos cistos, além de tal característica ser espécie-específica, parece haver uma co-relação entre as tendências evolutivas e a redução do número destas células. Os argumentos que sustentam tal premissa baseiam-se em observações, nas quais ordens mais primitivas apresentam um maior número de espermatozóides por cisto, enquanto que em ordens mais derivadas tal número decresce consideravelmente. Ou seja, a redução do número de espermatozóides por cisto parece apresentar um valor adaptativo para a especialização da população, fato relevante para estudos taxonômicos e filogenéticos.

Em *C. megacephala*, assim como descrito para *Drosophila melanogaster* por Bairati (1967); Tokuyasu *et al.* (1972a; 1972b) quando do estudo da dinâmica da espermiogênese, e para *Ceratitis capitata* por Báo (1987), pelas características estruturais e ultra-estruturais do tecido germinativo, o testículo pode ser dividido em três regiões distintas: terço proximal, terço médio e terço distal, em relação à posição do ducto deferente.

Em *C. megacephala*, os cistos localizados no terço distal apresentam-se com espermatogônias. Observou-se ainda, que a maior concentração de cistos encontra-se na região intermediária do testículo, aspecto observado também em *Drosophila melanogaster* e *Ceratitis capitata* (Tokuyasu *et al.*, 1972a; Báo, 1987). A grande variação no número de células nas diferentes regiões do testículo, segundo Báo (1987), está relacionada às inúmeras modificações morfofisiológicas pelas quais as espermátides passam até atingirem seu estágio final. Tais modificações envolvem o alongamento da célula e conseqüente perda de volume citoplasmático, o que levaria o conjunto de cistos a ocupar um espaço cada vez menor em relação à região testicular onde o mesmo se encontra.

Vale ressaltar ainda, que na região proximal o cisto ocupa um espaço ainda menor, pois é nesta região que ocorre a degeneração das células císticas com a conseqüente desorganização dos cistos e liberação dos espermatozóides. Logo, as análises demonstraram que o número de cistos perfeitamente estruturados nessa região é menor quando comparada com a região intermediária.

5.2 Organização da Espermateca

Para a maioria dos insetos, inseminação e fertilização constituem eventos temporariamente distintos. Em insetos fêmeas, estruturas altamente especializadas no armazenamento e eliminação dos espermatozóides são encontrados com frequência, e tal armazenamento pode se dar por longos períodos de tempo (Fritz, 2002), como é o caso de algumas formigas onde os espermatozóides são armazenados e mantidos viáveis por períodos consideravelmente longos – até 30 anos (Pamilo, 1991).

A morfologia da espermateca varia largamente de acordo com as espécies, embora apresente padrão constante para uma mesma espécie (Gregory, 1965; Winterton *et al.*, 1999). Em algumas espécies – como, por exemplo, em *Locusta migratoria migratorioides* – as espermatecas consistem de um simples tubo cego (Gregory, 1965), enquanto em outras – *Gryllus bimaculatus* – pode ser representada por uma bolsa esférica capaz de distender-se consideravelmente (Simons, 1986). Em alguns coleópteros, bem como em alguns dípteros, as espermatecas apresentam-se densamente quitinizadas, o que lhes confere uma capacidade fixa de armazenamento.

O armazenamento de espermatozóides não está restrito apenas às espermatecas, existindo ainda, estruturas como receptáculo seminal, bolsa copulatória, entre outras. Múltiplos órgãos de armazenamento permitem potencialmente que fêmeas armazenem espermatozóides diferencialmente (Hellriegel & Ward, 1998; Hellriegel & Bernasconi, 2000) de dois ou mais machos. Armazenamento diferencial e uso do espermatozóide têm sido bem demonstrados em *Scatophaga stercoraria* (L.) (Ward, 1993; 2000); armazenamento diferencial foi também demonstrado em moscas-das-frutas do Mediterrâneo (Yuval *et al.*, 1996), que o faz em três espermatecas (Dodson, 1978). Em algumas espécies de Tephritidae, o segundo local de armazenamento de espermatozóides tanto pode ser o receptáculo seminal (Fowler, 1973), quanto à bolsa copulatória (Twig & Yuval, 2005).

Em *Chrysomya putoria* o aparelho reprodutor feminino é composto por dois ovários, três espermatecas, duas glândulas acessórias, dois ovidutos laterais, um oviduto comum e uma vagina (Avancini & Prado, 1986), estruturas estas, também observadas em *C. megacephala*. Em cada fêmea adulta, como padrão sugerido para Diptera por Parker *et al.* (1990), foram observadas três espermatecas quitinizadas. Entretanto, são poucos os estudos caracterizando a estrutura e ultra-estrutura da espermateca em dípteros.

O órgão consiste de uma camada externa de células epiteliais secretoras (Báo & Dolder, 1998; Fritz, 2002); e uma espessa parede quitinizada que circunda o lúmen do órgão (Báo & Dolder, 1998), lhe conferindo uma capacidade fixa de armazenamento (Parker *et al.*, 1990).

A ultra-estrutura da parede de quitina que circunda a espermateca em *Ceratitis capitata* possui 1 μm de espessura e apresenta uma organização lamelar com quantidades similares de camadas elétron-densas, alternadas com camadas elétron-lúcidas – vinte camadas no total (Báo & Dolder, 1998). Foi observado que *C. megacephala* apresenta o número e o aspecto da organização lamelar na parede de quitina similares ao descrito para *Ceratitis capitata*, embora a espessura de tal parede seja consideravelmente maior – 3 μm .

Foram observadas ainda, em *C. megacephala*, características estruturais e ultra-estruturais das células musculares de uma região de ducto espermático, responsável por conduzir os espermatozóides até a vagina. A camada de tecido muscular apresenta-se bastante espessa e o aspecto das fibras musculares sugere uma intensa atividade. Relatos de observações dessa estrutura em outras espécies não foram encontrados.

Em *C. megacephala* as células secretoras do tecido glandular que circunda a espermateca em muito se assemelha aos resultados encontrados para as duas espécies de Tephritidae (*Anastrepha suspensa* e *Ceratitis capitata*) que tiveram a morfologia de suas espermatecas descritas. A morfologia das células secretoras encontradas na espécie estudada é estruturalmente similar ao descrito para *Anastrepha suspensa* (Fritz, 2002) no que diz respeito à presença de células que possuem formato colunar. Por outro lado, quando comparadas aos resultados ultra-estruturais descritos para *Ceratitis capitata* (Báo & Dolder, 1998), à exceção do formato nuclear das células que nesta espécie são irregularmente oval e em *C. megacephala* apresentam-se esféricos, as demais características, como presença de mitocôndrias, vesículas, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e microvilosidades são similares às duas espécies.

A organização morfológica da espermateca, na região das células epiteliais secretoras de mucopolissacarídeos, permite a manutenção de um microambiente com pH apropriado e composição iônica constante, presença de nutrientes e outros fatores necessários para a manutenção do espermatozóide (Dallai, 1975; Huebner, 1980). A remoção experimental das glândulas acessórias ou mesmo a inibição da função das

células epiteliais secretoras resultam na morte gradual dos espermatozóides armazenados (Villavaso, 1975).

Segundo Parker (1970), um dos pré-requisitos para a seleção sexual através da competição espermática é que o espermatozóide de dois ou mais machos coexistam no interior do trato reprodutivo da fêmea no momento da fertilização. Espermatecas de insetos não possuem capacidade de armazenamento uniformemente fixa. Alguns insetos possuem espermatecas expansíveis que podem armazenar ejaculados de múltiplas cópulas (Simons, 1986), enquanto outros possuem capacidade limitada de armazenamento (Parker *et al.*, 1990). O número de espermatozóides que pode ser armazenado pelas fêmeas varia de acordo com a espécie, característica que possui, certamente, implicações diretas na seleção sexual através da competição espermática. Quando órgãos de armazenamento de espermatozóides possuem limitações em sua capacidade, como é o caso de *C. megacephala*, a sobreposição temporal entre os espermatozóides de dois machos pode ser dependente do número destas células que são transferidos pelo macho e armazenada pela fêmea na cópula.

5.3 Espermiogênese

O processo de diferenciação das organelas presentes nas células espermáticas, assim como a ultra-estrutura do espermatozóide em *Chrysomya megacephala* apresenta uma seqüência de desenvolvimento bastante semelhante ao encontrado para outros dípteros e não difere marcadamente do que vem sendo descrito para outros insetos (Phillips, 1970; Quagio-Grassiotto, 1983, 1993; Báó, 1987; Messias JR., 1990; Lino-Neto, 1993; Ndiaye *et al.*, 1996; Jameison *et al.*, 1999; Dallai *et al.*, 2001, 2004).

É comum encontrar, para a maioria dos insetos, descrições detalhadas de suas estruturas agrupadas em duas regiões: cabeça e cauda. Entretanto, em *C. megacephala* as espermátides apresentam uma característica bastante peculiar, uma região de sobreposição entre o núcleo e axonema, conhecida como zona de “overlap”, compreendendo uma extensão considerável de sobreposição de tais estruturas. Tal aspecto fez com que o espermatozóide, dessa espécie, tivesse sua estrutura dividida em três regiões distintas: região da cabeça, região de transição núcleo-flagelo e região flagelar, como será discutido em seguida.

Na região da cabeça, a formação do acrossoma é considerada como sendo essencial no processo de penetração do espermatozóide no ovócito, tanto em animais superiores quanto em insetos (Phillips, 1970; Baccetti, 1972; Baccetti & Afzelius, 1976). Em alguns dípteros foi demonstrada a formação do acrossoma a partir de uma cisterna do complexo de Golgi, a qual se diferencia pelo seu espessamento e conteúdo elétron-denso, formando a vesícula pró-acrossômica (Dallai *et al.*, 1984; Ndiaye & Mattei, 1992). Em *C. megacephala* a vesícula pró-acrossômica é encontrada em espermátides nos estádios iniciais de diferenciação, entre o complexo de Golgi e o núcleo, modificando-se, gradualmente até adquirir formato característico nos últimos estádios da espermiogênese. Características similares foram observadas por Bão *et al.* (1989); Lino-Neto (1993); Quagio-Grassiotto (1993); Dallai *et al.* (2002); Chawanji *et al.* (2007); Name *et al.* (2007), para outras espécies.

Messias JR. (1990) destaca em seu trabalho com *C. megacephala*, a presença de uma membrana lisa associada a uma das faces do acrossoma. Entretanto, descarta a possibilidade desta membrana ser a membrana intersticial descrita por Quagio-Grassiotto (1983) e por Bão *et al.* (1989) em *Ceratitis capitata*, embora acredite que tal estrutura possa possuir função análoga à da membrana intersticial, e se encontrar envolvida na morfogênese do acrossoma. A estrutura descrita por Messias JR. (1990) não foi observada neste trabalho.

O formato final do acrossoma nos espermatozóides de *C. megacephala*, revelou que esta organela é do tipo mais simples, com conteúdo aparentemente homogêneo, não possuindo perforatorium e camada extra-acrossomal, seguindo o padrão geralmente encontrado em Diptera (Baccetti, 1972).

Ainda em relação à região da cabeça, as transformações que o núcleo sofre durante o processo de espermiogênese são caracterizadas por dois fenômenos distintos: a mudança da forma esférica para alongada e a conversão da cromatina dispersa para compactada. Durante a espermiogênese, a cromatina é alterada química e estruturalmente e sua compactação se dá através da mudança do tipo de proteínas básicas associadas ao DNA nuclear, ocorrendo uma substituição de histonas somáticas por proteínas básicas ricas em arginina (tipo protamina) ou em lisina (Bloch, 1969).

As transformações nucleares que ocorrem durante a espermiogênese em *C. megacephala*, fazem com que o padrão de condensação da cromatina varie de completamente dispersa, forma encontrada nos estádios iniciais, a totalmente compactada, no espermatozóide. Esses padrões já foram descritos anteriormente em

outros representantes da infra-ordem Brachycera, como por exemplo, em *Scatophaga bullata* (Warner, 1971); *Musca domestica* (Gassner *et al.*, 1972); *Coelopa frigida* (Schränkel & Schwalm, 1974); *Ceratitis capitata* (Báo, 1987); *Megaselia scalaris* Loew (Curtis *et al.*, 1989); *Dacus oleae* (Dallai & Afzelius, 1991); *Dermatobia hominis* (Quagio-Grassiotto, 1993); bem como para vários grupos de insetos (Phillips, 1970; Baccetti, 1972).

Entretanto, quando os dados obtidos em *C. megacephala* foram comparados com os resultados encontrados por Lino-Neto (1993) e Name *et al.*, (2007) para Curculionidae (Coleoptera), observou-se que nestes últimos a compactação da cromatina acontecia ainda nos estádios iniciais, enquanto no modelo experimental tal aspecto foi observado nos estádios intermediários.

O núcleo das espermátides de *C. megacephala*, nos estádios intermediários passa por alterações conformacionais marcantes, e pode-se observar o aparecimento de um grande número de microtúbulos circundando o envoltório nuclear. O anel de microtúbulos, que em *C. megacephala* encontra-se presente a partir dos estádios intermediários, é referido como manchete e pode ser observado em diferentes grupos. Tem sido sugerido que a principal função da manchete seja promover a redistribuição do citoplasma e o alongamento celular durante a espermiogênese (Fawcett *et al.*, 1971).

O processo de condensação da cromatina em *C. megacephala* é acompanhado pela presença de membranas adjacentes. Descritas como sendo restos do envoltório nuclear e formada por uma unidade de membrana (Warner, 1971), pouco se sabe sobre sua origem, composição química e função. De concreto, existe apenas o fato da mesma ocorrer em espermátides de várias espécies de dípteros: *Leptogaster* sp (Fawcett *et al.*, 1971); *Coelopa frigida* (Schränkel & Schwalm, 1974); *Ceratitis capitata* (Quagio-Grassiotto, 1983; Báo *et al.*, 1989); *Chrysomya megacephala* (Messias JR., 1990) e *Dermatobia Hominis* (Quagio-Grassiotto, 1993). Schränkel e Schwalm (1974) sugeriram que essas estruturas apresentariam função de suporte mecânico durante a diferenciação nuclear, uma vez que se estendem desde o pólo anterior da espermátide até a região inicial da cauda.

Nos estádios finais de maturação das espermátides e formação dos espermatozóides em *C. megacephala*, a cromatina encontra-se completamente compactada e o núcleo adquire o formato arredondado. As lacunas elétrons-transparentes estão presentes em quantidades bastante reduzidas e a camada de

microtúbulos, bem como as membranas adjacentes encontram-se ausentes. As características observadas nos estádios finais da diferenciação das espermatídes, por sua vez, são as mesmas encontradas para as demais espécies de Brachycera já descritas e, no que diz respeito à condensação da cromatina e ao formato nuclear, assemelham-se ao encontrado na maioria dos insetos.

Na região de transição núcleo-flagelo em *C. megacephala* observou-se uma considerável extensão de sobreposição entre o núcleo e o axonema (zona de “overlap”). Aspecto similar foi observado no espermatozóide de *Megaselia scalaris* Loew (Curtis *et al.* 1989), característica que, segundo o autor, poderia distinguir esta espécie dos demais Diptera.

A organização ultra-estrutural do adjunto do centríolo de *C. megacephala* parece ser a mesma descrita por Quagio-Grassiotto (1983, 1993); Báó (1987); Lino-Neto (1993); Messias JR. (1990) e ainda, por Phillips (1970) e Baccetti (1972), para muitas outras espécies de insetos. Esta estrutura em insetos é composta por ribonucleoproteínas e proteínas (Yasuzumi *et al.*, 1970; Taffarel e Esponda 1980) que, como sugerido por alguns autores, teriam sua origem dentro do núcleo e se moveriam através dos poros nucleares nos estádios iniciais de diferenciação das espermatídes (Quagio-Grassiotto & De Lello, 1995). A descontinuidade no envólucro nuclear observada em *Sarcophaga bullata* (Warner, 1971), em *Coelopa frigida* (Schrankel e Schwalm, 1974), e em *Ceratitis capitata* (Quagio-Grassiotto, 1983; Báó, 1987) facilitaria a passagem de tais proteínas entre o núcleo e o adjunto do centríolo. Resultados semelhantes foram observados por Chawanji *et al.* (2005, 2007) para algumas espécies de cicadas (Hemiptera).

A função do adjunto do centríolo é discutida. Conforme já descrito por Quagio-Grassiotto (1983), a função mecânica atribuída ao adjunto do centríolo pelos autores Cantacuzéne (1970), Baccetti (1972) Baccetti *et al.*, (1973), não parece ser a mais provável, pois apesar do adjunto do centríolo ser uma estrutura comum às espermatídes dos insetos, não é uma constante nos espermatozóides desses animais (Phillips, 1970; Baccetti, 1972). Sendo assim, a função mecânica estaria restrita aos estádios iniciais de desenvolvimento desta célula. A função de um possível papel nutritivo atribuído ao adjunto do centríolo, descrita por Yasuzumi *et al.* (1970), ainda parece-nos a mais viável, uma vez que as transformações estruturais que acontecem em tal organela mantêm uma relação inversa com o desenvolvimento do axonema.

Como documentado para as ordens mais evoluídas dos insetos (Phillips, 1970; Baccetti, 1972), os derivados mitocondriais presentes em *C. megacephala*, são em número de dois, apresentam igual diâmetro e um deles estende-se por quase todo o comprimento do espermatozóide, enquanto o outro se apresenta um pouco mais curto. São originados da fusão e re-estruturação das mitocôndrias existentes nas espermátides iniciais. Ao longo do processo de espermiogênese ocorre uma reacomodação das cristas mitocondriais e deposição de material elétron-denso em arranjo paracristalino no interior dos derivados. As mudanças sofridas por essa organela durante o processo de espermiogênese parecem possuir características espécie-específicas (Baccetti, 1972; Rosati *et al.*, 1976; Quagio-Grassiotto, 1993), uma vez que, consideráveis variações no formato e no tamanho dos derivados mitocondriais e das estruturas paracristalinas, são observadas.

No espermatozóide de *C. megacephala* o material paracristalino apresenta padrão bastante homogêneo e ocupa quase todo o interior dos derivados, similar ao descrito para *Dermatobia hominis* (Quagio-Grassiotto, 1993). Entretanto, padrão assimétrico nos derivados mitocondriais foi observado em *Ramphomya* sp (Dallai & Afzelius, 1990) e também em *Musca domestica* (Gassner *et al.*, 1972), na qual a assimetria verificada, em secção longitudinal, é considerada bastante acentuada em relação às demais espécies (76 µm – 226 µm).

O axonema dos espermatozóides de *C. megacephala* está organizado com o padrão clássico de dois microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (9+9+2), padrão considerado uniforme para os representantes da infra-ordem Brachycera (Dallai *et al.*, 1993a; Jamieson *et al.*, 1999). Esse padrão também se encontra descrito para a grande maioria dos espermatozóides de insetos (Baccetti, 1972; Quagio-Grassiotto, 1983, 1993; Báó, 1987; Messias JR., 1990).

Embora o padrão de dois microtúbulos centrais esteja presente na maioria dos insetos, inclusive em Diptera, na infra-ordem Nematocera, onde tal padrão também pode ser observado, variações consideráveis são encontradas, como por exemplo, as que ocorrem em *Culex quinquefasciatus* (Báó & De Souza, 1993), *Culex pipiens* e *Bibio* sp (Dallai *et al.*, 1993a) onde apenas um microtúbulo central em forma de bastão foi observado; em *Dicerura dentata* (Dallai *et al.*, 1996a) três microtúbulos centrais foram encontrados; e em *Heterogenela* sp (Dallai *et al.*, 1996b) observou-se que os microtúbulo centrais estavam ausentes. Arranjos completamente bizarros

também podem ser encontrados, como é o caso de *Asphondylia ruebensaameni* (Cecidomyiidae), onde o número de duplas de microtúbulos presentes no axonema pode exceder 2.000 (Lanzavecchia *et al.*, 1991).

Nas espermatídes mais jovens de *C. megacephala* a organização do axonema tem início a partir de um centríolo, e seu crescimento inicial ocorre no interior de uma vesícula até a mesma se fundir com a membrana plasmática, o que ocorre nos estádios de alongamento das espermatídes. Processo semelhante foi observado por Quagio-Grassiotto (1993) em *Dermatobia hominis*.

Na ordem Diptera, mais especificamente em Brachycera, o número de protofilamentos encontrados na parede dos microtúbulos acessórios apresenta certa uniformidade, 13 protofilamentos. Entretanto, em Nematocera, quando os microtúbulos acessórios encontram-se presentes, o padrão observado é de 13, 15 ou 16 protofilamentos. A falta de uniformidade encontrada em Nematocera pode estar refletindo as variações que são observadas em seu axonema. Uma vez que a diversidade nas estruturas axonemais encontra-se relacionada com a posição sistemática do animal, os dados obtidos de investigações desta natureza constituem uma importante ferramenta no estudo da taxonomia e filogenia dos grupos (Dallai & Afzelius, 1995). Em *C. megacephala*, investigações a cerca do número de protofilamentos existentes na parede dos túbulos acessórios ainda estão sendo conduzidas.

Relações espaciais aparentemente precisas parecem existir entre os elementos do axonema e os derivados mitocondriais. Análises feitas por Tokuyasu (1974) em *Drosophila melanogaster*, relacionando o axonema e os derivados mitocondriais demonstraram que relações angulares existem entre estas duas estruturas, sugerindo que o axonema apresenta certo grau de liberdade de rotação em relação aos derivados mitocondriais. Messias JR. (1990) estabeleceu esse mesmo raciocínio ao analisar o flagelo de *C. megacephala* e, ao observar o posicionamento dos derivados mitocondriais concluiu que cada uma das duplas de túbulos 2 e 4 encontram-se geralmente voltadas para um dos derivados mitocondriais. Os dados obtidos neste estudo confirmam os resultados obtidos por Messias JR. (1990), inclusive nos espermatozóides armazenados na espermateca.

Nenhuma alteração com relação ao comprimento dos espermatozóides ou mesmo variações morfológicas nas estruturas de tais células foi encontrada, quando da comparação entre os espermatozóides obtidos do testículo do macho e das

espermatecas das fêmeas em *C. megacephala*. Resultados semelhantes foram obtidos por Quagio-Grassiotto & Dolder (1985) e por Bão (1987), em *Ceratitis capitata* – tipo selvagem, e para o mutante “olho-róseo”, respectivamente. Entretanto resultado diferente é discutido por Ndiaye *et al.* (1997), os quais consideram o interior da espermateca da fêmea um lugar onde pode estar ocorrendo as maiores modificações dos espermatozoides nos mosquitos.

Segundo Simmons (2001), em algumas espécies os espermatozoides são relativamente curtos, enquanto em outras, eles podem chegar a gigantescas proporções. A imensa variação encontrada no comprimento dos espermatozoides do gênero *Drosophila* é maior do que a encontrada combinadamente em qualquer outra taxa (Joly *et al.*, 1991). O espermatozoide de *Drosophila pseudoobscura* mede apenas 0,3mm de comprimento (Jamieson *et al.*, 1999), enquanto em *Drosophila bifurca* os 58mm de comprimento do espermatozoide corresponde a 35 vezes o tamanho do macho que o produz (Pitnick *et al.*, 1995).

Pitnick *et al.* (2001) realizaram experimentos em *Drosophila melanogaster* removendo experimentalmente a competição espermática através de monogamia imposta cujos resultados corroboraram os anteriormente obtidos através das observações feitas por Parker (1982), o qual havia concluído que na ausência de competição espermática ocorre um aumento no tamanho do espermatozoide, sendo esta situação favorecida em função do decréscimo no número total destas células.

5.4 Análise Citoquímica – E-PTA (Ácido Etanólico Fosfotúngstico)

O tratamento pelo ácido etanólico-fosfotúngstico (E-PTA) tem sido utilizado no estudo de espermátides em invertebrados (Bão, 1996; Lino-Neto *et al.*, 1999, 2000; Zama, 2003; Conte, 2004; Zama *et al.*, 2005, 2007) e também em vertebrados (Ferreira & Dolder, 2003 a,b).

Em *Chrysomya megacephala* os resultados obtidos na análise citoquímica por E-PTA demonstraram que proteínas básicas encontram-se presentes em baixas concentrações nas espermátides em estádios iniciais de desenvolvimento, onde a cromatina encontra-se menos compactada, e em altas concentrações nos espermatozoides. Resultado semelhante foi observado por Conte (2004) em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae).

Na região de transição núcleo-flagelo, o adjunto do centríolo apresentou reação E-PTA positiva em espermatozóides de *C. megacephala*, e não foram feitas observações em espermátides em diferenciação. A análise feita por Conte (2004) em um representante da ordem Hymenoptera, revelou que o adjunto do centríolo apresentava-se E-PTA positivo durante os estádios iniciais da espermiogênese, enquanto observações feitas por Zama *et al.* (2004) demonstraram que a estrutura em questão não se apresentou marcada.

Na região flagelar, os resultados decorrentes de análises feitas em *C. megacephala* demonstraram que os derivados mitocondriais apresentam-se marcados ou não por E-PTA; no axonema, a dupla de microtúbulos centrais, a dupla de microtúbulos periféricos, os microtúbulos acessórios e as fibras densas apresentaram reação positiva para E-PTA. Nos resultados obtidos anteriormente por Bão (1996) para *Coelomera lanio*, por Zama *et al.* (2007) e por Conte (2004) para representantes de Hymenoptera, foram observadas variações na resposta das estruturas flagelares ao E-PTA. Com estes resultados pode ser levantada a hipótese de que a quantidade e a organização de proteínas básicas nas estruturas flagelares, detectadas pelo uso da técnica do E-PTA possa trazer informações específicas e vir a serem utilizadas para estudos taxonômicos e filogenéticos.

6. CONCLUSÕES

Embora os aspectos morfológicos encontrados nas células germinativas de *Chrysomya megacephala* assemelhem-se aos já descritos em outros insetos, destacamos aqui algumas características importantes e bastante peculiares:

– A morfologia dos órgãos reprodutores em *C. megacephala* revelou detalhes importantes sobre o processo reprodutivo da espécie. No caso dos espécimes machos, destacam-se as observações a cerca da diferenciação dos cistos de espermátides em cada uma das regiões do testículo. Nas fêmeas, destaca-se a importância das células secretoras na manutenção da viabilidade dos espermatozóides armazenados.

– Em *C. megacephala* o espermatozóide possui, aproximadamente 590µm de comprimento total, sendo formado pelo acrossoma; núcleo; zona de “overlap”; dois derivados mitocondriais preenchidos por material paracristalino; e um axonema, formado por 2 microtúbulos centrais, 9 microtúbulos periféricos e 9 microtúbulos acessórios intercalados por fibras densas. Ainda, nenhuma alteração em relação ao seu comprimento ou morfologia foi observada quando comparadas as células presentes nos testículos com as encontradas nas espermatecas.

– Na região de transição núcleo-flagelo, as características encontradas na zona de “overlap”, representadas pela grande extensão de sobreposição entre o núcleo e o axonema, assim como, a região de “peg” onde ocorre a inserção do axonema no núcleo, são bastante incomuns, tendo sido descritas somente para uma espécie de Brachycera;

– A compactação da cromatina nas espermátides em diferenciação em *C. megacephala* foi observada com maior frequência nos estádios intermediários, período considerado tardio, quando comparado com os demais dípteros e também com outros insetos;

– A técnica do ácido etanólico-fosfotúngstico (E-PTA) revelou a presença de proteínas básicas em todas as organelas presentes no espermatozóide, característica comumente não encontrada em outros grupos. Com estes resultados, reiteramos a

hipótese de que a quantidade e a organização de proteínas básicas nas estruturas flagelares, detectadas pelo uso da técnica do E-PTA possa fornecer informações específicas e vir a serem utilizadas para estudos taxonômicos e filogenéticos.

– O espermatozóide da espécie em estudo (*C. megacephala*) não apresentou diferenças marcantes em relação aos demais Brachycera, exceto pelos aspectos observados na região de transição núcleo-flagelo. Uma vez que na família Calliphoridae, apenas *Calliphora vomitoria* teve a ultra-estrutura do espermatozóide (região flagelar) descrita até o momento, acreditamos serem necessários estudos de um número mais abrangente de espécies para que as análises taxonômicas e filogenéticas possam ser realizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, D.S.; SILVA, V.C. & BALBI, M.I.P.A. (2002). Estado do conhecimento dos Diptera Neotropicais. *In*: COSTA, C.; VANIN, S.A.; LOBO, J.M. & MELIC, A. **Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática. SEA, Zaragoza. 2: 29-36.**
- ANDERSON, W.A. (1967). Cytodifferentiation of spermatozoa in *Drosophila melanogaster*: the effect of elevated temperature on spermiogenesis. **Molecular & General Genetics, 99** (3): 257 – 273.
- ANDERSON, W.A. & PERSONNE, P. (1973). The form and function of spermatozoa: a comparative view. *In*: AFZELIUS, B. A. **The functional anatomy of the spermatozoon.** Oxford: Pergamon Press, p. 3-14.
- AVANCINI, R.M.P & PRADO, A.P. (1986). Oogenesis in *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). **International Journal Insect Morphology & Embryology, 15** (5/6): 375 – 384.
- BACCETTI, B. (1970). The spermatozoon of Arthropoda. IX. The sperm cell as an index of Arthropod phylogenesis. **In**: ---- (ed.) Comparative Spermatology. Rome: Accademia Nazionale dei Lincei. p. 169-181.
- BACCETTI, B. (1972). Insect Sperm Cell. **Advances in Insect Physiology, 9**: 315-397.
- BACCETTI, B. (1986). Evolutionary trends in sperm structure. **Comparative Biochemistry Physiology, v. 85** (A), p. 29-36.
- BACCETTI, B. & AFZELIUS, B.A. (1976). The biology of the sperm cell. Basel, New York, Karger, 254p.
- BACCETTI, B. & BAIRATI, A. JR. (1964). Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera), **Redia, 49**: 1-29.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E. & ROSAT, F. (1971). The spermatozoon of Arthropoda. XIII. The cell surface. **Journal of Ultrastructure Research, 35**: 582 – 605.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A.G.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; PERITI, P.; PIANTELLI, F.; ROSATI, F. & SELMI, G. (1973). Structure and function in the spermatozoon of *Baccillus rossius*. XIX. The spermatozoon of Arthropoda. **Journal of Ultrastructure Research, 44** (suppl. 12): 1 – 73.

- BACCETTI, B.; DALLAI, R.; PALLINI, V.; ROSATI, F. & AFZELIUS, B.A. (1977). Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. **Journal of Cell Biology**, **73**: 594-600.
- BAIRATI, A. (1967). Struttura ed ultrastruttura dell' apparato genitale maschile di *Drosophila melanogaster* Meig. I. Il testicolo. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Viena, Austria)**, **76**: 56-99.
- BÁO, S.N. (1987) Estudo ultra-estrutural da espermiogênese no mutante “olho-róseo” comparativo a linhagem selvagem de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera: Tephritidae). Campinas. 94 p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas.
- BÁO, S.N. (1992) Aspectos ultra-estruturais e citoquímicos na diferenciação das espermátides do mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Rio de Janeiro. 71 p. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- BÁO, S.N. (1996). Spermiogenesis in *Coelomera lanio* (Chrysomelidae: Gallerucinae): ultrastructural and cytochemical studies. *In*: JOLIVET, P.H.A. & COX, M.L. **Chrysomelidae Biology**, General Studies. v.3, p. 119-132.
- BÁO, S.N & DE SOUZA, W. (1992). Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Biocell**, **75**: 37-44
- BÁO, S.N & DE SOUZA, W. (1993). Ultrastructural and cytochemical studies of the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, **25** (2): 213 – 222.
- BÁO, S.N. & DOLDER, H. (1990). Ultrastructural localization of acid phosphatase in spermatid cells of *Ceratitis capitata* (Diptera). **Histochemistry**, **93**: 439-442.
- BÁO, S.N. & DOLDER, H. (1991a). Testicular organization in adult *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): RA mutant and Wild-type lineages. **Revista Brasileira de Biologia**, **51** (2): 313-319.
- BÁO, S.N. & DOLDER, H. (1991b). Abnormal characteristics observed in spermatid cell during spermiogenesis in the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Genética**, **14** (2): 287-297.
- BÁO, S.N.; DOLDER, H. (1998). Ultrastructural study of the spermatheca of the fruitfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. v15. n.2 jul/dez. Pp. 225 – 230.

- BÁO, S.N.; KITAJIMA, E.W.; CALLAINI, G.; LUPETTI, P. & DALLAI, R. (1997). Spermiogenesis in three species of whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Acta Zoologica**, **78**: 163-170.
- BÁO, S.N.; QUARGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, H. (1989). Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Cytobios**, **58**: 93-100.
- BLOCH, D.P. (1969). A catalog of sperm histones. **Genetics**, **61**: 93 – 111.
- BORROR, D.J. & DELONG'S, D.M. (2005). **Introduction to the study of insects**. 7th Edition. Thomson Brooks/Cole. USA. 864p.
- CANTACUZÉNE, A.M. (1970). L' annexe centriolare du spermatozóide des insects. *In*: BACCETTI, B. **Comparative spermatology**. Academic, London, p. 554-564.
- CARVALHO, C.J.B. & RIBEIRO, P.B. (2000). Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, **9** (2): 169-173.
- CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, A.; EQUIHUA-MARTÍNEZ, A.; VALDÉS-CARRASCO, A.; BARRIENTOS-PRIEGO, A. F.; ISH-AM, G. & GRAZIT, S. (1999). Insectos polinizadores del aguacatero em los estados de México y Michoacán. **Revista Chapingo, Serie Horticultura** **5**: 129-136.
- CATTS, E.P. & GOFF, M.L. (1992). Forensic Entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, **37**: 253-272.
- CHAWANJI, A.S.; HODGSON, A.N. & VILLET, M.H. (2005). Sperm morphology in four species of African platypleurine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). **Tissue and Cell**, **37**: 257 – 267.
- CHAWANJI, A.S.; HODGSON, A.N.; VILLET, M.H.; SANBORN, A.F. & PHILLIPS, P.K. (2007). Spermiogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). **Acta Zoologica** (Stockholm), **88**: 337 – 348.
- CONTE, M. (2004). Caracterização estrutural e ultra-estrutural da espermatogênese de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). Campinas, 59 p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas.
- CRUZ-LANDIM, C. (1979). Aspectos ultraestruturais da espermiogênese de *Myogryllus* sp. (Orthoptera: Gryllidae). **Revista Brasileira de Biologia**, **39**: 783 – 791.
- CRUZ-LANDIM, C. (2001). Organization of the cyst in bee (Hymenoptera: Apidae) Testis: Number of spermatozoa per cyst. **Iheringia. Série Zoologia**. Porto Alegre, **91**: 183 – 189.

- CURCUPINO, M.; PROFILI, G.; KATHIRITAMBY, J. & MAZZINI, M. (1995). Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, **166**: 291-296.
- CURTIS, S. K.; BENNER, D. B. & MUSIL, G. (1989). Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). **Journal of Morphology**, **200**: 47-61.
- DALLAI, R. (1975). Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v.21. p. 89 – 109.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. (1982). On zipper-lines or particle arrays within the plasma membrane of hemipteran spermatozoa (Heteroptera: Insecta). **Journal of Ultrastructure Research**, **80**: 197-205.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. (1990). Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. **Journal of Structural Biology**, **103**: 164-179.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. (1991). Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritide) and *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae) (Diptera). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **20**: 215-222.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. (1995). Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. *In*: JAMIESON, B.G.M.; AUSIO, J. & JUSTINE, J.-L. (EDS), Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, **166**: 301 – 310. Paris ISBN: 2-85653-225-X.
- DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. & MAMAIEV, B. (1996b). Flagellar axonemes with 10 microtubular doublets in spermatozoa from gall-midges (Diptera: Cecidomyiidae). **Acta Zoologica** (Stockholm), **77**: 153 – 160.
- DALLAI, R.; BACCETTI, B.; MAZZINI, M. & SABATINELLI, G. (1984). The spermatozoon of three species of *Phlebotomus* (Phlebotominae) and the acrosomal evolution in nematoceran dipterans. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **13**: 1 – 10.
- DALLAI, R.; BELLON, P.L.; LANZAVECCHIA, S. & AFZELIUS, B.A. (1993a). The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. **Zoologica Scripta**, **22**: 193-202.

- DALLAI, R.; CARAPELLI, A.; NARDI, F.; FANCIULLI, P.P.; LUPETTI, P.; AFZELIUS, B.A. & FRATI, F. (2004). Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae: Zygentoma: Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in Zygentoma. **Tissue and Cell**, **36**: 233 – 244.
- DALLAI, R.; LUPETTI, P.; CARAPELLI, A.; FRATI, F. & AFZELIUS, B.A. (2002). Sperm structure and spermiogenesis in *Atelura formicaria* Heyden (Zygentoma: Insecta). **Acta Zoologica** (Stockholm), **83**: 245 – 262.
- DALLAI, R.; LUPETTI, P.; FRATI, F.; AFZELIUS, B.A. & MAMAIEV, B.M. (1996a). Characteristics of sperm ultrastructure in the gall midges Porricondylinae (Insecta: Diptera: Cecidomyiidae) with phylogenetic considerations on the subfamily. **Zoomorphology**, **116**: 85 – 94.
- DALLAI, R.; LUPETTI, P.; FRATI, F.; NARDI, F. & AFZELIUS, B.A. (2001). Sperm ultrastructure and spermiogenesis in the relic species *Tricholepidion gertschi* Wygodzinsky (Insecta: Zygentoma). **Tissue and Cell**, **33**: 596 – 605.
- DALLAI, R.; MAZZINI, M. & LUPETTI, P. (1993b). The spermatozoa of *Contarinia*, *Allocontarinia*, *Lestodiplosis* and *Myricomya* (Diptera: Cecidomyiidae) with considerations on the systematic relationships within the group. **Boletino di Zoologia**, **60**: 7-18.
- D'ALMEIDA, J. M. & J. R. ALMEIDA. (1998). Nichos tróficos em dipteros caliptrados no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, **58**: 563-570.
- DODSON, G.N. (1978). Morphology of the reproductive system in *Anastrepha suspensa* (Loew) and notes on related species. **The Florida Entomologist**, **61**: 231 – 239.
- DUMSER, J. B. (1980). The regulation of spermatogenesis in Insects. **Annual Review of Entomology**, **25**: 241-369.
- DUSTIN, P. (1978). Nuclear and cytoplasmic shaping in spermatogenesis. *In*: DUSTIN, P. **Microtubules**, 1th Edition. Springer-verlag, Berlin-Heidelberg. Cap. 6, p. 232-241.
- FAWCETT, D.W.; ANDERSON, W.A. & PHILLIPS, D.M. (1971). Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. **Developmental Biology**, v. 26, p. 220 – 251.
- FERREIRA, A. & DOLDER, H. (2003a). Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia: Squamata). **Acta Histochemica**, **105** (4): 339-352.

- FERREIRA, A. & DOLDER, H. (2003b). Sperm ultrastructure and spermatogenesis in the lizard, *Tropidurus itambere*. **Biocell**, **27** (3): 353-362.
- FOWLER, K. (1973). Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila melanogaster*: Sperm transfer, sperm storage, and sperm utilisation. **Advances Genetics**, **17**: 293 – 360.
- FRANZÉN, A. (1970). Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. **In**: Baccetti, B. Comparative Spermatology. Rome: Accademia Nazionale dei Lincei, 1970. p. 13-28.
- FRITZ, A.II. (2002). A single, abdominal ganglion in *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) and its innervation of the female sperm storage organs. **Morphology Histology and Fine Structure**, pp. 103 – 108.
- FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C.; HARSÍ, C.M.; BURALLI, G.M. & ISHIHATA, G.K. (1984). Microorganismos enteropatógenicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revista de Microbiologia**, **15**: 170-174.
- GASSNER, G. (1970). Studies on the housefly centriole adjunct. **Journal of Cell Biology**, **47**: 69a.
- GASSNER, G.; KLEMETSON, D.J. & RICHARD, R.D. (1972). Spermiogenesis in the housefly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): a transmission electron microscope study. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **1**: 105-120.
- GREGORY, G.E. (1965). The formation and fate of the spermatophore in the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and Fairmaire. **Transactions Royal Entomological Society London**, **117**: 33 – 66.
- GUIMARÃES, J.H. & PAPAVERO, N. (1999). **Miíasis in man and animals in Neotropical region**. São Paulo. Editora Pleiade/FAPESP. 308p.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A.P. & BURALLI, G.M. (1979). Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, **23**(4): 245-255.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A.P. & LINHARES, X. (1978). Three newly introduced blowfly species in southern Brazil, (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, **22** (1): 53-60.

- HARWOOD, R.F. (1988). Insect structure and function. *In*: PFADT, R. E. **Fundamentals of Applied Entomology**. 4th edition. McMillan, New York. Cap. 2.
- HELLRIEGEL, B. & BERNASCONI, G. (2000). Female-mediated differential sperm storage in a fly with complex spermathecae, *Scatophaga stercoraria*. **Animal Behaviour**, **59**: 311 – 317.
- HELLRIEGEL, B. & WARD, P.I. (1998). Complex female reproductive tract morphology: its possible use in postcopulatory female choice. **Journal of Theoretical Biology**, **190**: 179 – 186.
- HUEBNER, E. (1980). Spermathecal ultrastructure of the insect *Rhodnius prolixus* Stal. **Journal of Morphology**, v. 166. p. 1 – 25.
- JAMES, M.T. (1970). 102 – Family Calliphoridae. *In*: **A Catalogue of the Diptera of the American South of the United States**. *Museu de Zoologia*, Universidade de São Paulo, 28pp.
- JAMIESON, B.G.M. (1987). Ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. **University Press, Cambridge**, 320p.
- JAMIESON, B.G.M.; DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. (1999). **Insects: their spermatozoa and phylogeny**. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers, Inc.
- JOLY, D.; BRESSAC, C.; DEVAUX, J. & LACHAISE, D. (1991). Sperm length diversity in *Drosophilidae*. **Drosophila Information Service**. **70**: 104 – 108.
- KIEFER, B.I. (1966). Ultrastruct abnormalities in developing sperm of X/0 *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, **54**: 144 – 152.
- LANZAVECCHIA, S.; DALLAI, R.; BELLON, P.L. & AFZELIUS, B.A. (1991). The sperm tail of a gall midge and its microtubular arrangement studied by two strategies of image analysis (Cecidomyiidae: Diptera: Insecta). **Journal of Structural Biology**. **107**: 65 – 75.
- LEE, W.-Y.; SUN, C.-Y. & TSAI, W.-S. (1975). The acrosome formation of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel. **Bulletin of the Institute of Zoology**, Academia Sinica (Taipei), **14**: 27-34.
- LINO-NETO, J. (1993). Estudo ultra-estrutural da espermiogênese e dos espermatozoides de *Comsopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). 62 p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas
- LINO-NETO, J.; BÁO, S.N. & DOLDER, H. (1999). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Bephratelloides pomorum* (Fabricius) (Hymenoptera:

- Eurytomidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **28**: 253 – 259.
- LINO-NETO, J.; BÃO, S.N. & DOLDER, H. (2000). Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trichogramma pretiosum* Riley and *Trichogramma atopovirilia* Oatman and Platner (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Zoologica** (Stockholm), **81**: 205 – 211.
- LOPEZ, M.L. & DE SOUZA, W. (1991). Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. **Molecular Reproduction Development**, **28**: 158-168.
- MANCINI, K.C. (2003). Ultra-estrutura e citoquímica dos espermatozoides em *Euptoieta hegesia* (Insecta: Lepidoptera) ao longo dos tratos reprodutores masculino e feminino. Campinas, 199 p. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas.
- MELLO, R.P. (2003). Chave para identificação das formas adultas das espécies da Família Calliphoridae (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, **10** (2): 255-268.
- MESSIAS, JR. (1990). Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomya megacephala* FAB (Diptera: Calliphoridae). Campinas: UNICAMP, 1990. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas.
- NAME, K. P. O.; DOS REIS, G.P.S. & BÃO, S.N. (2007). An ultrastructural study of spermiogenesis in two species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biocell**, **31** (2): 229-236.
- NDIAYE, M. & MATTEI, X. (1992). Particularity of acrosome formation during spermiogenesis in two mosquitoes: *Toxorhynchites brevipalpis* and *Anopheles gambiae*. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, **24** (2): 269 – 272.
- NDIAYE, M.; MATTEI, X. & THIAW, O.T. (1996). Spermatogenesis in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, **28**: 375 – 384.
- NDIAYE, M.; MATTEI, X. & THIAW, O.T. (1997). Maturation of mosquito spermatozoa during their transit throughout the male and female reproductive systems. **Tissue & Cell**, **29** (6): 675 – 678.
- PAMILO, P. (1991) Lifespan of queens in the ant *Formica exsecta*. **Insect Society**, **38**: 111 – 120.

- PARKER, G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biology Review**, **45**: 525 – 567.
- PARKER, G.A. (1982). Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. **Journal of Theoretical Biology**, **96**: 281 – 294.
- PARKER, G.A.; SIMMONS, L.W. & KIRK, H. (1990). Analysing sperm competition data: Simple models for predicting mechanisms. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, **27**: 55 – 65.
- PHILLIPS, D.M. (1966). Substructure of flagellar tubules. **Journal of Cell Biology**, **31**: 635-638.
- PHILLIPS, D.M. (1970). Insect sperm: their structure and morphogenesis. **Journal of Cell Biology**, **44**: 243-277.
- PITNICK, S.; MILLER, G.T; REAGAN, J. & HOLLAND, B. (2001). Males evolutionary responses to experimental removal of sexual selection. **Proceedures Royal Society London**, **B**, **268**: 1071 – 1080.
- PITNICK, S.; SPICER, G.S. & MARKOW, T.A. (1995). How long is a giant sperm? **Nature**, **375**: 109.
- PRATT, S. (1970). Formation and differentiation of the Nebenkern in spermatids of hemipteran insects, *Murgantia iristrionia*. In: BACCETTI, B. **Comparative spermatology**. Academic Press, London, p. 301-310.
- QUAGIO-GRASSIOTTO. I. (1983). Citodiferenciação ultra-estrutural durante a espermiogênese normal de *Ceratis capitata* Weidmann (Diptera: Tephritidae). Campinas. 93 p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas.
- QUAGIO-GRASSIOTTO. I., DR. (1993). Espermatogênese em *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) aspectos ultra-estruturais. Botucatu/SP: UNESP. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Estadual de São Paulo.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DE LELLO, E. (1995). Occurrence of “nuages” and “lamellae anulata” during spermiogenesis in *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90**: 537 – 545.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, H. (1985). A ultra-estrutura do espermatozóide de *Ceratitis capitata* Weidmann (Diptera: Tephritidae). **Ciência e Cultura**, **37** (12): 2067-2071.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I. & LELLO, E. DE. (1996). Cytoplasmic bridges, intercellular junctions, and individualization of germ cells during spermatogenesis in

- Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Journal of Morphology**, **227**: 145-154.
- QUEIROZ, M. M. C. & MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M.V. (1991). Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, **8**: 75-84.
- ROSSATI, F.; SELMI, G. & MAZZINI, M. (1976). Comparative observations on the mitochondrial derivatives of insect sperm. **Journal of Submicroscopic Cytology**, **8**: 51-67.
- SCHRANKEL, K.R. & SCHWALM, F.E. (1974). Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. **Cell and Tissue Research**, **153**: 44-53.
- SCHRANKEL, K.R. & SCHWALM, F.E. (1975). Virus like particles in spermatids of *Coelopa frigida* (Diptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, **26**: 265-268.
- SHEWELL, G.E. (1987). Calliphoridae, pp. 1133-1145. *In*: J. F. MACALPINE; B. V. PETERSON; G. E. SHEWELL; TESKEY, J. R. VOCHEROT & D. M. WOOD (EDS). **Manual of Nearctic Diptera**. Vol. II. Agriculture Canada, Ottawa, i-vi: 675-1332.
- SIMMONS, L.W. (1986). Female choice in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). **Animal Behaviour**, **34**: 1463 – 1470.
- SIMMONS, L.W. (2001). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press Published by Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 434p.
- TAFFAREL, M. & ESPONDA, P. (1980). Fine structural cytochemistry of the centriolar adjunct in Grasshopper spermatids. **Mikroskope (Wien)**, **36**: 35 – 42.
- TOKUYASU, K. T. (1974). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. **Experimental Cell Reserach**, **84**: 239-250.
- TOKUYASU, K. T.; PEACOCK, W. J. & HARDY, R. W. (1972a). Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Viena, Austria)**, **124**: 479-506.
- TOKUYASU, K. T.; PEACOCK, W. J. & HARDY, R. W. (1972b) Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Viena, Austria)**, **127**: 492-525.

- TWIG, E. & YUVAL, B. (2005). Function of multiple sperm storage organs in female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, **51**: 67-74.
- VILLAVASO, E.J. (1975). The role of the spermathecal gland of the boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Journal of Insect Physiology**, **21**: 1275 – 1278.
- VIRKKI, N. (1969). Sperm bundles and phylogenesis. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Viena, Austria)**, **101**: 13-27.
- VIRKKI, N. (1973). Evolution of sperm cell number per bundle in insects. **Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (México)**. México, **20**: 23 – 54.
- WARD, P.I. (1993). Females influence sperm storage and use in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (L.). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, **32**: 313 – 319.
- WARD, P.I. (2000). Cryptic female choice in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (L.). **Evolution**, **54**: 1680 – 1686.
- WARNER, F.D. (1970). New observations on flagellar fine structure. The relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. **Journal of Cell Biology**, **47**: 159-182.
- WARNER, F.D. (1971). Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. **Journal of Ultrastructural Research**, **35**: 210-232.
- WELLS, J.D. & GREENBERG, B. (1992). Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomya macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bulletin of Entomology Research**, **82**: 133-137.
- WINTERTON, S.L.; MARRITT, D.J.; O'TOOLE, A.; YEATES, D.K. & IRWIN, M.E. (1999). Morphology and histology of the spermathecal sac, a novel structure in the female reproductive system of Therevidae (Diptera: Asiloidea). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, **28**: 273 – 279.
- YASUZUMI, G. (1974). Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. **International Review of Cytology**, **37**: 53-119.
- YASUZUMI, G.; SUGIOKA, T.; TSUBO, I.; YASUZUMI, F. & MATANO, Y. (1970). Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. XX. Relationship between chromatoid bodies and centriole adjunct in spermatids of Grasshopper, *Acrida lata*. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Viena, Austria)**, **110**: 231 – 242.

- YIN, W.; YANG, Y.; XUE, L. & DALLAI, R. (1985). A 13+0 axonemal pattern in the spermatozoon of *Neocondellum dalichotarsum* (Insecta: Protura). **Journal of Ultrastructure Research**, **93**: 179-185.
- YUVAL, B.; BLAY, S. & KASPI, R. (1996). Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, **89**: 486 – 492.
- ZAMA, U.S. (2003). Estudo estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides nas tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini (Hymenoptera: Apinae), com considerações filogenéticas. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas.
- ZAMA, U.; BRITO, P.; LINO-NETO, J.; CAMPOS, L.A.O.; DOLDER, H. & BÁO, S.N. (2005). The sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indicative of bees relation. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, **37** (3/4): 91 – 99.
- ZAMA, U.; LINO-NETO, J. & DOLDER, H. (2004). Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera: Apidae). **Tissue & Cell**, **36**: 29 – 41.
- ZAMA, U.; MOREIRA, J.; BÁO, S.N.; CAMPOS, L.A. DE O.; DOLDER, H. & LINO-NETO, J. (2007). Morphology of testicular and post-testicular spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo, 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. **Arthropod Structure & Development**, **36**: 304 – 316.