



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**MORFOLOGIA COMPARADA DO APARELHO REPRODUTOR
INTERNO MASCULINO E DOS ESPERMATOZÓIDES EM ESPÉCIES
NEOTROPICAIS DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA)**

KHESLLER PATRÍCIA OLÁZIA NAME

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Co-Orientador: Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz

BRASÍLIA, 2012

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

MORFOLOGIA COMPARADA DO APARELHO REPRODUTOR
INTERNO E DOS ESPERMATOZÓIDES EM ESPÉCIES
NEOTROPICAIS DE CALLIPHORIDAE (DIPTERA)

KHESLLER PATRÍCIA OLÁZIA NAME

Tese apresentada no Programa de Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Brasília, Fevereiro de 2012

Pesquisa realizada junto ao Programa de Pos Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, e desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Sônia Nair Bão (Departamento de Biologia Celular), e sob co-orientação do Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz (Departamento de Zoologia), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, com apoio financeiro das seguintes Agências Financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (Finatec), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), e Universidade de Brasília (UnB).

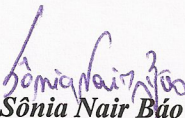
Tese de Doutorado


Khesler Patricia Olázia Name

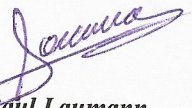
Título:

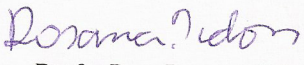
“Morfologia comparada do aparelho reprodutor interno e dos espermatozóides em espécies neotropicais de Calliphoridae (Diptera)”.

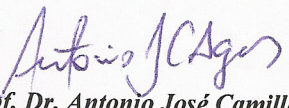
Comissão Examinadora:


Prof. Dra. Sônia Nair Bão
Presidente/Orientadora
UnB


Prof. Dra. Mary Anne Heidi Dolder
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
UNICAMP


Prof. Dr. Raúl Laumann
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa
EMBRAPA


Prof. Dra. Rosana Tidon
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa
UnB


Prof. Dr. Antonio José Camillo de Aguiar
Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa
UnB

Prof. Dra. Ivone Rezende Diniz
Membro Suplente
Interno Vinculado ao Programa
UnB

Brasília, 28 de fevereiro de 2012.

Ficha Catalográfica

Name, Khesller Patrícia Olázia

Morfologia comparada do aparelho reprodutor interno masculino e dos espermatozóides em espécies neotropicais de Calliphoridae (Diptera). / Khesler Patrícia Olázia Name. Brasília, DF. 2012. xiv + 167p: il. + anexos.

Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília. 2012.

Orientadora: Dra. Sônia Nair Bão. Co-Orientador: Dr. José Roberto Pujol-Luz.

Tese: Doutorado em Biologia Animal

1. Aparelho Reprodutor em Insetos. 2. Calliphoridae. 3. Espermatozóide de Insetos. 4. Lectinas. 5. Morfologia. 6. Ultraestrutura.

I – Universidade de Brasília (UnB)

II - Título

Título em Inglês: Comparative morphology of the male internal reproductive tract and of sperm in Neotropical species of Calliphoridae (Diptera).

Palavras Chave em inglês: Calliphoridae, Insect Sperm, Lectins, Morphology, Reproductive Apparatus in Insects, Ultrastructure.

Área de Concentração: Biologia Animal (Morfofisiologia Funcional), Microscopia.

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora: Professores: Mary Anne Heidi Dolder, Rosana Tidon, Raul Laumann, Antônio J. Camillo Aguiar.

Data da Defesa: 28/02/2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Animal, UnB.

“Talvez haja mais compreensão e beleza na vida quando os raios ofuscantes do sol forem suavizados pelos contornos da sombra. Talvez haja raízes mais profundas numa amizade que sofreu tempestades e as venceu. A experiência que nunca desaponta ou entristece, que nunca toca nos sentimentos é uma vivência neutra, com pequenos desafios e variações de cor. Quando sentimos confiança, fé e esperança de que podemos concretizar nossos objetivos, isto constrói dentro de nós, um manancial de força, coragem e segurança.” (Virginia M. Axiline)

"We live together, we act on, and react to, one another; but always and in all circumstances we are by ourselves. The martyrs go hand in hand into the arena; they are crucified alone. Embraced, the lovers desperately try to fuse their insulated ecstasies into a single self-transcendence; in vain. By its very nature every embodied spirit is doomed to suffer and enjoy in solitude. Sensations, feelings, insights, fancies - all these are private and, except through symbols and at second hand, incommunicable. We can pool information about experiences, but never the experiences themselves. From family to nation, every human is a society of island universes"

Aldous Huxley

Dedicatória

Ao meu filho Gustavo, minha metade, herdeiro dos meus melhores genes, pessoinha com quem compartilho metade do meu ser... Uma longa história que teve início na Província Árabe, no deserto do Saara, com os beduínos e tuaregues (povos destemidos, acostumados a todos os tipos de adversidades). Este é o legado que te deixo, “minha pequena metade”: a certeza de que a vida é uma longa batalha que pode ser coroada com muitas vitórias... EJA.

Agradecimentos

À Deus, pela vida e saúde!

À Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão, pela orientação, incentivo, amizade e também pelas broncas que me ajudaram evoluir no caminho do aprendizado. Professora, obrigada pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de trabalho e por toda sua paciência.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol-Luz pela ajuda incondicional, pelas explicações mesmo quando eu não estava entendendo “nada”, 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.

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

Aos amigos do Laboratório de Genética e Evolução UnB, pela amizade de todos e por terem me ajudado com a parceria de coletas e fotodocumentação.

À Profa. Martha Wolff pela amizade, e também pela ajuda com os espécimes colombianos. Martha, seu coração é muito generoso. Obrigada por termos compartilhado tantos momentos bons.

À Juliana pela presença amiga nos finais de semana tristes e intermináveis... Amiga, nunca vou me esquecer do seu apoio, dedicação, carinho e amor. Obrigada por ter estado ao meu lado nos momentos impossíveis.

Especialmente ao Marcelo pela companhia, carinho, amor e principalmente por me mostrar que tudo em nossas vidas é mutável e passível de reconstrução. ETA.

À Suzane (Suzi) e Karine por ouvirem meus lamentos e me ajudarem como verdadeiros pilares quando mais me senti sozinha e desamparada. Amigas, sem o apoio de vocês, talvez não tivesse acontecido.

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 nunca faltou, “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

| | |
|---|------------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| INTRODUÇÃO GERAL | |
| 1.1. A Ordem Diptera | 1 |
| 1.2. O Aparelho Reprodutor Interno em machos de Calliphoridae | 4 |
| 1.3. Os Espermatozóides | 6 |
| 1.4. Aspectos Morfológicos dos Espermatozóides em Brachycera | 8 |
| 1.5. Avanços no estudo da morfologia comparada do aparelho reprodutor e dos espermatozoides de Calliphoridae no Brasil | 12 |
| 1.6. Justificativa | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 3. RESULTADOS | 20 |
| 3.1. Capítulo 1. Estrutura e ultraestrutura dos espermatozóides e espermio gênese em três espécies de <i>Lucilia</i> | 21 |
| 3.2. Capítulo 2. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos espermatozóides no gênero <i>Cochliomyia</i> | 61 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Capítulo 3. Análise citoquímica de carboidratos nas espermátides e nos espermatozóides de califorídeos Neotropicais | 87 |
| 3.4. Capítulo 4. Análise morfológica dos espermatozóides nas subfamílias Calliphorinae e Chrsomyinae | 114 |
| 4. CONCLUSÕES FINAIS | 140 |
| 5. PERSPECTIVAS FUTURAS | 144 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 154 |
| 7. ANEXOS | 167 |

RESUMO

Name, K.P.O. **Morfologia comparada do aparelho reprodutor interno masculino e dos espermatozoides em espécies neotropicais de Calliphoridae (Diptera).**

Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2012, 1--- p. Tese de Doutorado.

Dados morfológicos obtidos da análise do aparelho reprodutor interno e dos espermatozoides em invertebrados têm sido cada vez mais utilizados no sentido de fornecer soluções consistentes para uma melhor compreensão da história evolutiva dos grupos, uma vez que os dados morfológicos tradicionalmente utilizados não têm sido suficientes, no sentido de permitir tal compreensão. A família Calliphoridae é um exemplo do que foi dito anteriormente. Embora o conhecimento sobre essa família seja crucial para que se possa chegar ao entendimento da evolução dentro do grupo Oestroidea, até o presente momento, pouco se conhece sobre a morfologia interna de seus órgãos reprodutores e de seus espermatozoides. A presente tese avaliou a morfologia dos espermatozoides em doze espécies de califorídeos, sendo que oito destas espécies ocorrem no Brasil e três são espécies dos Andes Colombianos. Estruturalmente, o aparelho reprodutor interno masculino em Calliphoridae é formado por um par de testículos, ductos deferentes e glândulas acessórias, uma vesícula seminal e um ducto ejaculatório. A morfologia dos espermatozoides revelou a presença de polimorfismo relacionado ao comprimento dos espermatozoides. Os eventos da espermiogênese nas espécies analisadas são similares e seguem o padrão descrito para outros grupos de insetos, sendo a diferenciação caracterizada pela formação do acrossoma e do 'nebenkern', condensação do núcleo, alongamento celular incluindo desenvolvimento do flagelo e perda de citoplasma. A análise ultraestrutural revelou que o espermatozoide é formado por duas regiões -

da cabeça e do flagelo, sendo a zona intermediária entre essas duas, denominada zona de justaposição “overlap”. As organelas presentes na região da cabeça são o acrossoma e o núcleo, e na região do flagelo o axonema (9+9+2), os derivados mitocondriais e o adjunto do centríolo. Foi observado a presença de polimorfismo relacionado à morfologia nas organelas que formam o espermatozóide. Algumas espécies possuem dois derivados mitocondriais e outras apenas um derivado. O acrossoma nas três espécies do gênero *Lucilia* e nas duas espécies de *Hemilucilia* analisadas é cônico e volumoso, enquanto nas demais espécies é cônico e delgado. A marcação com ácido etanólico fosfotúngstico - EPTA mostrou-se diferente nas diferentes espécies analisadas. Foi avaliado ainda, o perfil de marcação de resíduos de carboidratos nas espermátides e nos espermatozóides das espécies presentes no Brasil, uma vez que tais moléculas são responsáveis, pelo reconhecimento e interação entre os gametas. O mapeamento dos carboidratos de superfície nos espermatozóides nos forneceu dados citoquímicos importantes que, aliados aos dados morfológicos já existentes, poderão ser úteis em estudos taxonômicos.

Palavras Chave: Aparelho Reprodutor em Insetos, Calliphoridae, Espermatozóide de Insetos, Lectinas, Morfologia, Ultraestrutura.

ABSTRACT

Name, K.P.O. **Comparative morphology of the male internal reproductive tract and of sperm in neotropical species of Calliphoridae (Diptera)**. Brasília, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, 2012, 164 p. Doctoral Thesis.

Morphological data obtained from the analysis of the internal reproductive tract and from sperm in invertebrates have been increasingly used to provide consistent solutions to understand more fully the evolutionary history of the groups, because the traditionally used morphological data have not been enough. The Calliphoridae family is an example of this lack. Although knowledge about this family is crucial to understanding evolution within the Oestroidea group, until now little is known about the internal morphology of its reproductive organs and its sperm. The current thesis evaluated the sperm morphology in 12 species of Calliphoridae, nine of which occur in Brazil and three in the Colombian Andes. Structurally, the male internal reproductive apparatus in Calliphoridae is formed by a pair of testicles, deferent ducts and accessory glands, a seminal vesicle and an ejaculatory duct. Sperm morphology revealed the presence of polymorphism related to their length. In the species studied, the spermatogenesis events are similar and follow the pattern described for other groups of insects, with differentiation being characterized by the formation of the acrosome and the “*nebenkern*”, condensation of the nucleus, cellular lengthening including flagellum development, and loss of cytoplasm. Ultrastructural analysis revealed that the sperm is made up of two regions – the head and the flagellum, with the intermediate zone between the two being denominated the overlap. The organelles present in the head region are the acrosome and the nucleus, and in the flagellum there is the axoneme (9+9+2), the mitochondrial derivatives and the centriolar adjunct. The presence of polymorphism was observed,

related to the morphology of the organelles that form the sperm. Some species possess two mitochondrial derivatives and others only one. The acrosome in the three species from the genus *Lucilia* and in the two species of *Hemilucilia* analyzed is conical and bulky, while in the other species it is conical and slender. Marking with ethanolic phosphotungstic acid (EPTA) was seen to be different for the various species analyzed. The profile of carbohydrate residue marking in the spermatids and sperm was also evaluated for the species present in Brazil, because these molecules are responsible for recognition and interaction among gametes. Mapping the surface carbohydrates in the sperm provided us with important cyto-chemical data which, together with the morphological data that already exist, may be useful in taxonomic studies.

Key Words: Calliphoridae, Insect Sperm, Lectins, Morphology, Reproductive Apparatus in Insects, Ultrastructure.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A Ordem Diptera

A ordem Diptera, representada pelas moscas e mosquitos, é considerada uma das quatro ordens megadiversas que constitui a classe Insecta, sendo também a melhor catalogada em todas as regiões biogeográficas (Fig. 1). Existem aproximadamente 153.000 espécies, sendo que para a região Neotropical, cerca de 31.000 já foram descritas (Evenhuis *et al.*, 2007). Os Calliphoridae são dípteros Cyclorrhapha, Calyptratae (Yeates & Wiegmann, 2005) e apresentam distribuição mundial. Algumas espécies dessa família são cosmopolitas, sendo conhecidas mais de 1.500 espécies ao redor do mundo (Pape *et al.*, 2011) (Fig. 2).

Nesta família concentra-se considerável número de espécies com hábitos saprófagos e necrobiontófagos. 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; Pujol-Luz *et al.*, 2006, 2008). Alguns representantes desta família encontram-se envolvidos na polinização de determinados tipos de plantas (Castañeda-Vildózola *et al.*, 1999), e são também utilizados em processos de terapia larval (bioterapia) onde larvas de algumas espécies de moscas, mantidas vivas de forma estéril, são utilizadas para promover o tratamento de diferentes tipos de lesões em tecido animal (Weil *et al.*, 1993; Varzim *et al.*, 2004; Marcondes, 2006).

Os califorídeos possuem importância médica, veterinária, sanitária e sócio-econômica. 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”. Podem ocorrer ainda pseudomiíases, que se caracterizam 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).

Rognes (1997) reconheceu 12 subfamílias em Calliphoridae, sendo que sete destas ocorrem na Região Neotropical (Whitworth 2010): Chrysomyinae, Calliphorinae, Luciliinae, Mesembrinelinae, Toxotarsinae, Polleniinae e Rhiniinae, sendo que as duas últimas não ocorrem no Brasil (Fig. 2) (James, 1970; Carvalho & Ribeiro 2000; Mello, 2003).

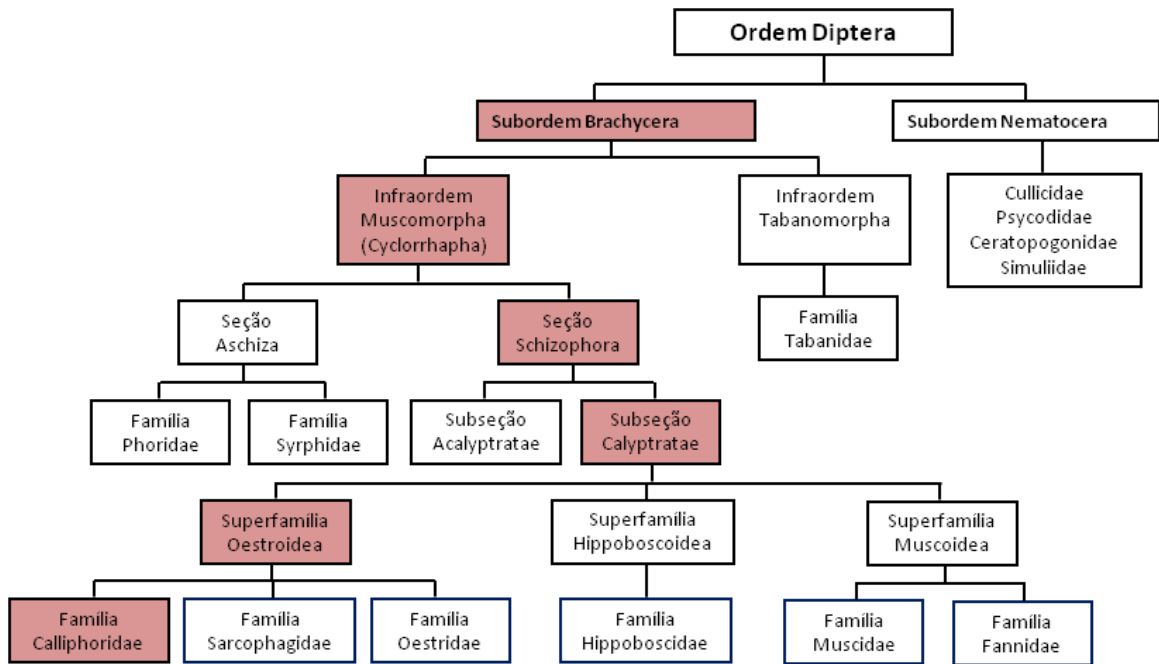


Figura 1. Representação esquemática da ordem Diptera, com ênfase na localização da família Calliphoridae (modificado de McAlpine, 1981)

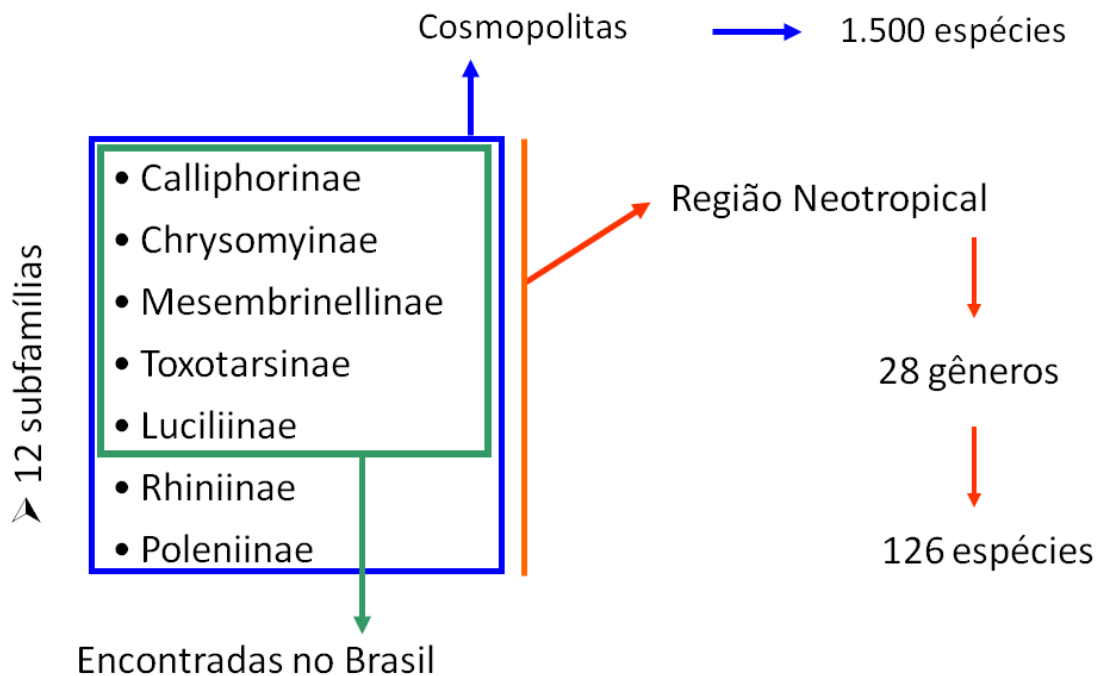


Figura 2. Representação esquemática da distribuição das espécies de Calliphoridae (Rognes, 1997; Amorim *et al.*, 2002; Mello 2003; Whitwoth, 2010; Pape *et al.*, 2011)

1.2. O Aparelho Reprodutor Interno em machos de Calliphoridae

Estudos envolvendo órgãos reprodutores internos em Diptera são escassos, com poucos estudos comparativos detalhados (Sinclair *et al.*, 2007). Aspectos morfológicos dos órgãos reprodutores internos nas espécies de Calliphoridae analisadas compreendem: dois testículos com ductos deferentes emparelhados e glândulas acessórias, uma vesícula seminal e um ducto ejaculatório. Tipicamente, cada um dos testículos se abre para um ducto deferente, se conectando a ele para chegarem à vesícula seminal. As glândulas acessórias estão diretamente conectadas à vesícula seminal e o ducto ejaculatório está localizado na porção final deste órgão, assemelhando-se ao descrito para a maioria dos Diptera (Sinclair *et al.*, 2007).

Na maioria das espécies de Diptera estudados, o testículo é considerado como sendo um órgão em forma de bolsa, subdividido em folículos, equivalente ao observado em outras ordens de insetos (Williamson, 1989). Entretanto, o número de cistos presentes no interior dos testículos varia consideravelmente entre os grupos. Em *Chrysomya megacephala* (Fig. 3A) (Name *et al.*, 2010) , um único folículo por testículo foi observado (Fig. 3D).

Em microscopia de luz, os testículos apresentam uma intensa e brilhante coloração marrom avermelhada e possuem a aparência reniforme (Figs. 3B-C). Em secções transversais observou-se que a parede do referido órgão é formada por duas camadas distintas: uma camada externa com grânulos de pigmentos e uma interna de tecido muscular (Fig. 3D). A organização das células germinativas no interior dos testículos mostra que o testículo é formado por um único e longo folículo, com vários cistos em diferentes fases da diferenciação (Fig. 3D).

Em *C. megacephala* as glândulas acessórias são tubulares e seu conteúdo possui aspecto leitoso (Fig. 3C) (Name *et al.*, 2010). Estudos prévios em *Drosophila melanogaster* (Wolfner, 1997; Heifetz *et al.*, 2001) demonstraram que as proteínas presentes nas glândulas acessórias dos machos induzem tanto a postura, quanto a progressão oogênica em fêmeas. A análise em microscopia confocal demonstrou que o espermatozóide em *C. megacephala* é longo e delgado, possuindo duas regiões distintas: cabeça e flagelo (Fig. 3E).

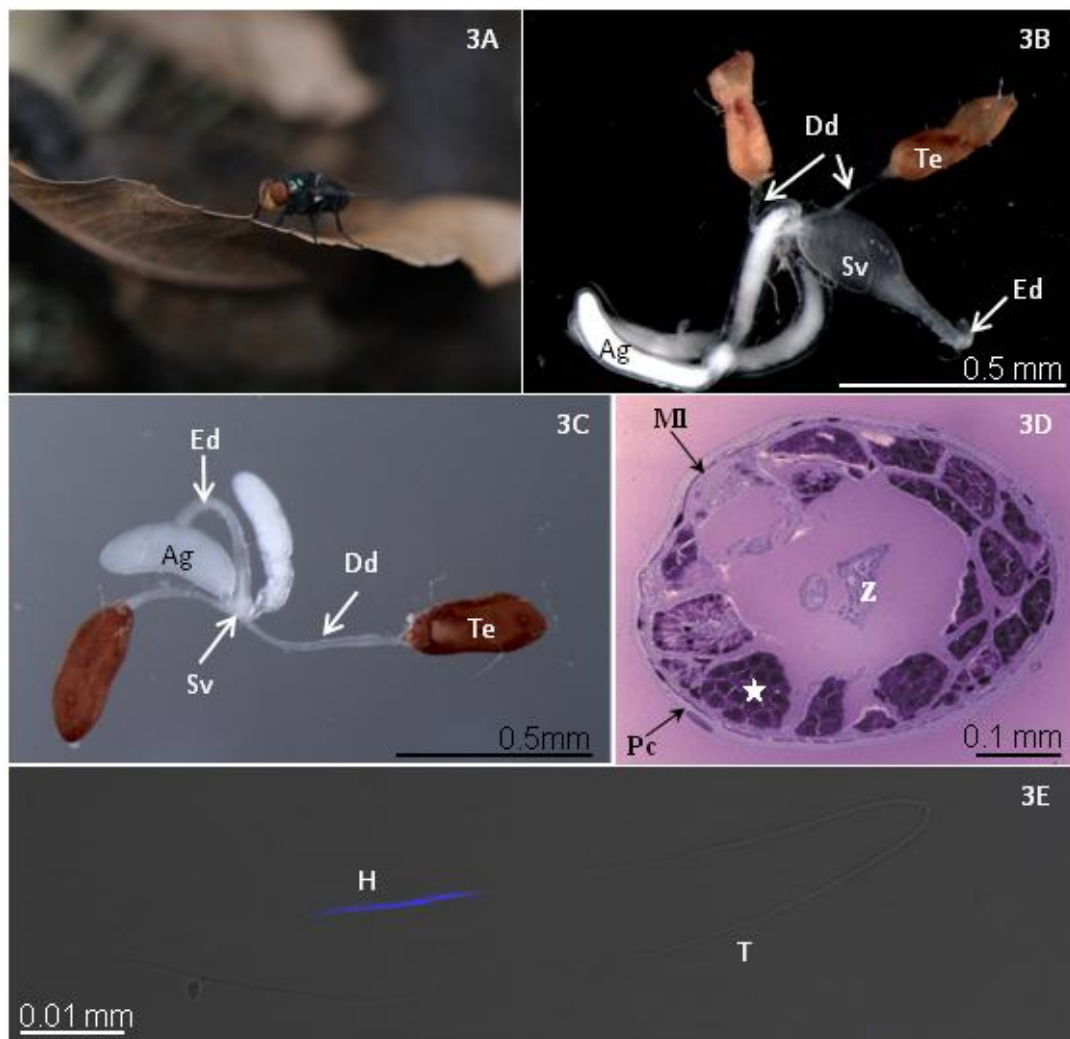


Figura 3. **A.** Fêmea adulta de *Chrysomya megacephala* (Foto: J.R. Pujol Luz). **B-C.** Aparelho reprodutor interno de machos de *Lucilia eximia* e *C. megacephala*, respectivamente. Ducto deferente (Dd), ducto ejaculatório (Ed), glândula acessória (Ag), testículos (Te), vesícula seminal (Sv). **D.** Secção transversal de testículo de *C. megacephala* em microscopia de luz. Cistos de espermátides (estrela), espermatozóides (Z), células pigmentadas (Pc), tecido muscular (MI). **E.** Espermatozóide de *C. megacephala* em microscopia confocal. Cabeça (H), flagelo (T).

1.3. Os espermatozóides

Os espermatozóides são células geralmente pequenas, compactas 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. 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).

Observações a cerca dos aspectos evolutivos dos espermatozóides 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 ultraestrutura 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 das relações filogenéticas. A especificidade da ultraestrutura dos espermatozóides foi inicialmente observada em mamíferos e subsequentemente confirmada para vários grupos de animais, inclusive insetos, justificando, assim, o uso destas células em estudos taxonômicos e filogenéticos (Dallai *et al.*, 1993; Carcupino *et al.*, 1995; Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Um trabalho de referência mundial no estudo da espermatologia, por apresentar uma ampla abordagem sobre a ultraestrutura do espermatozóide em insetos, bem

como uma revisão do grande número de ordens já estudadas, foi desenvolvido por Jamieson e colaboradores (1999).

Além dos aspectos estruturais, processos biológicos como interações intercelulares, transportes intracelulares e reações enzimáticas envolvem a participação de moléculas ricas em carboidratos, podendo as mesmas serem consideradas relevantes no estudo dos espermatozóides, em um enfoque taxonômico e filogenético. Embora muitas dessas funções e desses mecanismos não tenham sido completamente elucidadas, várias evidências têm sugerido que carboidratos são os marcadores primários para o reconhecimento celular. A superfície celular carrega uma cobertura de polissacarídeos na forma de moléculas de glicoproteínas e glicolipídeos (Sharon & Lis, 1993). No espermatozóide, carboidratos participam do processo de reconhecimento do ovócito da própria espécie (Koehler, 1978).

As lectinas, uma classe de proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune, que podem reconhecer resíduos de açúcar seletivamente, tem sido largamente usada como ferramenta para identificar, caracterizar e localizar moléculas contendo carboidratos (Roth, 1983). Estudos recentes têm mostrado que durante a espermatogênese ocorrem extensivas modificações nos glicoconjugados, que elas são expressas por diferenças nos padrões de marcações dos resíduos de açúcares detectados através do uso de lectinas; e ainda, que tais modificações diferem entre as espécies animais. O padrão de marcação por lectinas em testículos tem sido estudado em diferentes representantes de vertebrados (Calvo *et al.*, 2000; Pinart *et al.*, 2001; Ferreira & Dolder, 2003; Agungpriyono *et al.*, 2007). Por outro lado, poucos estudos analisaram a distribuição de carboidratos em espermatozóides de invertebrados (Perotti, 1986; Perotti & Riva, 1988; Báó & De Souza, 1992).

1.4. Aspectos morfológicos dos espermatozóides em Brachycera

A diversidade de estruturas nos espermatozóides de Diptera é maior do que em todos os outros grupos de insetos juntos. Embora na infra ordem Brachycera a ultraestrutura do espermatozóide possua poucas variações, grande parte da diversidade de estruturas ocorrem na infra ordem Nematocera, que também é a mais estudada (Jamieson *et al.*, 1999).

De acordo com Jamieson e colaboradores (1999) e até o presente momento são poucos os estudos estruturais e ultraestruturais com espermatozóides dentro da infra ordem Brachycera. Nas espécies que fazem parte da divisão Orthorrhapha eles são praticamente escassos e em algumas superfamílias da divisão Cyclorrhapha (Conopoidea, Micropiezoidea, Tanypezoidea, Opomyzoidea e Asteioidea), são inexistentes.

As informações disponíveis na literatura envolvendo a ultraestrutura de espermatozóides na divisão Cyclorrhapha restringem-se a 11 famílias – Tephritidae, Sepsidae, Sarcophagidae, Muscidae, Coelopidae, Drosophilidae, Phoridae, Scatophagidae, Calliphoridae, Gasterophilidae e Cuterebridae; e para a divisão Orthorrhapha, apenas 2 famílias - Empididae e Bombyliidae. À exceção de Tephritidae e Drosophilidae, as outras famílias possuem apenas uma espécie ou gênero relatado e nem sempre a ultraestrutura de todas as regiões do espermatozóide encontram-se descritas – em alguns casos, apenas regiões flagelares, por apresentarem uma diversidade maior de organelas, tiveram sua ultraestrutura analisada.

Na família Tephritidae, três espécies possuem a ultraestrutura 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 ultraestrutura 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 (Gassner, 1970; Gassner *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 espermatozoides 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 ultraestrutura do espermatozóide de *Megaselia scalaris* Loew foi descrita por Curtis e colaboradores (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 ultraestrutura do flagelo dos espermatozóides de *Scatophaga* sp. e *Ramphomyia* sp. Os derivados mitocondriais de *Scatophaga* sp. apresentam-se simétricos, enquanto em *Ramphomyia* sp. possuem tamanhos diferentes.

Na família Bombyliidae, *Bombylius* sp. foi descrito por Dallai e colaboradores (1993). 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 & Lello (1993). Os espermatozóides 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.

Nas famílias Calliphoridae e Gasterophilidae, Dallai e colaboradores (1993) descreveram a ultraestrutura da região flagelar dos espermatozóides de *Calliphora vomitoria* e *Gasterophilus intestinalis*, que apresentam, dois derivados mitocondriais de igual tamanho, separados por material elétron-denso e 13 protofilamentos nos microtúbulos acessórios.

Ainda na família Calliphoridae, Name e colaboradores (2010) publicaram uma descrição completa da ultraestrutura dos espermatozóides de *Chrysomya*

megacephala. *C. megacephala* possui acrossoma lateralmente inserido em uma indentação do núcleo, núcleo com cromatina completamente compactada, dois derivados mitocondriais preenchidos com material paracristalino, adjunto do centríolo e axonema com padrão de microtúbulos 9+9+2. Foi identificada, entre a região nuclear e a região flagelar, uma região de justaposição “overlap”, onde são observados, além do núcleo, todas as estruturas que formam o flagelo.

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.* 1993), padrão este também observado para a maioria dos insetos.

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

1.5. Avanços no estudo da morfologia comparada do aparelho reprodutor e dos espermatozóides de Calliphoridae no Brasil

Os dípteros Calliphoridae (moscas varejeiras) apresentam uma grande diversidade ecológica, ocupando diversos habitats – de matéria orgânica a tecidos animais em decomposição, distribuindo-se pelo mundo inteiro. São causadores de problemas de saúde e importantes perdas na indústria animal (Zumpt, 1965; Ghandour, 1988; David *et al.*, 2008).

Recentemente, estudos têm demonstrado que a estrutura e a ultraestrutura dos órgãos reprodutores internos e dos espermatozóides em insetos (Jamieson *et al.*, 1999) fornecem caracteres adicionais para análises taxonômicas e desta forma podem contribuir para o entendimento das relações de parentesco (Dallai *et al.*, 1993; Dallai & Afzelius, 1995; Carcupino *et al.*, 1995).

A diversidade nas estruturas do espermatozóide em Diptera é maior do que a encontrada em todos os outros grupos de insetos juntos. Enquanto a estrutura dos espermatozóides nos nematóceros é relativamente conhecida, no grupo dos braquíceros esses estudos são escassos. Na família Calliphoridae, somente *Calliphora vomitoria* foi brevemente descrita (Dallai & Afzelius, 1990). Todas as espécies de braquíceros descritas possuem um modelo comum de espermatozóide. Os espermatozóides em Brachycera são formados por um acrossoma apical sem camada extra-acrossomal, um núcleo compacto, derivados mitocondriais completamente preenchidos por material paracristalino e um axonema com arranjo 9+9+2 de microtúbulos (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

Com o objetivo de contribuir para o estudo da ultraestrutura dos espermatozóides de Calliphoridae, Name *et al.*, 2010 realizaram um estudo detalhado de morfologia da estrutura e ultraestrutura dos espermatozóide de *Chrysomya megacephala*. As estruturas foram descritas e ilustradas pela primeira vez, utilizando técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

Name *et al.* (2010) descreveram assim as estruturas e ultraestruras dos espermatozóides de *C. megacephala* (anexo 1): **(1)** Nos machos sexualmente maduros de *Chrysomya megacephala*, os espermatozóides são armazenados nos

testículos e na vesícula seminal. Nas fêmeas sexualmente maduras, essas células são armazenadas na espermateca após a cópula. **(2)** O sistema reprodutor interno nos machos de *C. megacephala* compreende os seguintes órgãos: dois testículos, ductos deferentes e glândulas acessórias, uma vesícula seminal e o ducto ejaculatório. Tipicamente, cada um dos testículos está ligado a um dos ductos deferentes, que vão se conectar à vesícula seminal. As glândulas acessórias estão diretamente ligadas à vesícula seminal e o ducto ejaculatório está localizado na porção final deste órgão. Os testículos nesta espécie possuem uma coloração marrom-avermelhada intensa e brilhante. A coloração é menos intensa quando o adulto emerge do pupário, e aumenta à medida que ele atinge sua maturidade sexual. A organização das células germinativas no interior dos testículos demonstra que tal estrutura é formada por um único e longo folículo com vários cistos em seu interior. **(3)** O testículo é formado por uma parede externa, que circunda as células germinativas. Essa parede é formada por uma bainha peritoneal, uma camada de músculos, uma membrana basal, um epitélio folicular, traquéias e um epitélio na base do folículo. O citoplasma da bainha peritoneal é rico em grânulos arredondados contendo pigmentos castanho-avermelhados, que conferem ao órgão, sua cor característica. Quando observados em microscopia eletrônica de transmissão, estes grânulos possuem diferentes tamanhos e elétrons densidade. **(4)** A diferenciação das espermatídes em *Chrysomya megacephala* ocorre dentro de cistos. Dentro de cada cisto as células espermáticas encontram-se perfeitamente alinhadas e no mesmo estágio de maturação. O número de espermatozoides por cisto é variável, mas é comum encontrar cistos com 128 células. **(5)** Os espermatozoides na espécie examinada são longos e filiformes, medindo cerca de 590 µm de comprimento total, incluindo as regiões da cabeça e da cauda. A região da cabeça mede

aproximadamente 60 μm de comprimento. **(6)** A região da cabeça do espermatozóide é formada por acrossoma e núcleo. O acrossoma é cônico, não possui camada extra-acrossomal, e sua eletrondensidade é moderada. Em secções longitudinais ele se encaixa em uma indentação lateral do núcleo, e em cortes transversais apresenta-se elíptico. **(7)** A estrutura do acrossoma pode ser dividida em duas regiões: proximal e distal. A região distal (rd), compreende cerca de 45% do comprimento total do acrossoma e localiza-se anteriormente ao núcleo, enquanto a região proximal (rp) encontra-se intimamente associada ao núcleo. **(8)** O núcleo em *Chrysomya megacephala* é longo, medindo cerca de 60 μm , quando incubado com DAPI e examinado por microscopia de epifluorescência. É fusiforme e apresenta cromatina uniformemente condensada. E quando submetido à metodologia do E-PTA, apresentou altas concentrações de proteínas básicas. Em secções transversais o formato do núcleo varia de circular a oval. Durante os últimos estágios da espermiogênese em *Chrysomya megacephala*, o núcleo apresenta cromatina completamente condensada. Microtúbulos e membranas acessórias estão presentes no citoplasma que circunda a região nuclear. **(9)** O núcleo e os componentes flagelares podem ser observados na região de justaposição (“overlap”) que pode ser caracterizada por quatro diferentes regiões. A primeira região é identificada em secções transversais e longitudinais, pela aparência indentada do núcleo, com origem dos componentes do flagelo. O axonema tem origem em uma pequena estrutura, que lembra um círculo de citoplasma (“peg”) completamente circundado pelo núcleo. **(10)** Nos estágios iniciais da espermiogênese, o centríolo pode ser visto em secção transversal, localizado na região da cabeça, em uma indentação do núcleo, circundado por material elétron denso, o adjunto do centríolo. No espermatozóide, esta região situa-se na porção apical do axonema, abaixo da

região de 'peg' (entre as regiões dois e três). O centríolo nesta espécie consiste em nove trincas. **(11)** A região subsequente é caracterizada pelo surgimento do axonema completo com o arranjo 9+9+2 de microtúbulos e de dois derivados mitocondriais, associados ao núcleo. Os derivados mitocondriais são posicionados lado a lado, e ventralmente em relação ao axonema. **(12)** No próximo segmento é possível observar todas as estruturas encontradas na região de justaposição ("overlap"): núcleo, axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo. O adjunto do centríolo é interpretado como sendo uma organela de suporte, centralmente localizada entre as outras organelas. **(13)** Nesta região o núcleo aparece em contato com os derivados mitocondriais e o adjunto do centríolo. O axonema é sempre encontrado no lado oposto ao núcleo. **(14)** No final da região de justaposição e início da região do flagelo, o núcleo diminui progressivamente de tamanho (diâmetro), e o adjunto do centríolo aumenta proporcionalmente em tamanho (diâmetro), ocupando completamente o lugar que antes era preenchido pelo núcleo. Na região do flagelo, a maior porção do adjunto do centríolo é observada abaixo do núcleo (em secção longitudinal) e aparece compacto e muito elétron-denso. **(15)** Os derivados mitocondriais são posicionados lado a lado, próximos à linha média e ventralmente ao axonema, e o material paracristalino ocupa praticamente todo o interior dos derivados, assemelhando-se a uma estrutura de favo de mel, em cortes transversais. Tal organela acompanha o axonema ao longo de seu comprimento e um deles se estende por quase todo o comprimento do espermatozóide, enquanto o outro é menor, terminado antes. Eles diferem em comprimento, mas não em diâmetro. **(16)** O axonema apresenta o arranjo típico de insetos, de 9+9+2 microtúbulos, sendo os túbulos acessórios intercalados por material elétron denso. São nove microtúbulos acessórios (localizados mais

externamente), nove duplas de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais. O final do axonema é marcado pela desmontagem dos microtúbulos. Nesta espécie, a dupla de microtúbulos periféricos termina primeiro, seguido pelos dois microtúbulos centrais e por último, observa-se o desaparecimento dos microtúbulos acessórios. (17) O adjunto do centríolo e todas as estruturas presentes no axonema apresentam-se marcados pela técnica do E-PTA. No entanto, os derivados mitocondriais às vezes são marcados pelo E-PTA.

Os resultados descritos anteriormente demonstraram que um estudo comparativo mais detalhado da estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides deste grupo de moscas e o reconhecimento, a seleção e a descrição de caracteres poderia ser utilizado na interpretação e teste das relações de parentesco postuladas para Calliphoridae (Rognes, 1997, Banashyr & Wells, 2010, Kutty et al., 2010).

1.6. Justificativa

Poucas espécies de dípteros Brachycera tiveram a estrutura e a ultraestrutura de suas células germinativas estudadas até o momento. Na família Calliphoridae, *Calliphora vomitoria* teve a morfologia da região do flagelo descrita por Dallai e colaboradores (1993), e descrições mais detalhadas sobre o aparelho reprodutor interno, a estrutura e ultraestrutura do espermatozóide em *Chrysomya megacephala* foram dadas por Name e colaboradores (2010). Por outro lado, ainda não foram desenvolvidos estudos que identifiquem a natureza química das moléculas presentes na membrana dos espermatozóides de califorídeos. Acredita-se que tais moléculas possam estar relacionadas com o reconhecimento espécie-específica dos gametas, bem como às reservas nutricionais da própria célula. Assim sendo, a

proposta deste trabalho foi ampliar e aprimorar os estudos em representantes de Calliphoridae, complementando as informações com dados relacionados à morfologia do aparelho reprodutor interno de machos, à espermiogênese, à estrutura e ultraestrutura dos espermatozoides, acrescentando dados citoquímicos que, somados aos demais, possam contribuir com caracteres que sejam expressivos para a taxonomia, bem como, para serem utilizados em análises filogenéticas deste grupo de Diptera.

Neste trabalho descreve-se a estrutura do aparelho reprodutor interno dos machos; analisa-se a estrutura, ultraestrutura e citoquímica de proteínas básicas e carboidratos em diferentes espécies de Calliphoridae, com vistas a encontrar homologias que possam auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e filogenéticos dentro deste grupo de insetos. Os resultados e conclusões são apresentados da seguinte forma: (i) capítulos compostos por artigos publicados, submetidos e em preparação nos quais são principalmente identificados e descritos os caracteres; (ii) conclusões finais, onde são discutidos os principais resultados; (iii) perspectivas futuras, onde é feita uma descrição e comparação dos caracteres postulados como relevantes para estudos taxonômicos e filogenético e (iv) anexos contendo os artigos publicados e/ou submetidos para publicação.

2. OBJETIVOS

A presente tese se insere em um programa geral de estudo da família Calliphoridae intitulada “Morfologia comparada do aparelho reprodutor interno masculino e dos espermatozóides em espécies Neotropicais de Calliphoridae”, cujo objetivo foi ampliar o conhecimento sobre a diversidade de estruturas presentes em Diptera. Este trabalho, em particular, contribuiu com obtenção de dados relacionados à morfologia do aparelho reprodutor interno dos machos, a espermiogênese, a estrutura e ultraestrutura dos espermatozóides e a análise citoquímica de carboidratos presentes no espermatozóide das espécies de Calliphoridae. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram:

1. Descrever, por meio de análises em microscopia de luz, a estrutura do aparelho reprodutor interno e dos espermatozóides em machos de Calliphoridae;
2. Analisar por meio de microscopia eletrônica de transmissão, os aspectos da espermiogênese e a ultraestrutura dos espermatozóides no grupo estudado;
3. Mapear os resíduos de carboidratos presentes nos espermatozóides das espécies analisadas;
4. Propor uma lista de caracteres morfológicos com base nas características ultraestruturais observadas, visando a identificação de caracteres particulares e compartilhados pelas subfamílias de Calliphoridae, que possuam consistência e possam ser utilizados em estudos futuros de sistemática filogenética.

3. RESULTADOS

O trabalho desenvolvido na presente tese resultou na produção de 4 manuscritos para publicação, referente aos dados obtidos para doze espécies de Calliphoridae. A seguir tais manuscritos serão apresentados, subdivididos em forma de capítulos. Os capítulos publicados são apresentados traduzidos no corpo da tese, e sua publicação original pode ser encontrada no apêndice. A formatação original característica de cada periódico foi mantida na tradução.

O Capítulo 1 trata da descrição completa da morfologia do aparelho reprodutor, da espermiogênese, da estrutura e ultraestrutura dos espermatozóides, da análise citoquímica de EPTA, em três espécies do gênero *Lucilia*. A versão publicada deste artigo encontra-se no anexo I.

O Capítulo 2 analisa os aspectos morfológicos e citoquímicos dos espermatozóides no gênero *Cochliomyia*, dando ênfase às técnicas do EPTA e ácido tânico. A versão submetida para publicação encontra-se no anexo II.

O Capítulo 3 está em fase de preparação para ser publicado e se refere à análise citoquímica de carboidratos em espécies neotrópicas de Calliphoridae, com a utilização de lectinas e marcadores fluorescentes;

O Capítulo 4 está em fase de preparação para publicação e se refere à análise ultraestrutural de espermatozóides em representantes das subfamílias Chrysomyinae e Calliphorinae.

Estrutura e Ultraestrutura dos Espermatozóides e Espermiogênese em três espécies de *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830

(Diptera: Calliphoridae) *

Name, KPO^{a,b}, Barros-Cordeiro, KB^b, Gama Filho, JB^c, Wolff, M^d, Pujol-Luz, JR^e, & Bão, SN^b

^a Programa de Pós-graduação em Biologia Animal; ^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-DF, Brasil; ^c Centro Veterinário Asa Sul, Brasília-DF, Brazil; ^d Grupo de Entomología, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia; ^e Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^a knrna@ig.com.br; ^b karine.brenda22@gmail.com; ^c belar@brturbo.com.br;

^d marta_wolff@yahoo.com; ^e jrpujol@unb.br; ^b snbao@unb.br

* *Journal of Morphology*, 273, 160-172. 2012. (Anexo 2).

RESUMO - Morfologia dos órgãos reprodutores internos masculinos, espermatozóides e espermiogênese das moscas-varejeiras *Lucilia cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana* está sendo descrito aqui pela primeira vez, utilizando microscopia de luz e eletrônica de transmissão. A espermiogênese nestas espécies possui as mesmas características descritas para outras espécies de insetos. Os espermatozóides de *L. cuprina* são similares aos descritos para outros Brachycera. Entretanto, em *L. eximia* e *L. peruviana* algumas diferenças foram encontradas. Nas espécies *L. cuprina* e *L. eximia* os espermatozóides são longos e delgados, medindo cerca de 211 μm e 146 μm de comprimento, com a região da cabeça medindo aproximadamente 19 μm e 17 μm , respectivamente. Foi observado polimorfismo nos espermatozóides de *L. cuprina* e *L. eximia*. Nas três espécies analisadas, a cabeça é formada por um acrossoma (sem camada extra-acrossomal) e preenchido por material elétron lúcido. O formato do núcleo em secções transversais varia de circular a oval com cromatina completamente condensada. A implantação do axonema foi observada na região média do núcleo, conhecida como região de 'peg'. Na região subsequente foi observado o início dos dois derivados mitocondriais, com diâmetros similares e diferentes comprimentos em *L. cuprina*; e apenas um derivado em *L. eximia* e *L. peruviana*. Na região de justaposição ('overlap'), as seguintes estruturas foram observadas: núcleo, adjunto do centríolo, derivados mitocondriais e axonema. O axonema possui o padrão típico observado em insetos com arranjo microtubular de 9+9+2. O trato reprodutor interno em machos consiste em testículos, ductos deferentes, uma vesícula seminal bem desenvolvida, glândulas acessórias e ducto ejaculatório. Essas características são consistentes com a diversidade estrutural dos espermatozóides em dípteros, e constituem uma ferramenta essencial para a compreensão das complexas variações encontradas na família Diptera.

Palavras-chave: Entomologia, Células Germinativas, Espermatozóide de Insetos, Microscopia, Sistema Reprodutor.

ABSTRACT - Morphology of male internal reproductive organs, spermatozoa and spermiogenesis process of the blow-flies *Lucilia cuprina*, *Lucilia eximia* and *Lucilia peruviana* is first described here, using light and transmission electron microscopy. The spermiogenesis process follows the characteristics described for others insect species. The spermatozoa of *L. cuprina* are similar to those described for other Brachycera. However, in *L. eximia* and *L. peruviana* some differences were found. In *L. cuprina* and *L. eximia* species, the spermatozoa are long and thin, measuring about 211 μm and 159 μm in length, of which the head region measures approximately 19 μm and 17 μm , respectively. A polymorphism was observed in *L. cuprina* and *L. eximia* spermatozoa. The head includes a monolayered acrosome with electron-lucid material, and the shape of the nucleus, in cross sections, varies from circular to oval with completely condensed chromatin. The implantation of axoneme was observed in the middle region of the nucleus, known as the 'peg' region. In the subsequent region was observed the emergence of two mitochondrial derivatives of similar diameter and different lengths in *L. cuprina*; and only one in *L. eximia* and *L. peruviana*. In the overlap region, the following structures were observed: nucleus, centriolar adjunct, mitochondrial derivatives and axoneme. The axoneme is of a conventional insectan type with a 9+9+2 microtubular arrangement. The male internal reproductive tract consists of testis, deferent ducts, a very developed seminal vesicle, accessory glands and ejaculatory duct. These features are consistent with the structural diversity of the dipteran reproductive tract and spermatozoa, comprising an essential tool for understanding the complex variations found in the Diptera family.

Key words: Entomology, Germ Cells, Insect Sperm, Microscopy, Reproductive System.

INTRODUÇÃO

A subseção Caliptrata possui aproximadamente 18.000 espécies descritas e este taxon é um dos maiores e mais diversos dentro de Diptera (Kutty *et al.*, 2010). Ao redor do mundo são conhecidas mais de 1.000 espécies de Calliphoridae (moscas-varejeiras), agrupadas em 150 gêneros e 12 subfamílias (Rognes, 1997). Na região Neotropical existem 130 espécies descritas (Pape *et al.*, 2004; Carvalho & Mello-Patiu, 2008).

De acordo com Kutty e colaboradores (2010) Calliphoridae apresenta uma grande diversidade ecológica e possui uma ampla variedade de estratégias de história de vida usados tanto pelos adultos quanto pelas larvas (imaturos). Tais estratégias incluem a decomposição de matéria orgânica, parasitismo e predação de vertebrados e invertebrados, causando problemas de saúde e perdas importantes para a indústria pecuária, e ainda fitofagia em uma grande variedade de plantas.

O gênero *Lucilia* Robineau-Desvoidy é predominantemente Paleártico em distribuição, e a dispersão de algumas espécies pelo mundo ocorreu após a migração e ocupação de novos hábitat pelo homem e outros animais. As espécies do gênero *Lucilia* são consideradas moscas-varejeiras, pois exibem o mesmo comportamento sinantrópico e alimentar observado em outras espécies de Calliphoridae (Stevens & Wall, 1996).

A mosca-varejeira das ovelhas australianas *Lucilia cuprina* foi descrita pela primeira vez na China (Smith, 1986), e é considerada uma espécie cosmopolita (Gomes & Von Zuben, 2004). *Lucilia eximia* é predominantemente Neártica e Neotropical e é a espécie mais comum do gênero no Brasil (Moura *et al.*, 1997). *Lucilia peruviana* é encontrada na região dos Andes e, geralmente coletadas em

altitudes entre 1.900 e 2.800 m em áreas rurais ou florestas preservadas. Existem poucos estudos sobre esta espécie e, juntamente com *L. cuprina* e *L. eximia*, está também associada às fases ativas de decomposição de carcaças, sendo uma importante ferramenta nas investigações forenses (Wolff *et al.*, 2001).

Estudos recentes têm demonstrado que a estrutura e a ultraestrutura dos órgãos reprodutores internos e espermatozóides constituem uma ferramenta útil para a reconstrução de filogenias em vários grupos de insetos, incluindo Diptera (Baccetti 1987; Carcupino *et al.*, 1995; Dallai & Afzelius, 1995; Jamieson *et al.*, 1995, 1999).

Os espermatozóides em braquíceros são delgados e filiformes com acrossoma apical (sem camada extra-acrossomal), núcleo compacto, derivados mitocondriais quase totalmente preenchidos por material paracristalino e axonema com arranjo 9+9+2 de microtúbulos. Até recentemente acreditava-se que todas as espécies já investigadas de braquíceros compartilhavam um modelo comum de espermatozóide (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999), exceto pela análise detalhada de material intertubular obtido através de técnica de reconstrução de computador (Dallai & Afzelius, 1999). Neste artigo apresentamos algumas diferenças encontradas na ultraestrutura dos espermatozóides deste grupo. Na família Calliphoridae, apenas *Calliphora vomitoria* (Dallai & Afzelius, 1990) e *Chrysomya megacephala* (Name *et al.*, 2010) foram descritas anteriormente.

O objetivo deste estudo é descrever e comparar a morfologia dos espermatozóides de *L. cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana* e, em estudos futuros, compará-los com outras espécies de Calliphoridae.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Espécimes adultos de *Lucilia cuprina* e *L. eximia* foram coletados em zonas urbanas e rurais de Brasília, Brazil, e utilizados para dar início a colônia e posteriormente às análises laboratoriais. Os espécimes selvagens foram atraídos com carcaças de peixe e carne moída, e coletados com redes entomológicas e armadilhas tipo Van Someren-Rydon. Espermatecas de fêmeas de *Lucilia peruviana* analisadas neste trabalho foram obtidas em colaboração com a Universidade de Antioquia em Medellín (Colômbia).

Em laboratório, as moscas das espécies *L. cuprina* e *L. eximia* foram alimentadas com dieta à base de leite em pó, açúcar e levedo de cerveja (1:1:1) dissolvidos em água, e água à vontade durante uma semana, e em seguida foi oferecido 100 g de carne bovina moída como substrato para oviposição. Ovos em grande quantidade foram encontrados em baixo da carne e após um dia foram transferidos para potes plásticos cônicos. Em cada pote plástico foram colocados 20 ovos e 20 g de carne moída bovina fresca, para o completo desenvolvimento dos espécimes (estágio adulto).

Microscopia de Luz

As moscas foram brevemente submetidas à letargia por frio e os sistemas reprodutores de seis machos de *L. cuprina* e *L. eximia* (três de cada espécie) foi totalmente removido por dissecação em solução salina de NaCl 0.9%. Após a dissecação tais estruturas foram colocadas em lâminas histológicas para observação.

Observações e aquisição de imagens foram feitas utilizando estéreomicroscópio Zeiss® (SPEMI 2000C).

Testículos processados para microscopia eletrônica de transmissão foram seccionados para microscopia de luz. Cortes semi-finos (4µm), corados com 0,25% de azul de toluidina e borato de sódio, pH 11, foram observados e fotografados utilizando Microscópio Axiophot Zeiss®, equipado com Zeiss® Axiocam MRc digital câmera e Axiovision 4.5 software.

Machos das espécies *L. cuprina* e *L. eximia* (10 de cada) foram dissecados e seus testículos foram rompidos e os espermatozóides espalhados em lâminas histológicas. Em seguida os espermatozóides foram fixados em solução de 4% (wt/vol) de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e as lâminas foram lavadas e deixadas para secar em temperatura ambiente.

Para medição do comprimento total dos espermatozóides e da região do núcleo (10 lâminas de cada espécie), as lâminas preparadas anteriormente foram incubadas durante 15 minutos com 0,2µg/ml de 4,6-diamino-2-phenyndole (DAPI) em água, lavadas e montadas com uma solução de ProLong - Gold (anti-fade reagent). As preparações foram então examinadas utilizando os microscópios Axiophot Zeiss® e Confocal Leica SP5® equipados com epifluorescência e com filtro de excitação de 405 nm, respectivamente.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os testículos dos machos de *L. cuprina* e *L. eximia* (10 de cada espécie), e espermoteca de cinco fêmeas de *L. peruviana* foram fixados por 4 h em solução

contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5mM CaCl₂ e 3% de sacarose em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. Após a fixação, os espécimes foram lavados no mesmo tampão e pós-fixados por 1h em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em alguns casos os espécimes foram fixados em uma mistura contendo 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, seguido de contração “*en bloc*” em solução de 1% de acetato de uranila em água destilada “overnight” (Dallai & Afzelius, 1990). 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 operado a 80 kV

Para a detecção de proteínas básicas, foi empregado o método do ácido etanólico-fosfotúngstico (E-PTA), modificado de Bloom e Aghajanian (1968). Testículos de seis machos de cada espécie foram fixados em uma solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 4 h a 4°C. Após lavagem em tampão fosfato e desidratado em álcool, o material foi tratado “*en bloc*” com uma solução de 2% de PTA em etanol absoluto durante 24 h a 4° C, lavado em etanol absoluto e embebidos em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram observados sem contração e parte foi contrastada com acetato de uranila.

RESULTADOS

As descrições obtidas a partir de microscopia de luz e o processo de espermiogênese foram analisadas apenas nas espécies *L. cuprina* e *L. eximia*. No entanto, a descrição da ultraestrutura dos espermatozoides foi feita com base nas três espécies estudadas (*L. cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana*).

Em machos sexualmente maduros do gênero *Lucilia*, os espermatozoides são armazenados nos testículos e na vesícula seminal. Em fêmeas sexualmente maduras estas células são armazenadas nas espermatecas após a cópula.

O sistema reprodutor interno em machos de *L. cuprina* e *L. eximia* são similares e formados pelos seguintes órgãos: dois testículos com ductos deferentes emparelhados e glândulas acessórias, uma vesícula seminal e um ducto ejaculatório. Tipicamente, cada um dos testículos liga-se um ducto deferente, se conectando a ele para chegarem à vesícula seminal. As glândulas acessórias estão diretamente conectadas à vesícula seminal e o ducto ejaculatório está localizado na porção final deste órgão (Fig. 1A).

Em microscopia de luz, os testículos apresentam uma intensa e brilhante coloração marrom avermelhada. Este órgão possui a aparência reniforme (Fig. 1A). Em secções transversais observou-se que a parede do referido órgão é formada por duas camadas distintas: uma camada externa com grânulos de pigmentos e uma interna de tecido muscular (Fig. 1B). A organização das células germinativas no interior dos testículos mostra que o testículo é formado por um único e longo folículo, com vários cistos em diferentes fases da diferenciação (Fig. 1B). Em microscopia eletrônica de transmissão (MET) é possível observar que o testículo é composto de uma parede externa, circundando as células germinativas (Fig. 2A).

Os espermatozoides das espécies examinadas são longos, delgados e filiformes, medindo aproximadamente 211µm em *L. cuprina* e 146 µm em *L. eximia*, em seu comprimento total, incluindo a região da cabeça e da cauda (Figs. 1E-F). Através da marcação do núcleo do espermatozoide com DAPI, região da cabeça foi evidenciada, uma vez que, de outra forma, seria difícil distingui-la da região do flagelo. O núcleo em *L. cuprina* e *L. eximia* mede cerca de 19 µm e 17 µm, respectivamente (Figs. 1C-D).

Foi observado polimorfismo em *L. cuprina* e *L. eximia*, em relação ao comprimento do espermatozoide, uma vez que dentro do mesmo testículo foram encontrados espermatozoides de tamanhos diferentes. Dados referentes ao comprimento da cabeça e da cauda, comprimento total do espermatozoide, o menor e o maior espermatozoide encontrado em cada espécie, são apresentados na tabela 1.

Espermiogênese

A diferenciação das espermatídes nas duas espécies ocorre no interior de cistos (circundados por uma célula somática), e dentro destes cistos todas as espermatídes encontram-se no mesmo estágio de maturação (Fig. 2B). Existem aproximadamente 256 células germinativas por cisto. Foi observado que em alguns casos, em *L. cuprina*, os cistos não encontram-se circundados por uma célula somática, mas a organização destas células sugerem que elas foram circundadas até um determinado ponto da diferenciação (Fig. 2B).

Os eventos da espermiogênese nestas espécies são similares. A diferenciação é caracterizada pela formação do acrossoma e do 'nebenkern',

condensação do núcleo, alongamento celular incluindo desenvolvimento do flagelo e eliminação do citoplasma.

Espermátides iniciais possuem a vesícula proacrossomal esférica (cerca de 200 nm de diâmetro) localizada entre a face côncava do complexo de Golgi, que participa ativamente em sua formação, e do núcleo da espermátide (Fig. 2C). Durante os estágios intermediários de maturação das espermátides o acrossoma em desenvolvimento encontra-se posicionado na parte anterior do núcleo em alongamento, e o conteúdo acrossomal é relativamente elétron denso (Fig. 2D). Com a maturação das espermátides, o acrossoma se alonga e no espermatozóide é encontrado lateralmente posicionado em relação ao ápice do núcleo (Figs. 4C-D).

Em espermátides iniciais, o núcleo possui uma aparência quase circular com a cromatina dispersa e granular e um excesso de citoplasma (Fig. 2C-D). Durante os estágios intermediários de diferenciação, foi observada a condensação gradual da cromatina, com o aumento de sua elétron densidade (Fig. 2E). O processo de condensação da cromatina pode ocorrer de duas maneiras: homoganeamente em todo o núcleo ou fortemente centralizada em uma região determinada (Figs. 2D-E).

O alongamento do núcleo da espermátide é acompanhado pelos seguintes aspectos adquiridos pela cromatina: fibrosa, lamelar e completamente compactada, e também pela perda simultânea de citoplasma (Figs. 2F-H). Ainda no último estágio da espermiogênese, em secção transversal, foi observada a presença de membranas acessórias e uma fileira de microtúbulos circundando o núcleo (Fig. 2H).

No início da diferenciação da espermátide, um grande número de mitocôndrias se funde para formar o 'nebenkern' (Fig. 3A), que após uma série de transformações (Figs. 3B-C) se diferencia em derivados mitocondriais. No curso da

diferenciação desta estrutura em *Lucilia cuprina*, o 'nebenkern' se transforma em dois derivados mitocondriais de igual diâmetro (Figs. 3E-G). No entanto, em *L. eximia*, embora o 'nebenkern' dê evidências de que se dividirá em dois (Figs. 3B-C, 3I), ele permanece único (Figs. 3J-K). Ainda durante o processo de diferenciação, em ambas espécies, os derivados mitocondriais são gradualmente preenchidos por material paracristalino. Os derivados mitocondriais surgem antes da região de justaposição, entre o núcleo e o axonema.

A região de justaposição ('overlap') é caracterizada pela redução em diâmetro do núcleo, presença do axonema completo, aumento em diâmetro dos derivados mitocondriais e pela característica marcante desta região, o início do adjunto do centríolo. Nesta região, além do núcleo, todas as estruturas flagelares estão presentes (axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo) (Fig. 3F).

Em secções transversais o adjunto do centríolo na espécie *L. cuprina* está localizado em uma região circundada pelo núcleo, derivados mitocondriais e axonema (Figs. 3F-G). Em *L. eximia*, em secção longitudinal, ele pode ser observado posteriormente ao núcleo, com elétrons de densidade moderada (quando comparado ao núcleo) e algumas áreas elétrons lúcidas (Figs. 3H).

A implantação e desenvolvimento do axonema pode ser observada em uma região excêntrica localizada no núcleo, onde apenas os microtúbulos centrais são vistos (Fig. 3D). Com o completo desenvolvimento do axonema, a dupla de microtúbulos periféricos e os microtúbulos acessórios podem ser observados (Fig. 3E).

Um grande número de microtúbulos e as membranas acessórias presentes na região nuclear foram também observadas na região do flagelo (Figs. 3E-F).

Espermatozóides

Em todas as espécies estudadas, a cabeça do espermatozóide consiste em duas estruturas: acrossoma e núcleo. O acrossoma é cônico e espesso, não possui membrana extra-acrossomal e o material interno possui moderada elétrons densidade. Em secções transversais ele apresenta-se como uma estrutura elíptica (Figs. 4A-B), enquanto em secções longitudinais ele se encaixa em um recorte indentado na superfície do núcleo (Figs. 4C-D).

Em secções transversais o formato do núcleo varia de circular a oval e a cromatina é condensada (Figs. 4E-F). Em cortes longitudinais, o núcleo é alongado com o acrossoma em um pólo e a implantação do axonema e a região de justaposição (“overlap”) em outro (Figs. 4C-D, G).

Quando submetido ao método do E-PTA, a concentração de proteínas básicas na região da cabeça de *L. cuprina* e *L. eximia* foi observada apenas na periferia do núcleo e no envelope nuclear (Figs. 6A, C).

O local de origem do axonema, em secções transversais, é uma pequena estrutura denominada ‘peg’, sendo este, um círculo de citoplasma completamente circundado pelo núcleo (Fig. 4F). Em secções longitudinais essa região do núcleo possui uma aparência dentada (Fig. 4G).

Na região subsequente do núcleo é possível observar, em secções transversais o axonema completo (9+9+2), o início dos derivados mitocondriais com mesmo diâmetro e um núcleo grande, em *L. cuprina* (Fig. 5A). Nas espécies *L. eximia* e *L. peruviana*, apenas um derivado mitocondrial é observado nesta mesma região (Fig. 5H).

Na região de justaposição dos espermatozóides, o núcleo e os componentes do flagelo (axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo) podem ser vistos em um mesmo plano de observação em todas as espécies analisadas (Fig. 5B-C, I-J).

O adjunto do centríolo está centralmente localizado entre as outras estruturas da região de justaposição. Em secção longitudinal esta estrutura apresenta-se elétron densa com áreas elétron lúcidas, é longa (Fig. 5G), e em secções transversais ele possui formato retangular ou triangular (Figs. 5B-C).

O adjunto do centríolo começa depois da região posterior do núcleo e continua paralelo ao axonema e derivados mitocondriais. Somente em *L. cuprina* essa estrutura foi observada entre os derivados mitocondriais (Figs. 5B-C). Em *L. eximia* e *L. peruviana*, tal estrutura foi observada sempre lateralmente ao axonema e ao núcleo, ou axonema e derivado mitocondrial (Figs. 5I-J).

Em *L. cuprina*, em secções transversais, os derivados mitocondriais foram observados posicionados lado a lado próximos à linha média e ventralmente ao axonema e, embora seus diâmetros sejam similares (Figs. 5A-D), seus comprimentos são diferentes. Em *L. eximia* e *L. peruviana*, o derivado mitocondrial foi observado lateralmente ou em frente ao axonema (Figs. 5I-K), sendo esta característica muito peculiar no grupo. Em todas as espécies, estas estruturas estão quase completamente preenchidas por material paracristalino (Figs. 5C, J-L).

Em todas as espécies estudadas, o axonema possui a configuração típica de 9+9+2 microtúbulos, com nove microtúbulos acessórios exteriores simples, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais. Entre os microtúbulos acessórios foi observado material intertubular proeminente (Fig. 5M). Na parede de cada

microtúbulo acessório destas espécies, 13 protofilamentos com lúmen elétron lúcido pôde ser observado (Fig. 5N).

Na porção final do flagelo, o axonema é a última estrutura a se desorganizar. Nesta região, os microtúbulos são desorganizados gradualmente. No gênero *Lucilia*, os microtúbulos acessórios e o par central se desmontam primeiro, seguidos pelas duplas de microtúbulos periféricos (Figs. 5O-Q).

Quando submetidos ao método do E-PTA, as proteínas básicas no flagelo de *L. cuprina* foram encontrados nas seguintes estruturas: derivados mitocondriais (região do material paracristalino) adjunto do centríolo e material intertubular. Nas estruturas flagelares de *L. eximia*, a região da borda do adjunto do centríolo, o material intertubular e o material paracristalino são positivos para o método (Figs. 6B-D).

A análise ultraestrutural do espermatozóide em três espécies de *Lucilia* envolvidas neste estudo revelou a existência de dois diferentes tipos de células espermáticas no gênero, caracterizando um tipo de polimorfismo (Fig. 7).

DISCUSSÃO

Estudos envolvendo órgãos reprodutores internos em Diptera são escassos, com poucos estudos comparativos detalhados (Sinclair *et al.*, 2007). Aspectos morfológicos dos órgãos reprodutores internos nas espécies de *Lucilia* analisadas compreendem: testículos, ductos deferentes, glândulas acessórias, vesícula seminal, ducto ejaculatório, e assemelham-se ao descrito para a maioria dos Diptera (Sinclair *et al.*, 2007).

Na maioria das espécies de Diptera estudados, o testículo é considerado como sendo um órgão em forma de bolsa, subdividido em folículos, equivalente ao observado em outras ordens de insetos (Williamson, 1989). Entretanto, o número de cistos presentes no interior dos testículos varia consideravelmente entre os grupos. Em *Chrysomya megacephala* (Name *et al.*, 2010) e nas espécies aqui estudadas, *Lucilia cuprina* e *Lucilia eximia*, um único folículo por testículo foi observado.

O aspecto observado na vesícula seminal das duas espécies do gênero *Lucilia*, uma região muito dilatada e modificada na porção inicial do ducto ejaculatório, não foi descrita em outros Calliphoridae. As glândulas acessórias são tubulares e longas, e seu conteúdo possui aspecto leitoso em *L. cuprina* e *L. eximia*. Em *C. megacephala* o mesmo aspecto foi observado, porém as glândulas acessórias são menores (Name *et al.*, 2010). Estudos prévios em *Drosophila melanogaster* (Wolfner, 1997; Heifetz *et al.*, 2001) demonstraram que as proteínas presentes nas glândulas acessórias dos machos induzem, tanto a postura quanto a progressão oogênica em fêmeas .

Foi observado que os espermatozóides em *L. cuprina* e *L. eximia* derivam de células germinativas primordiais, encontradas na parte apical do testículo, e tais

células tronco passam por um processo sincrônico de mitose sem divisão celular para produzir os espermatócitos. Este processo foi também observado em outras espécies como *C. megacephala* (Calliphoridae) (Name *et al.*, 2010), *Drosophila* (Drosophilidae) (Tokuyasu *et al.*, 1972a,b) e *Ceratitis capitata* (Tephritidae) (Báo & Dolder, 1991).

Em *L. cuprina* e *L. eximia* as espémátides encontradas nas regiões distal e média do testículo são encapsuladas por uma célula somática, formando o cisto, onde elas completam seu processo de diferenciação. Na região proximal dos testículos, próximo à inserção do ducto deferente, estas células estão livres. Os aspectos da organização testicular foram também descritos em outros Calliphoridae (Name *et al.*, 2010), em alguns Tephritidae (Báo & Dolder, 1991; Valdez, 2001), em Drosophilidae (Tokuyasu *et al.*, 1972a,b), em Sarcophagidae (Warner, 1971) e em um grande número de outras ordens de insetos (Phillips, 1970). Entanto, foi observado que em *L. cuprina*, os cistos algumas vezes não se encontram encapsulados pela célula somática, mas mantém a organização celular.

Em muitos insetos foi observado que o número de espermatozóides por cisto é variável. Pesquisas mostram que em Diptera, o número de espermatozóides por cisto varia entre espécies (Oguma *et al.*, 1987; Cruz-Landim, 2001). De acordo com Virkki (1969), ordens primitivas de insetos possuem um número maior de espermatozóides por cisto do que ordens mais recentes (derivadas). Sendo assim, os grupos mais recentes ou especializados tendem a apresentar um número menor de espermatozóide por cisto.

Em *L. cuprina* e *L. eximia* o número de células por cistos é variável, mas é comum encontrar um número máximo de 256 células em cada cisto. Em *C.*

megacephala (Name *et al.*, 2010) and *S. bullata* (Warner, 1971) foram observadas 127 células por cisto. Entretanto, quando comparados com outros grupos, essa característica é consistente com a atual posição taxonômica e filogenética destas espécies dentro de Diptera.

A estrutura do espermatozóide em *L. cuprina* e *L. eximia* é similar à descrição geral para espermatozoides de insetos (Phillips, 1970; Baccetti, 1972, Jamieson 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Em ambas as espécies estudadas, o espermatozóide é longo e delgado como na maioria dos Diptera, e apresenta variações significativas no comprimento, ou seja, o espermatozóide apresenta polimorfismo.

O polimorfismo mais comum observado em espermatozóide de insetos refere-se ao comprimento do núcleo e do flagelo. Em *Drosophila* é comum encontrar machos produzindo espermatozoides de vários tamanhos (Jamieson *et al.*, 1999). O comprimento total do espermatozóide varia de acordo com a espécie examinada, de 0.3 mm em *D. pseudoobscura* (Bairati & Perotti, 1970) a 58 mm em *D. bifurca* (Pitnick *et al.*, 1995).

O polimorfismo em *L. cuprina* e *L. eximia* pode ser dividido em duas classes: quando analisados em microscopia de luz, nós observamos que os espermatozoides exibem variações no comprimento da cabeça e da cauda – o tipo mais comum de polimorfismo descrito em insetos. No entanto, quando analisados em microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram observadas diferenças ultraestruturais na morfologia do espermatozóide (derivados mitocondriais) nas três espécies analisadas do gênero *Lucilia* (*L. cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana*). O polimorfismo aqui mencionado não foi observado em outras espécies de Calliphoridae (Dallai & Afzelius, 1990; Name *et al.*, 2010).

A espermiogênese em *L. cuprina* e *L. eximia* é similar ao descrito em outros dípteros e não difere marcadamente do que acontece em outras ordens de insetos (Phillips, 1970; Ndiaye *et al.*, 1996; Jamieson *et al.*, 1999; Dallai *et al.*, 2004, Name *et al.*, 2010).

Em espermátides iniciais de *L. cuprina* and *L. eximia*, o complexo de Golgi encontra-se próximo ao grânulo proacrossomal, sugerindo que ele está envolvido na formação do acrossoma. O papel do complexo de Golgi na formação e diferenciação do grânulo proacrossomal têm sido reportado em várias outras espécies de Diptera (Dallai *et al.*, 1984; Báó *et al.*, 1989; Ndiaye & Mattei, 1992). Nas três espécies aqui estudadas, a condição observada no acrossoma – de não possuir membrana extra-acrossomal, é aparentemente compartilhada pelo espermatozóide de todos os Brachycera já examinados. Entretanto, a aparência volumosa do acrossoma foi encontrada no gênero *Lucilia* e descrita em Calliphoridae pela primeira vez.

A maturação do núcleo caracterizada pelo alongamento e redução em diâmetro com condensação simultânea da cromatina foi observada em alguns Diptera (Schränkel & Schwalm, 1974; Curtis *et al.*, 1989; Name *et al.*, 2010) e também em outras ordens de insetos (Phillips, 1970; Jamieson *et al.*, 1999; Dallai *et al.*, 2004).

A condensação da cromatina nas espécies *L. cuprina* e *L. eximia*, pode ocorrer de duas maneiras: fortemente centralizada em uma determinada região ou ainda de forma homogênea em todo o núcleo. Nos estágios iniciais da espermiogênese a cromatina possui aparência granular, e nas fases subseqüentes foram observados os seguintes aspectos: fibras, lamelas e totalmente compactado.

Nos espermatozoides das três espécies estudadas, a cromatina nuclear é altamente condensada como em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010) e em outros Brachycera (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Quando tratados com E-PTA, o núcleo em *L. cuprina* e *L. eximia* mostraram reação positiva somente na periferia e no envelope nuclear.

As duas membranas acessórias observadas próximas ao núcleo em *L. cuprina* and *L. eximia*, também foram encontradas em espermátides de *Coelopa frigida* (Coelopidae) (Schränkel & Schwalm, 1974), denominadas 'scroll-like structure'. Estas estruturas podem ser observadas paralelas ao envelope nuclear, estendendo-se ao longo do núcleo. Com o aumento da condensação do núcleo, as membranas acessórias tendem a desaparecer.

A região posterior do núcleo nas espécies estudadas possui uma característica peculiar, observada em secção transversal e longitudinal, que é o início do axonema, seguido das outras estruturas flagelares. Foi observado que o núcleo, em secção longitudinal, possui aparência indentada e em secção transversal observou-se um círculo citoplasmático denominado 'peg'. Logo abaixo da região de implantação do axonema, ele encontra-se completamente formado.

Em *L. cuprina* and *L. eximia*, as estruturas que formam a região de justaposição (axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo), podem ser observadas, ambas, tanto na espermiogênese quanto no espermatozoide. Em *L. peruviana* esta região foi observada no espermatozoide, porém é similar ao observado em outras espécies. Descrições detalhadas desta região podem ser encontradas em *M. scalaris* (Curtis *et al.*, 1989) e *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010).

A região da cauda é marcada pelo completo desaparecimento do núcleo e pelo aumento em diâmetro do adjunto do centríolo. Acredita-se que o papel de tal estrutura na maioria dos insetos seja dar suporte estabilizando a inserção do axonema na base do núcleo e também, a de ancorar os derivados mitocondriais um em cada lado do axonema (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

O adjunto do centríolo nas três espécies estudadas é relativamente longo e possui elétrons de densidade moderada, com algumas áreas elétrons lúcidas, padrão observado também em outras espécies de Brachycera (Warner, 1971; Name *et al.*, 2010). No espermatozóide o adjunto do centríolo foi observado, em secções transversais, na região de justaposição. Em *L. cuprina* tal estrutura é observada circundada pelo núcleo e estruturas flagelares (derivados mitocondriais e axonema), enquanto em *L. eximia* and *L. peruviana* tal estrutura pode ser observada lateralmente localizada entre o axonema e o núcleo e em frente ao derivado mitocondrial.

Os estágios iniciais de formação do flagelo estão associados com o acúmulo de um grupo de mitocôndrias que se fundem para formar o 'nebenkern' e posteriormente essa estrutura se divide para formar dois derivados mitocondriais (Phillips, 1970; Warner, 1971), preenchidos por uma proteína paracristalina, com organização tridimensional – a cristalomitina (Baccetti *et al.*, 1977).

Em *L. cuprina*, o padrão observado foi o mesmo encontrado em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010), enquanto em *L. eximia* e *L. peruviana* o perfil encontrado está sendo descrito pela primeira vez em Calliphoridae. Nestas espécies, ainda durante a espermiogênese, as mitocôndrias se fundem, o 'nebenkern' é formado, mas ele não se divide, e apenas um derivado mitocondrial é

formado. Em todas as espécies aqui descritas, o derivado é quase totalmente preenchido por material paracristalino.

De acordo com Dallai e colaboradores (1993), as estruturas presentes no axonema dos espermatozoides em Brachycera são relativamente uniformes, enquanto na subordem Nematocera existe uma considerável diversidade, que é maior do que a encontrada em qualquer outra ordem de insetos. Como esperado e encontrado para a maioria dos Brachycera estudados (Dallai *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010), o axonema nas três espécies examinadas possuem 9+9+2 microtúbulos, perfil similar ao descrito para a maioria dos insetos (Dallai & Afzelius, 1990).

O material intertubular em todas as espécies analisadas do gênero *Lucilia* é proeminente e encontra-se entre os microtúbulos acessórios. Esse padrão foi observado em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010) e em outras espécies de Brachycera (Dallai *et al.*, 1993; Dallai & Afzelius, 1999).

A porção final do flagelo no gênero *Lucilia* é caracterizada por uma redução progressiva no número de elementos microtubulares, sendo os microtúbulos acessórios os primeiros a se desmontarem, seguidos pelo par de microtúbulos centrais, e por último, pela dupla de microtúbulos periféricos. Em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010), foi observado que a dupla de microtúbulos periféricos desmontam primeiro, seguido pela dupla central, e finalmente pelos microtúbulos acessórios.

A forma como ocorre a desmontagem do axonema não vem sendo levada em consideração em estudos envolvendo espermatozoides de Diptera, no entanto, em outros grupos esse parâmetro tem sido utilizado como uma importante ferramenta, e

por ser altamente conservado, esse dado provavelmente indique relação filogenética (Zama *et al.*, 2001, 2005).

Na região do flagelo do espermatozóide de *Lucilia* o método do ácido etnólico-fosfotúngstico permitiu identificar a presença de proteínas básicas em diferentes regiões do axonema, similar aos resultados obtidos em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010), e em *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) (Báo *et al.*, 1992).

Com base nas características mostradas neste trabalho, a morfologia dos espermatozóides nas três espécies do gênero *Lucilia* são, na maior parte, similares ao descrito para a maioria dos Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999). No entanto, algumas diferenças foram encontradas: **(1)** o alargamento e a modificação observados na região da vesícula seminal em *L. cuprina* e *L. eximia*; **(2)** o polimorfismo no comprimento dos espermatozóides em *L. cuprina* e *L. eximia*; **(3)** o polimorfismo da ultraestrutura dos espermatozóides no gênero *Lucilia*, com a presença de apenas um derivado mitocondrial em *L. eximia* e *L. peruviana*; **(4)** o acrossoma volumoso nas espécies analisadas, e **(5)** as diferenças observadas na estrutura do espermatozóide, com relação à presença e ausência de proteínas básicas (método do E-PTA). Desta forma, tais características são dados consistentes que ilustram a diversidade do trato reprodutor e dos espermatozóides em Diptera, podendo fornecer um sistema de caracteres, que usados em associação com outras ferramentas ajudarão na solução de várias incertezas sobre as relações evolucionárias deste grupo de insetos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- Baccetti B. 1972. Insect Sperm Cell. *Adv Insect Physiol* 575 p.
- Baccetti B. 1987. Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects. *In: Baccetti B. editor. Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects. Ellis Harwood Limited Chichester UK. 612 p.*
- Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosatti F, Afzelius BA. 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J Cell Biol* 73:594-600.
- Bairati A, Perotti ME. 1970. Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. *In: Comparative Spermatology. Baccetti B, editor. Academic Press New York. 573 p.*
- Báo, S.N., & H. Dolder. 1991. Testicular organization in adult *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): RA mutant and Wild-type lineages. *Rev Bras Biol* 51(2):313-319.
- Báo SN, Lins U, Farina M, De Souza W. 1992. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon. Some new aspects evidenced by cytochemistry and Image Processing. *J Struct Biol* 109:46-51.
- Bao SN, Quargio-Grassiotto I & Dolder H. 1989. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Cytobios* 58:93-100.
- Bloom FE, Aghajanian GK. 1968. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res* 22:361-375.
- Carcupino M, Profili G, Kathirithamby J, Mazzini M. 1995. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mem Mus Natn Hist Nat* 166:291-296.

- Carvalho CJB, De Mello-Patiu CA. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 52(3):390-406.
- Curtis SK, Benner DB, Musil G. 1989. Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *J Morphol* 200:47-61.
- Cruz-Landim C. 2001. Organization of the cyst in bee (Hymenoptera: Apidae) Testis: Number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Ser Zool* 91:183-189.
- Dallai R, Afzelius BA. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J Struct Biol* 103:164-179.
- Dallai R, Afzelius BA. 1995. Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. *In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L, editors. Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Mem Mus Nat Hist Nat* 166. 565p.
- Dallai R, Afzelius BA. 1999. Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance. *In: Gagnon, C. (ed), The Male Gamete. From Basic Sciences to Clinical Applications. Cache River Press, 516 p.*
- Dallai R, Baccetti B, Mazzini M, Sabatinelli G. 1984. The spermatozoon of three species of *Phlebotomus* (Phlebotominae) and the acrosomal evolution in nematoceran dipterans. *Int J Insect Morphol Embryol* 13:1–10.
- Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S, Afzelius BA. 1993. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zool Scripta* 22:193-202.

- Dallai R, Carapelli A, Nardi F, Fanciulli PP, Lupetti P, Afzelius BA, Frati F. 2004. Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae: Zygentoma: Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in *Zygentoma*. *Tissue Cell* 36:233 – 244.
- Gomes L, Von Zuben CJ. 2004. Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. *Ilheringia Sér Zool* 94:135-138.
- Heifetz I, Tram U, Wolfner, F. 2001. Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci* 268:175-180.
- Jamieson BGM, 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, 530 p.
- Jamieson BGM, Ausio J, Justine JL. 1995. Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy . *Mém Mus Natn Hist Nat* 166, 565 p.
- Jamieson BGM, Dallai R, Afzelius BA. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers Inc. 555 p.
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM, Meyer R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrapha) with an emphasis on de superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpines's fly. *Sys Entomol* 35:614-635.
- Moura MO, Carvalho CJB, Monteiro-Filho ELA. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:269-274.

- Name KPO, Pujol-Luz JR, Báo, SN. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* 41:853-860.
- Ndiaye M, Mattei X. 1992. Particularity of acrosome formation during spermiogenesis in two mosquitoes: *Toxorhynchites brevipalpis* and *Anopheles gambiae*. *J Submicroscopic Cytol Pathol* 24(2):269-272.
- Ndiaye, M.; Mattei, X. & O.T. Thiaw. 1996. Spermatogenesis in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Submicroscopic Cytol Pathol* 28:375-384.
- Oguma Y, Kurokawa H, Kusama T. 1987. Number of primary spermatocytes in the *Drosophilla immigrans* (Sturtevant) group (Diptera: Drosophilidae). *Int J Insect Morphol Embryol, Kidlington* 16:85-89.
- Pape T, Wolff M, Amat EC. 2004. Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* 5(2): 201-208.
- Pitnick S, Spicer GS, Markow TA. 1995. How long is a giant sperm? *Nature* 375:109.
- Phillips DM. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* 44:243-277.
- Rognes K. 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group. *Cladistics* 13:27-68.
- Schrankel KR, Schwalm FE. 1974. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tissue Res* 153:44-53.

- Sinclair BJ, Borkent A, Wood DM. 2007. The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zool J Linnean Soc* 150:711-742.
- Smith KGV. 1986. A manual of forensic entomology. British Museum (Natural History). London and Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 205 p.
- Stevens J, Wall R. 1996. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pro. Royal Soc Lond* 263B:1335-1341.
- Tokuyasu K T, Peacock W J, Hardy RW. 1972a. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124:479-506.
- Tokuyasu K T, Peacock W J, Hardy RW. 1972b Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 127:492-525.
- Valdez JM. 2001. Ultrastructure of the testis of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Morphol Histol Fine Struct* 94(2):251-256.
- Virkki N. 1969. Sperm bundles and phylogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 101:13-27.
- Warner FD. 1971. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrastruc Res* 35:210-232.
- Williamson DL. 1989. Oogenesis and spermatogenesis. *World Crop Pests Vol. 3A Fruit Flies*. Robinson AS, Hopper G, editors. Elsevier Amsterdam.
- Wolfner, MF. 1997. Tokens of Love: Functions and Regulations of *Drosophila* Male Accessory Gland Products. *Insect Biochem Molec Biol* 3:179-192.

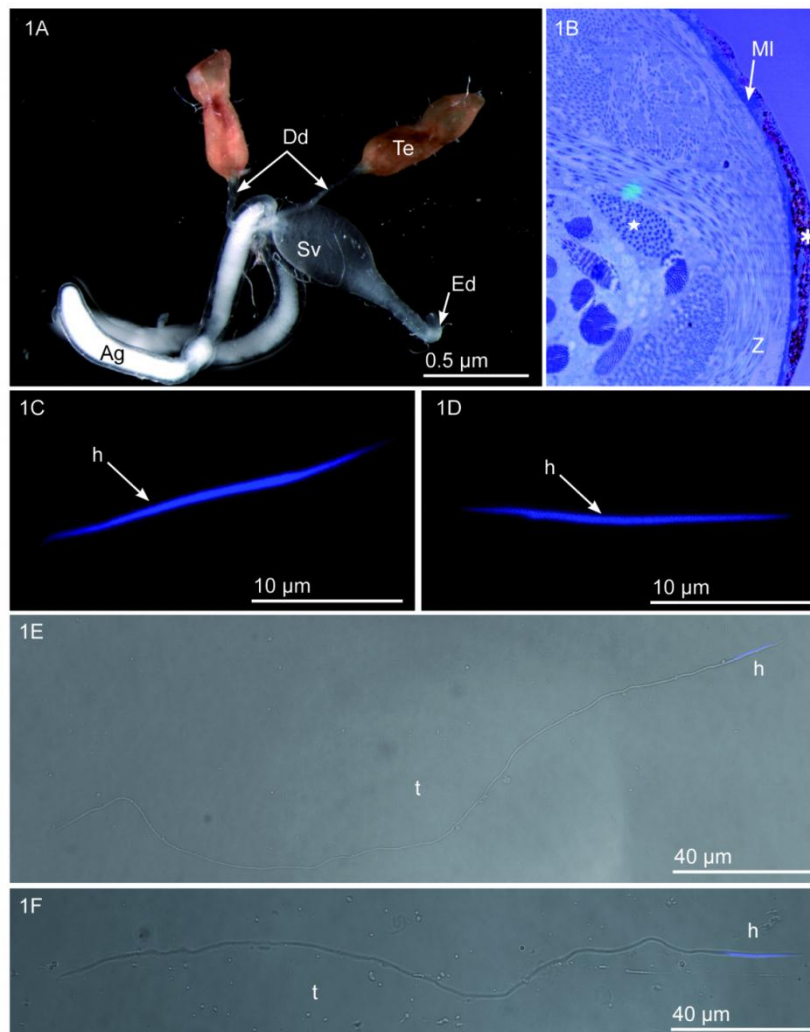
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colômbia. *Forensic Sci Int* 120(1-2):53-59.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (*Plebeia*) *droyana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *J.Hym Res* 10:261-270.
- Zama U, Brito P, Lino-Neto J, Campos L.A.O, Dolder H, Bão SN. 2005. Sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indication of bees relation. *J Submicrosc Cytol Pathol* 37(3-4):313-321.

Tabela 1. Dimensões dos espermatozóides nas espécies de *Lucilia* analisadas.

| Espécies | Cabeça | Flagelo | Comprimento Total |
|-------------------|--|--|---|
| <i>L. cuprina</i> | 19.26 μm (n = 50, SD = 2.70) | 191.80 μm (n = 50, SD = 24.02) | 211.28 μm (134,29 – 238,24 μm) (n = 50, SD = 24.04) |
| <i>L. eximia</i> | 17.62 μm (n = 50, SD = 1.75) | 129 μm (n = 50, SD = 14.23) | 146.62 μm (144,10 – 224,41 μm) (n = 50, SD = 18.31) |

Media e desvio padrão (**SD**). Número de espermatozóides analisados (**n**).

FIGURAS



Figuras 1. A-F. Microscopia de luz dos órgãos reprodutores internos em machos, estrutura dos testículos em *L. eximia*, e espermatozóides. Órgãos reprodutores internos dos machos: testículos (Te), ductos deferentes (Dd), vesícula seminal (Sv), glândulas acessórias (Ag) e ducto ejaculatório (Ed). **B.** Secções transversais mostram a morfologia da parede dos testículos, a organização interna dos cistos e os espermatozóides em *L. cuprina*. Bainha peritoneal (asterisco), tecido muscular (MI), cistos em estágios distintos de diferenciação (estrela) e espermatozóides (Z). **C-F.** Micrografia de luz dos espermatozóides de *L. cuprina* e *L. eximia*. **C-D.** Marcação com DAPI na região da cabeça nas duas espécies anteriormente descritas, respectivamente. **E-F.** Comprimento total dos espermatozóides de *L. cuprina* e *L. eximia*, respectivamente. Cabeça (h) e cauda (t).

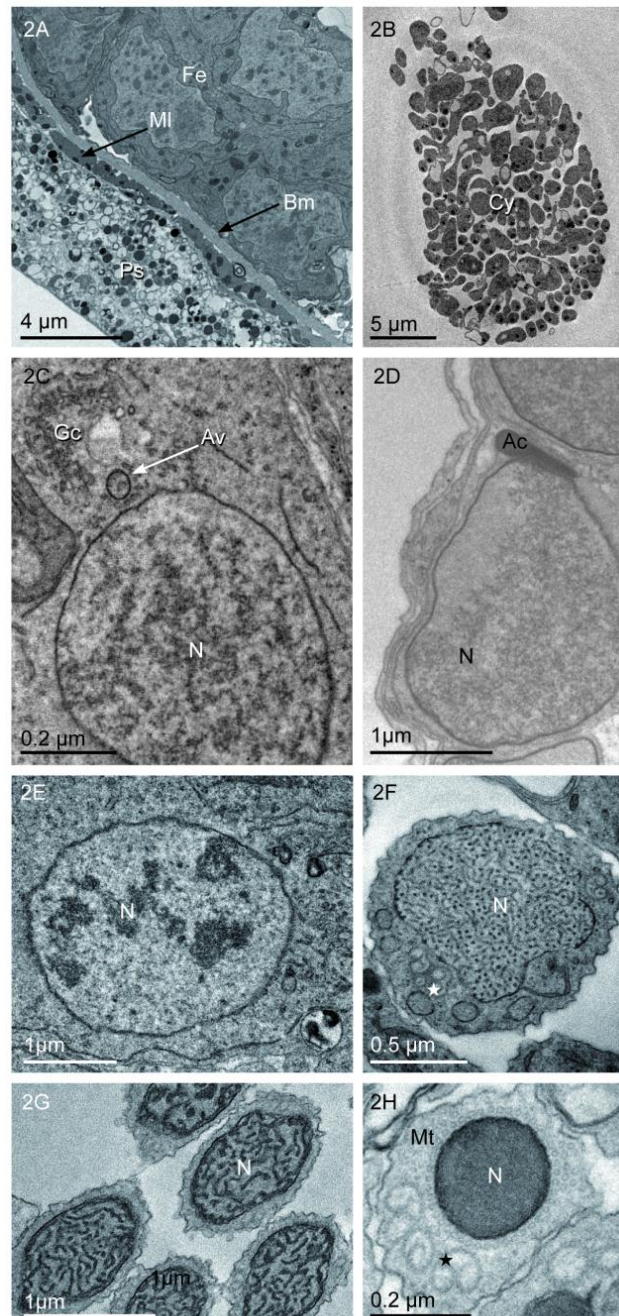


Figura 2. A-H. MET de *L. cuprina* e *L. eximia*. **(A).** Secções transversais da parede do testículo em *L. eximia*. Nas camadas que formam a parede dos testículos é possível observar: uma camada externa com grânulos pigmentados, bainha peritoneal (Ps); uma camada de tecido muscular (MI) delimitada por membranas basais (Bm) e o epitélio folicular (Fe). **B-H.** *Lucilia cuprina*. **B.** Cisto (Cy) de espermatozóides. Observar a ausência de membrana delimitando a célula cística. **C-H.** Secções transversais do testículo, mostrando espermátides em estágio inicial. **C-D.** Formação do acrossoma (Ac). **C.** Vesícula acrossomal (Av) observada próxima ao complexo de Golgi (Gc). A cromatina nuclear encontra-se dispersa. **D.** O acrossoma (Ac) pode ser visto no ápice do núcleo (N) em processo de alongamento. **E-H.** Condensação da cromatina. O primeiro aspecto observado é a agregação da cromatina formando massas em algumas regiões do núcleo (N); seguido pelo aspecto fibroso, lamelar e altamente compactado, respectivamente. Membranas acessórias (estrela), microtúbulos (Mt).

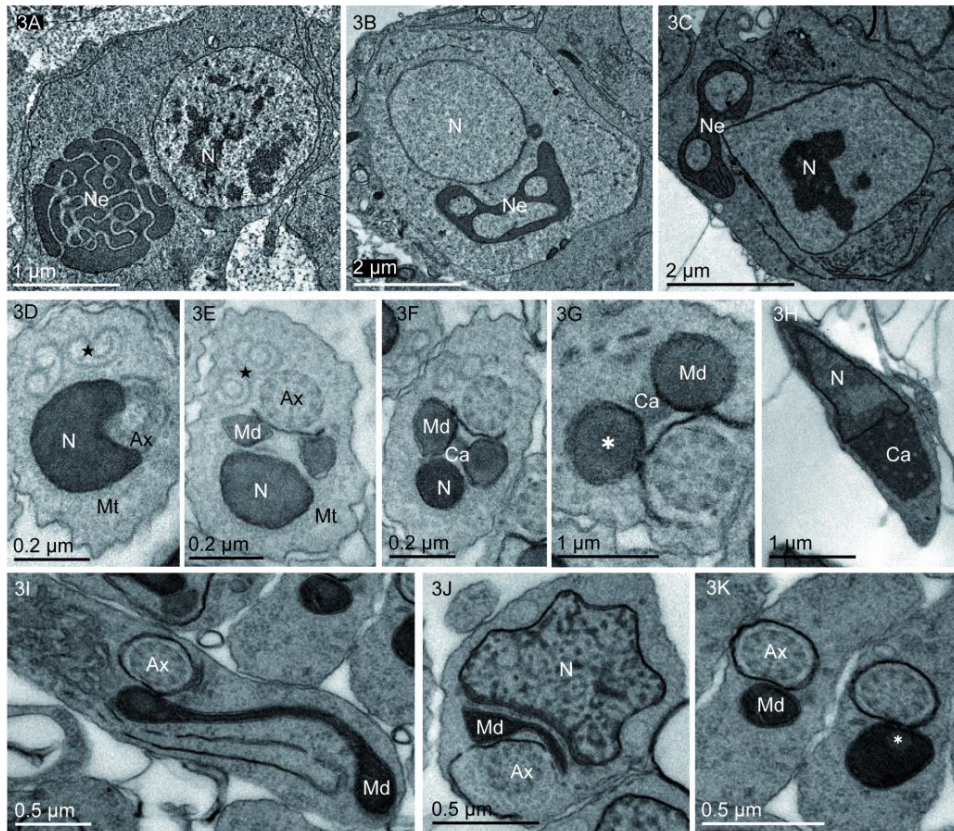


Figura 3. A-K. MET das espermátides iniciais de *L. cuprina* (A, D-H) e *L. eximia* (B, C, I-K). A-C. Em secções transversais da região do flagelo foi observada a fusão de várias mitocôndrias para formar o 'nebenkern' (Ne). D. A implantação do axonema (Ax) ocorre na região nuclear. Núcleo (N), membranas acessórias (estrela), microtúbulos (Mt). E-G. Regiões de justaposição ('overlap') e flagellar da espermátide. As membranas acessórias (estrela) e microtúbulos (Mt) estão presentes nesta região. E. As características da região nuclear mostram o núcleo (N), o axonema (Ax) e o início dos derivados mitocondriais (Md). F. Esta é a região de justaposição ('overlap'), marcada pelo início do adjunto do centríolo (Ca). G. A região do flagelo é marcada pelo completo desaparecimento do núcleo e presença das estruturas flagelares. H. Em secção longitudinal é possível observar o núcleo (N) e o adjunto do centríolo (Ca). I-K. Estruturas flagelares. I. O aspecto morfológico do derivado mitocondrial (Md) sugere que ele se dividirá em dois, mas ele continua único. J-K. É possível observar apenas um derivado mitocondrial (Md), localizado entre o núcleo (N) e o axonema, e em frente ao axonema (Ax), respectivamente. O material paracristalino é observado (asterisco).

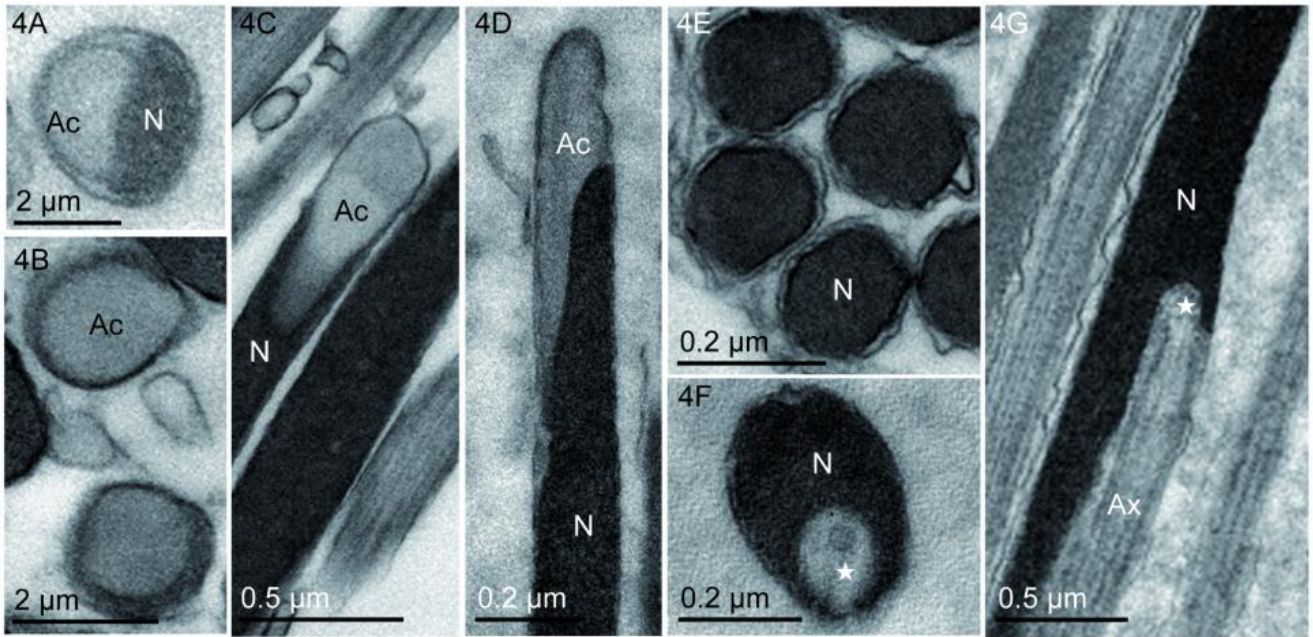


Figura 4. A-G. MET da região da cabeça do espermatozóide de *L. cuprina* (A), *L. eximia* (B, C, E), e *L. peruviana* (D, F, G). O material de *L. peruviana* analisado foi obtido de espermateca. **A-B.** Secções transversais do acrossoma (Ac) evidenciam o aspecto elíptico desta estrutura. **C-D.** O acrossoma (Ac) é volumoso e encontra-se inserido lateralmente no núcleo (N). **E.** O formato do núcleo varia de circular a oval e a cromatina é altamente condensada. Núcleo (N). **F-G.** Em secções transversais e longitudinais é possível observar a região de implantação do axonema (estrela). Em secções transversais essa região chama-se região de 'peg'. Em secção longitudinal pode-se observar a aparência indentada do núcleo.

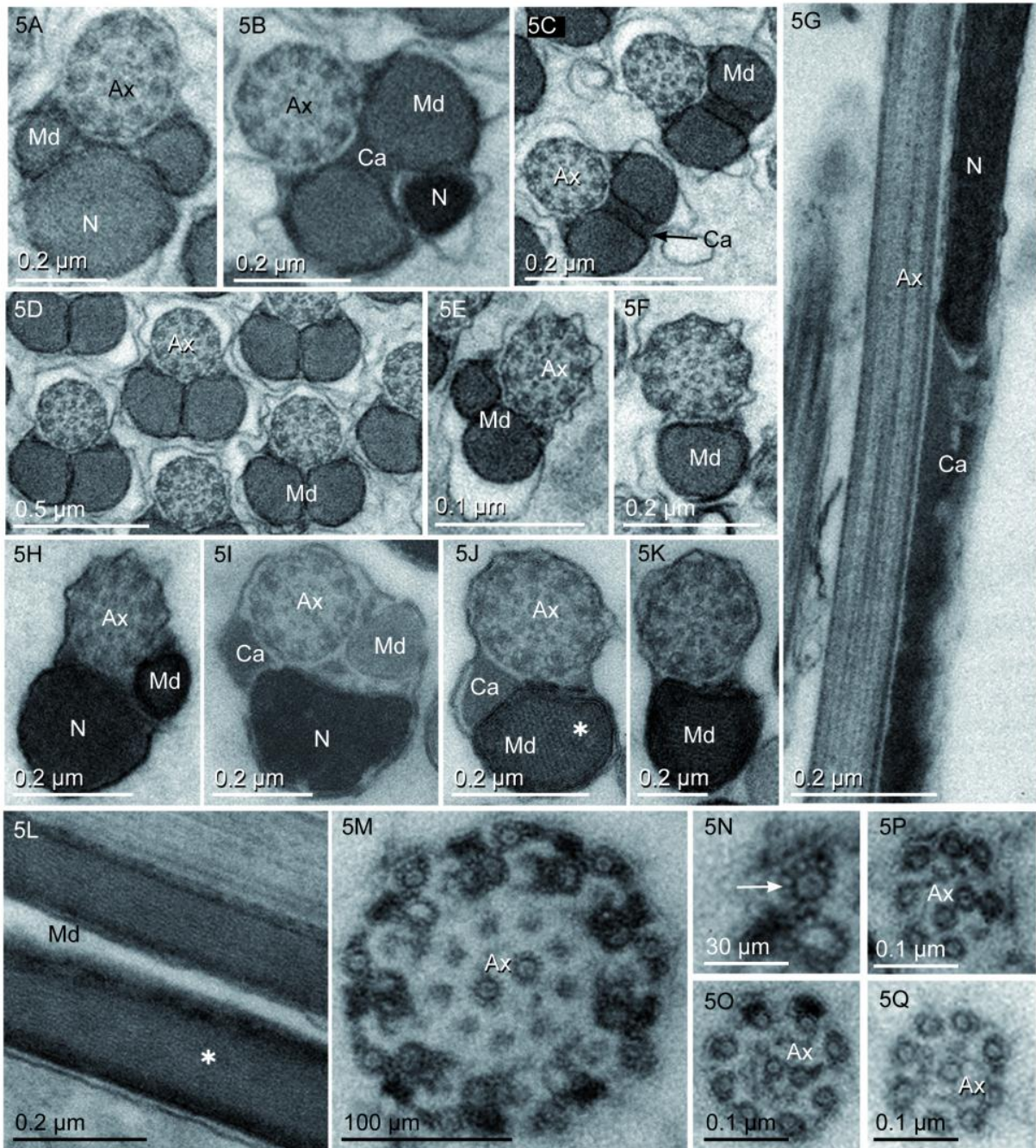


Figura 5. A-Q. MET das regiões nuclear, de justaposição e flagellar nas três espécies analisadas. **A-F.** Secções transversais de espermatozóides de *L. cuprina*. **A.** Ainda na região nuclear é possível observar o axonema (Ax) completo e o início dos derivados mitocondriais (Md) simétricos. **B.** A região de justaposição ('overlap') é marcada pelo aparecimento do adjunto do centríolo (Ca). Nesta região, o núcleo (N) e as estruturas flagelares podem ser observadas. Axonema (Ax), derivados mitocondriais (Md). **C-F.** Região flagelar. **C.** A região do flagelo é marcada pelo desaparecimento do núcleo, aumento do adjunto do centríolo (Ca), presença do axonema (Ax) e derivados mitocondriais (Md). **D-F.** As próximas regiões são caracterizadas pelo desaparecimento do adjunto do centríolo, redução do diâmetro e perda de um dos derivados mitocondriais (Md). **G.** Secção longitudinal do núcleo e região flagellar em *L. eximia*. Nesta região é possível observar o núcleo (N), O adjunto do centríolo (Ca) e o axonema (Ax). **H-K.** Secções transversais dos espermatozóides de *L. eximia* e *L. peruviana*. O material de *L. peruviana* foi obtido de espermateca. **H.** *L. eximia*. Ainda na região nuclear é possível observar o axonema (Ax) completo e o início de apenas um derivado mitocondrial (Md). **I.** Região de justaposição ('overlap') em *L. peruviana*. **J-K.** Região flagellar em *L. peruviana* e *L. eximia*, respectivamente. **L-Q.** *L. eximia*. **L.** Secção longitudinal do derivado mitocondrial (Md), mostrando o material paracristalino (asterisco). **M-Q.** Características do axonema (Ax). **M.** Observação de material intertubular (seta). O axonema em todas as espécies analisadas é formado por nove microtúbulos acessórios, nove duplas periféricas e um par central **N-Q.** Os microtúbulos acessórios (seta) possuem 13 protofilamentos, e na porção final do flagelo pode ser observada a desorganização gradual do axonema (Ax).

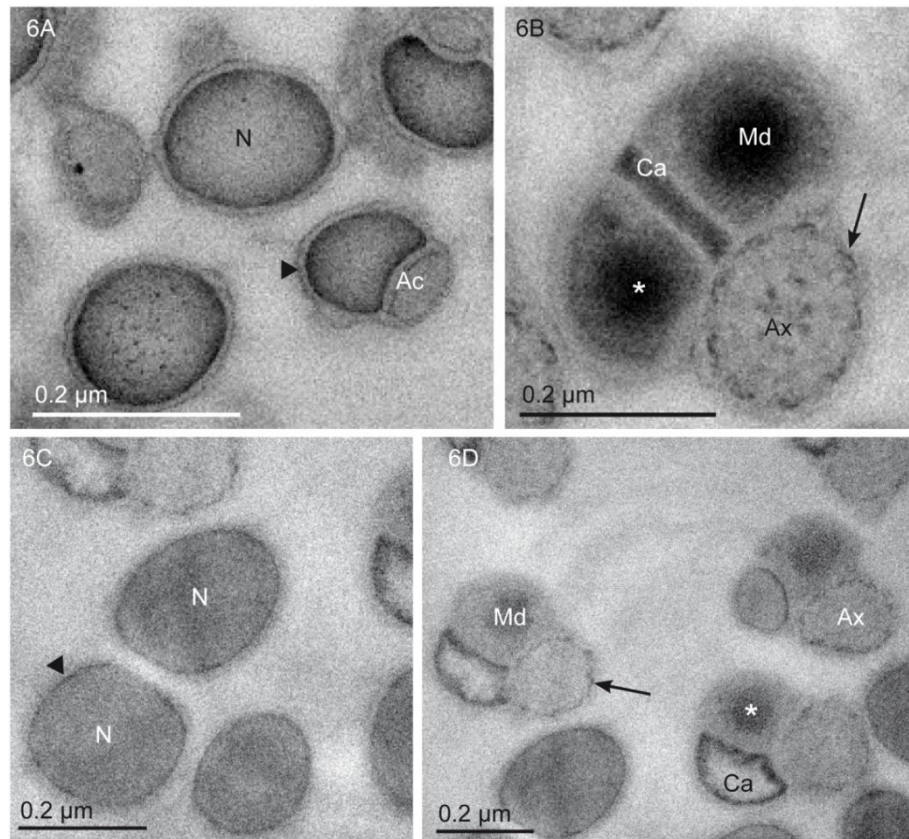


Figura 6. A-D. Secções transversais do testículo de *L. cuprina* e *L. eximia*, submetidos ao método do E-PTA. **A-B.** Na primeira espécie, a periferia do núcleo e o envelope nuclear (cabeça de seta), o material intertubular (seta) o adjunto do centríolo e o material paracristalino (asterisco) são positivos para o método. **C-D.** Na última espécie, a periferia do núcleo e o envelope nuclear (cabeça de seta) são positivos. Nas estruturas flagelares, a região da borda do adjunto do centríolo, o material intertubular (seta) e o material paracristalino (asterisco) são positivos. Acrossoma (Ac), adjunto do centríolo (Ca), axonema (Ax), derivados mitocondriais (Md), núcleo (N).

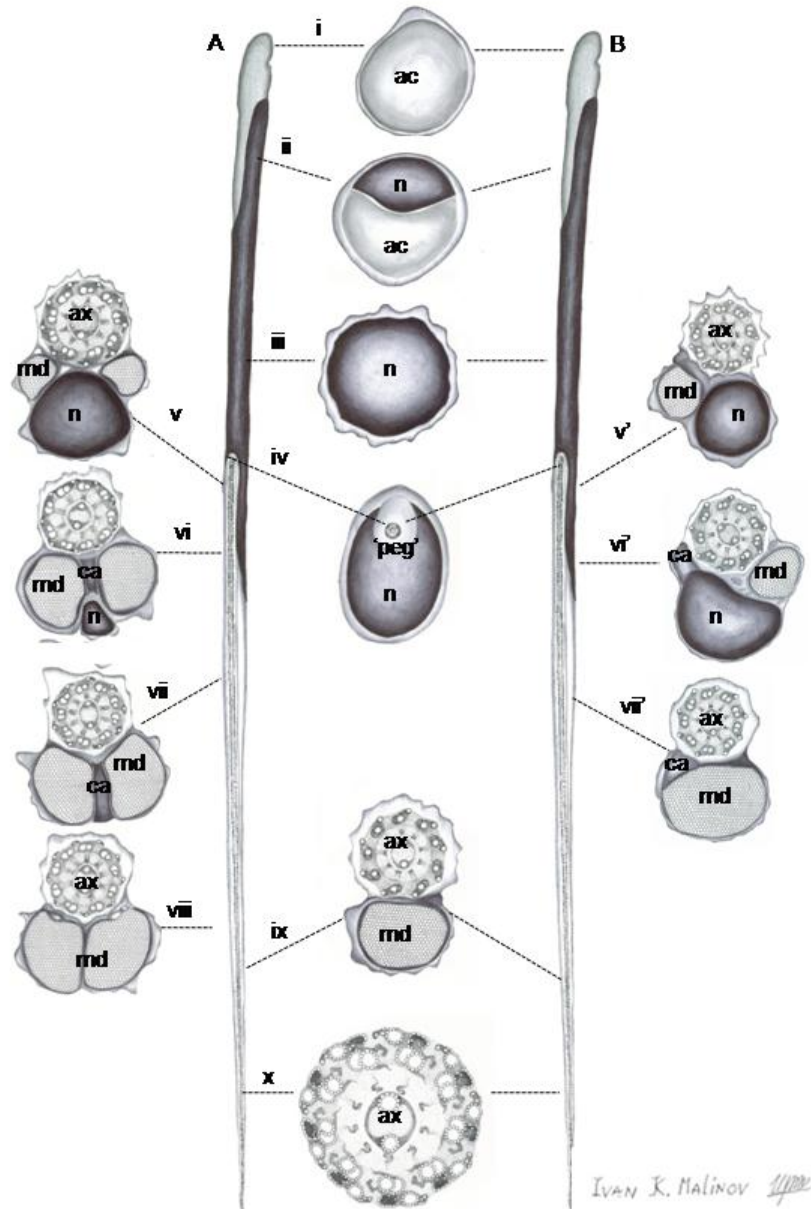


Figura 7. Representação esquemática dos espermatozóides de (A) *L. cuprina*, (B) *L. eximia* e *L. peruviana*, correspondendo às secções longitudinais e transversais. (i) acrossoma; (ii) acrossoma e núcleo; (iii) núcleo; (iv) região de 'peg'; (v, v') início do derivado mitocondrial; (vi, vi') região de justaposição ('overlap'); (vii, vii') início da região flagelar; (viii) final do adjunto do centríolo; (ix, x) região final do flagelo. **Abbreviations:** Acrossoma (ac), axonema (ax), adjunto do centríolo (ca), derivado mitocondrial (md), núcleo (n).

Aspectos Morfológicos e Citoquímicos dos espermatozóides no gênero *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae)

Name, KPO^{a,b}, Barros-Cordeiro, KB^b, Gama Filho, JB^c, Wolff, M^d, Pujol-Luz, JR^e, & Bão, SN^b

^a Programa de Pós-graduação em Biologia Animal; ^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-DF, Brasil; ^c Centro Veterinário Asa Sul, Brasília-DF, Brazil; ^d Grupo de Entomología, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia; ^e Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^a knrna@ig.com.br; ^b karine.brenda22@gmail.com; ^c belar@brturbo.com.br ;

^d marta_wolff@yahoo.com; ^e jrpujol@unb.br; ^b snbao@unb.br

* Artigo resultante das pesquisas realizadas durante o Doutorado. Submetido para publicação no *Journal of Microscopy Research and Technique*, 2012. (Anexo 3).

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi caracterizar, estruturalmente e ultraestruturalmente, o espermatozóide das moscas varejeiras *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria*. Para visualização da ultraestrutura dos microtúbulos e identificação das proteínas básicas, foram utilizadas técnicas como a fixação com solução de ácido tânico e o método citoquímico do ácido etanólico-fosfotúngstico (EPTA). Com a utilização da solução fixadora do ácido tânico foi possível observar um grande número de microtúbulos no citoplasma da célula durante a espermiogênese. Os microtúbulos foram observados em todas as regiões do espermatozóide (região da cabeça, região de justaposição e região do flagelo). A cromatina nuclear possui aspecto elétron lúcido nas duas espécies aqui descritas. A técnica do EPTA destacou a presença de proteínas básicas na borda do núcleo e do envelope nuclear nas duas espécies analisadas; no adjunto do centríolo e na borda dos derivados mitocondriais em *Co. macellaria*. O axonema possui a configuração típica encontrada em insetos, com arranjo microtubular de 9+9+2 microtúbulos e os espermatozóides em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* são similares ao descrito para outros Brachycera. Os espermatozóides são longos e delgados nas duas espécies, com cerca de 190 µm de comprimento, sendo que a região da cabeça mede aproximadamente 26 µm em *Co. hominivorax* e 29 µm em *Co. macellaria*. Foi observado polimorfismo em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*. Essas características são consistentes com a diversidade estrutural dos espermatozóides em dípteros, e constituem uma ferramenta essencial para a compreensão das complexas variações encontradas na família Diptera.

Palavras Chave: Entomologia, Células Germinativas, Espermatozóide de Inseto, Microscopia, Mosca-varejeira.

ABSTRACT - The objective of this study was to characterize, structurally and ultrastructurally, the spermatozoa of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Co. macellaria*. In order to visualize the ultrastructure of microtubules and identify basic proteins, techniques such as the tannic acid fixative and cytochemical method of ethanolic phosphotungstic acid (EPTA) were used. With the tannic acid fixative it was possible to observe a significant number of microtubules in the cell cytoplasm during spermiogenesis. Microtubules were observed in all regions of spermatozoa (head, “overlap” zone and tail). Nuclear chromatin possesses the electron lucent aspect in the two species here described. The EPTA technique highlighted the presence of basic proteins on the border of the nucleus and nuclear envelope in the two species analyzed, and, in the centriolar adjunct and on the border of mitochondrial derivatives in *Co. macellaria*. The axoneme is of a conventional insect type with a 9+9+2 microtubular arrangement and the spermatozoa of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* are similar to those described for other Brachycera. The spermatozoa are long and thin in these two species, about 190 µm in length, of which the head region measures approximately 26 µm in *Co. hominivorax* and 29 µm in *Co. macellaria*. A polymorphism was observed in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*. These features are consistent with the structural diversity of the dipteran spermatozoa, comprising an essential tool for understanding the complex variations found in the Diptera family.

Key words: Entomology, Germ Cells, Insect Sperm, Microscopy, Screwworm fly.

INTRODUÇÃO

A subseção Caliptrata possui aproximadamente 18.000 espécies descritas e este taxon é um dos maiores e mais diversos dentro de Diptera [1]. Ao redor do mundo são conhecidas mais de 1.000 espécies de Calliphoridae (moscas-varejeiras), agrupadas em 150 gêneros e 12 subfamílias [2]. Na região Neotropical existem 130 espécies descritas [3-4].

De acordo com Kutty e colaboradores [1] Calliphoridae apresenta uma grande diversidade ecológica e possui uma ampla variedade de estratégias de história de vida usados tanto pelos adultos quanto pelas larvas (imaturos). Tais estratégias incluem a decomposição de matéria orgânica, parasitismo e predação de vertebrados e invertebrados, causando problemas de saúde e perdas importantes para a indústria pecuária, e ainda fitofagia em uma grande variedade de plantas.

O gênero *Cochliomyia* (Townsend) (Diptera Calliphoridae) é representado por espécies endêmicas no Novo Mundo e quatro espécies neste gênero encontram-se descritas: *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), *Co. aldrich* Del Ponte, *Co. minima* Shannon and *Co. macellaria* (Fabricius). Somente a primeira e a última espécie são encontradas no Brasil [5].

Co. hominivorax é parasita obrigatória de tecido vivo, causadora de miíase primária e considerada uma das pragas mais importantes parasitando rebanhos bovinos na região Neotropical, enquanto *Co. macellaria*, que age como invasor secundário de lesões, é considerado um agente de importância médica e sanitária e tem sido relatada como vetor mecânico de doenças em humanos e outros animais. Estas duas espécies compartilham semelhanças morfológicas e ambas podem ocorrer na mesma lesão, mas em diferentes estágios de desenvolvimento [6].

Estudos recentes têm demonstrado que a morfologia dos espermatozóides em insetos constitui uma ferramenta capaz de fornecer dados úteis para a reconstrução filogenética em vários grupos de insetos, incluindo Diptera [7-11]

O objetivo deste estudo foi caracterizar, estruturalmente e ultraestruturalmente os espermatozóides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*, utilizando técnicas citoquímicas. A maioria dos estudos enfatiza a caracterização morfológica dos espermatozóides nos Diptera braquíceros, mas um pequeno número deles associa a morfologia com a composição química.

O presente estudo se concentra em descobrir a localização de proteínas básicas através do uso do método citoquímico do E-PTA e da observação da distribuição dos microtúbulos usando uma mistura de ácido tânico e glutaraldeído, ambos aplicados à ultraestrutura. Compreender a localização destes componentes na célula espermática pode facilitar a identificação de suas prováveis funções.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Vinte larvas de cada espécie (terceiro instar) de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* foram obtidas de miíases de diferentes raças de cães domésticos no Centro Veterinário Asa Sul, Brasília-DF. Trinta machos adultos selvagens de cada espécie e trinta fêmeas de *Co. macellaria* foram coletados na zona rural de Brasília, Brasil.

Os imaturos das duas espécies foram mantidos na vermiculita para pupariação até seu completo desenvolvimento, e emergência dos espécimes adultos. Os espécimes adultos de *Co. macellaria* foram utilizados para dar início a colônia e posteriormente às análises laboratoriais. Os espécimes adultos de *Co. hominivorax* foram utilizados para dar início as análises laboratoriais. Os espécimes selvagens foram atraídos com carcaças de peixe e carne moída, e coletados com redes entomológicas e armadilhas tipo Van Someren-Rydon.

Em laboratório, as moscas da espécie *Co. macellaria* foram alimentadas com dieta à base de leite em pó, açúcar e levedo de cerveja (1:1:1) solubiizados em água, e água à vontade durante uma semana, e em seguida foi oferecido 100 g de carne bovina moída como substrato para oviposição. Um grande número de ovos foi encontrado em baixo da carne moída e, após um dia foram transferidos para potes plásticos cônicos. Em cada pote plástico foram colocados 20 ovos e 20 g de carne moída bovina fresca, para o completo desenvolvimento dos espécimes (estágio adulto).

Microscopia de Luz

Seis machos das espécies *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* foram dissecados, seus testículos foram rompidos e os espermatozoides espalhados em lâminas histológicas. Em seguida os espermatozoides foram fixados em solução de 4% (wt/vol) de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e as lâminas foram lavadas posteriormente e secas em temperatura ambiente.

Para medição do comprimento total dos espermatozoides e da região do núcleo, essas preparações foram incubadas durante 15 minutos com 0,2µg/ml de 4,6-diamino-2-phenyndole (DAPI) em água, lavadas e montadas com uma solução de ProLong-Gold. As preparações foram então examinadas utilizando os microscópios Axiophot Zeiss® e Confocal Leica SP5 equipados com epifluorescência e com filtro de excitação de 405 nm respectivamente.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Testículos foram fixados em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 1% de ácido tânico em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, seguido de contrastação “*en bloc*” em solução de 1% de acetato de uranila em água destilada [12]. O material foi desidratado em séries crescentes de acetona (30-100%) e embebido em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram examinados sem contrastação, usando microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 a 80 kV.

Para a detecção de proteínas básicas, foi empregado o método do ácido etanólico-fosfotúngstico (E-PTA), modificado de Bloom e Aghajanian [13]. Testículos foram fixados em uma solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio

0,1 M, pH 7,4 por 4 h a 4°C. Após lavagem em tampão fosfato e desidratado em álcool, o material foi tratado “*en bloc*” com uma solução de 2% de PTA em etanol absoluto durante 24 h a 4° C, lavado em etanol absoluto e embebidos em resina Spurr's. Cortes ultrafinos foram observados sem contrastação.

RESULTADOS

Microscopia de Luz (LM)

Os espermatozoides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* são longos, delgados e filiformes, medindo aproximadamente 190 μm de comprimento total, incluindo a cabeça e a região da cauda, nas duas espécies analisadas (Figs. 1A-B). A marcação do núcleo do espermatozoide com DAPI permitiu distinguir com clareza a região da cabeça e do flagelo. O núcleo em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* é longo, medindo cerca de 26 μm e 29 μm , respectivamente, quando marcadas com DAPI e examinadas em microscópio de epifluorescência (Figs. 1C-D).

Foi observado polimorfismo em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* em relação ao comprimento do espermatozoide, onde dentro de um mesmo testículo foram encontrados espermatozoides de diferentes tamanhos. Entretanto, os resultados mostraram que em *Co. hominivorax*, a variação no comprimento dos espermatozoides é maior, ou seja, espermatozoides muito longos e muito curtos são produzidos e encontrados dentro do mesmo testículo. Dados referentes às médias do comprimento da cabeça e da cauda, média do comprimento total do espermatozoide, maior e menor espermatozoide encontrado em cada espécie, são apresentados na Tabela 1.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Os eventos da espermiogênese nas duas espécies são similares. O processo de diferenciação é caracterizado pela formação do acrossoma e do 'nebenkern',

condensação nuclear, alongamento celular incluindo o desenvolvimento do flagelo e perda de citoplasma.

A análise ultraestrutural dos espermatozóides nas duas espécies examinadas demonstrou que tais células são constituídas pelas seguintes regiões: acrossomal, nuclear, de justaposição e flagelar.

A técnica de fixação utilizando ácido tânico nos permitiu observar, em secções transversais, um grande número de microtúbulos distribuídos em todas as regiões do espermatozóide, durante os últimos estágios da espermiogênese (Figs. 2A-F).

Em secções transversais, o formato do núcleo varia de circular a oval e a cromatina é elétron lúcida quando comparada com outras estruturas da célula. O núcleo é completamente circundado por microtúbulos e as membranas acessórias estão presentes nesta região (Figs. 2A-B). O início da implantação (Fig. 2B) e o completo desenvolvimento (2C-D) do axonema podem ser observados em uma região excentricamente localizada no núcleo, onde os microtúbulos centrais (Fig. 2C), periféricos e acessórios presentes no axonema são claramente visíveis (Fig. 2D).

Na região de justaposição ('overlap') observa-se a redução do diâmetro do núcleo e aumento na circunferência dos derivados mitocondriais. O axonema completo pode ser visto, assim como a característica marcante desta região, a emergência do adjunto do centríolo. A região de justaposição é caracterizada pela presença do núcleo e de todas as estruturas flagelares (axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo) (Fig. 2E).

Os resultados observados através da fixação com ácido tânico na região de justaposição foram: o núcleo é elétron lúcido e, os microtúbulos do axonema, o adjunto do centríolo e o material paracristalino dos derivados mitocondriais são elétron densos. Os microtúbulos citoplasmáticos são observados em detalhes e se concentram do lado oposto ao das membranas acessórias (Fig. 2E), quando as mesmas estão presentes.

Em secções transversais da região de justaposição, o adjunto do centríolo das espécies *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* encontram-se circundados pelo núcleo, os derivados mitocondriais e o axonema (Fig. 2E), enquanto na região da cauda, o mesmo aparece entre os derivados mitocondriais, em frente ao axonema (Fig. 2F). Os derivados mitocondriais apresentam-se elétron densos quando comparado ao núcleo (Figs. 2E-F). O adjunto do centríolo é interpretado como sendo uma organela de suporte, centralmente localizada entre as demais estruturas na região de justaposição.

Nas duas espécies estudadas, o axonema apresenta a organização típica de 9+9+2 microtúbulos, sendo um par de microtúbulos centrais, nove duplas de microtúbulos periféricos e nove microtúbulos acessórios (Figs. 2D-F).

Na análise ultraestrutural dos espermatozoides submetidos à metodologia do E-PTA, a concentração de proteínas básicas foi observada na periferia do núcleo e no envelope nuclear nas duas espécies analisadas (Figs. 3A-B). Entretanto, na periferia do núcleo de *Co. hominivorax*, a concentração de proteínas básicas foi maior (Fig. 3A).

Estruturas flagelares de *Co. hominivorax* não mostraram-se positivas para proteínas básicas (Fig. 3C). Entretanto, in *Co. macellaria*, a borda dos derivados

mitocondriais e o adjunto do centríolo são positivos para o método (3D-F). A ausência de proteínas básicas na região do material paracristalino pode ser observada e confirmada em secções longitudinais (Fig. 3E).

DISCUSSÃO

A estrutura do espermatozóide em *Cochliomyia hominivorax* e *Co. macellaria* é similar à descrição geral de espermatozóide de inseto [11, 14-16]. Em ambas as espécies estudadas, os espermatozoides são longos e delgados como na maioria dos Diptera. Nestas espécies foi observado que os espermatozoides apresentam variações significantes no comprimento. Tais variações ocorrem nas regiões da cabeça e da cauda e também no comprimento total dos espermatozoides, caracterizando um polimorfismo.

Polimorfismo é um exemplo de diversificação da morfologia do espermatozóide, onde dois ou mais tipos distintos de espermatozoides são encontrados em um mesmo ejaculado. Polimorfia no espermatozóide pode incluir diferenças na morfologia, no comprimento total dos espermatozoides, ou ainda, comprimento diferente em algumas estruturas, ou diferença nas funções [17-18].

O tipo de polimorfismo mais comum nos espermatozoides de insetos está relacionado ao comprimento do núcleo e do flagelo. No grupo de *Drosophila* é comum encontrar machos produzindo duas ou mais classes morfológicas de espermatozoides no conteúdo ejaculado por um único macho [11, 17]. Embora o comprimento do espermatozóide possa variar de acordo com as espécies examinadas, a exposição a ambientes de desenvolvimento estressantes, incluindo temperatura relativamente alta, tem demonstrado um aumento da variação do comprimento do espermatozóide em machos de *Scathophaga stercoraria* [19].

Co. hominivorax e *Co. macellaria* produzem espermatozoides com mais de um comprimento em um mesmo testículo. Quando analisado em microscopia de luz, foi observado que o espermatozóide exibe variações de comprimento na cabeça e

na cauda. Em *Co. hominivorax* os dados mostram uma grande variação no comprimento total dos espermatozóides em um mesmo testículo, enquanto em *Co. macellaria* as regiões das cabeças são maiores. Polimorfismo no comprimento do espermatozóide foi observado também em outros Calliphoridae. Nas espécies *Lucilia cuprina* e *Lucilia eximia*, foi observada uma variação significativa no comprimento dos espermatozóides [20], enquanto em *Chrysomya megacephala* essas variações não foram observadas [21]. Este é o tipo mais comum de polimorfismo descrito em insetos [22] e tem sido documentado em vários grupos de invertebrados [23-24].

Espermiogênese em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* é similar ao já descrito em outros dípteros e não difere marcadamente do que acontece em outras ordens de insetos [11, 14, 20-21, 25-26].

Nos espermatozóides das duas espécies estudadas, a cromatina nuclear apresenta-se elétron lúcida quando fixada com ácido tânico. Quando tratada com E-PTA, somente a periferia do núcleo e o envelope nuclear de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* apresentaram reação positiva. Esse aspecto foi observado também nos espermatozóides de *L. cuprina* e *L. eximia* [20], enquanto em *C. megacephala* o núcleo apresentou-se completamente positivo para o método [21].

As duas membranas acessórias observadas próximas ao núcleo nas espermátides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* também estão presentes nas espermátides de outros Calliphoridae [21-22]. Tais estruturas podem ser observadas paralelas ao envelope nuclear, estendendo-se ao longo do núcleo. Com o aumento da condensação da cromatina nuclear no final da espermiogênese, as membranas acessórias tendem a desaparecerem.

A região posterior do núcleo nas espécies estudadas possui uma característica peculiar, observada em secção longitudinal e transversal, que é a região de implantação do axonema (região de “peg”), seguida do surgimento das demais estruturas flagelares. Exatamente abaixo da região de implantação do axonema no núcleo, o axonema completo pode ser observado.

Nas duas espécies estudadas, as estruturas que formam a região de justaposição (núcleo, axonema, derivados mitocondriais e adjunto do centríolo) podem ser observadas tanto na espermiogênese quanto no espermatozóide. Descrições detalhadas desta região podem ser encontradas em *M. scalaris*, *C. megacephala* e *L. cuprina* [20,21,27].

A região do flagelo é marcada pelo completo desaparecimento do núcleo e pelo aumento de tamanho do adjunto do centríolo. Acredita-se que o papel desta estrutura na maioria dos insetos seja a de dar suporte mecânico, estabilizando a inserção do axonema na base do núcleo e ancorando os derivados mitocondriais um de cada lado do axonema [11,16].

O adjunto do centríolo em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* é relativamente longo e apresenta moderada elétron densidade, padrão também observado em outras espécies de Brachycera [20,21,28]. Essa estrutura foi observada na região de justaposição (em secções transversais), circundada pelo núcleo e pelas estruturas flagelares (axonema, derivados mitocondriais) e na região da cauda, entre os derivados mitocondriais.

Os estágios iniciais da formação do flagelo estão associados ao acúmulo e fusão das mitocôndrias formando o ‘nebenkern’. Posteriormente, o ‘nebenkern’ se dividirá dando origem a dois derivados mitocondriais [14, 28], quase totalmente

preenchidos por uma proteína que apresenta organização paracristalina tridimensional – a cristalomitina [29].

O perfil observado para tal organela em *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* foi o mesmo encontrado em *C. megacephala* e *L. cuprina* [20,21], e diferente do descrito para *L. eximia* e *L. peruviana* [20].

De acordo com Dallai *et al.* [30], as estruturas do axonema dos espermatozóides em Brachycera são relativamente uniformes, enquanto na subordem Nematocera existe uma diversidade considerável, maior do que em qualquer outra ordem de insetos. Como esperado e encontrado para a maioria dos Brachycera estudados [11, 21, 30], o axonema nas duas espécies estudadas possui o arranjo de 9+9+2 microtúbulos, semelhante ao descrito para a maioria dos insetos [31].

Na região da cauda do espermatozóide de *Co. hominivorax* todas as organelas se mostraram negativas para o método do ácido etanólico-fosfotúngstico. Na espécie *Co. macellaria* as proteínas básicas estavam presentes no adjunto do centríolo e nas bordas dos derivados mitocondriais. Juntos, esses aspectos observados nas duas espécies do gênero *Cochliomyia* possuem características distintas das observadas em outros Diptera descritos [20,21,32].

CONCLUSÕES

Com base nas características observadas neste trabalho, a morfologia dos espermatozóides nas duas espécies de *Cochliomyia* são similares à maioria dos *Brachycera* [11]. No entanto, algumas diferenças foram encontradas: o polimorfismo no comprimento dos espermatozóides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria* que indica a existência de um grande número de espermatozóides longos e curtos em cada uma das espécie e, as diferenças observadas na ultraestrutura dos espermatozóides como a presença ou ausência de proteínas básicas (método do E-PTA). Assim sendo, as características morfológicas analisadas são dados consistentes que ilustram a diversidade estrutural dos espermatozóides de dípteros, podendo fornecer um sistema de caracteres para serem usados em associação com outras ferramentas na solução de várias incertezas sobre as relações de parentesco deste grupo de insetos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- 1 Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM and Meyer R (2010) Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Sys Entomol.* **35**, 614-635.
- 2 Rognes K (1997) The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group *Cladistics* **13**, 27-68.
- 3 Carvalho CJB and De Mello-Patiu CA (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol.* **52 (3)**, 390-406.
- 4 Pape T, Wolff M and Amat EC (2004) Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* **5 (2)**, 201-208.
- 5 Guimarães JH and Papavero N (1999) *Miíasis in man and animals in Neotropical region*. (São Paulo. Editora Pleiade/FAPESP).
- 6 Litjens P, Lessinger AC and Lima de Azeredo-Spin AM (2001) Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med. Vet. Entomol.* **15**, 183-188.
- 7 Baccetti B (1987) Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects. In: *Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects*. Ed. Baccetti B. (Ellis Harwood Limited Chichester UK).
- 8 Carcupino M, Profili G, Kathirithamby J and Mazzini M (1995) Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mem Mus Natn Hist Nat.* **166**, 291-296.
- 9 Dallai R and Afzelius BA (1995) Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: *Advances in Spermatozoal*

Phylogeny and Taxonomy, ed. Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L. Mem Mus Natn Hist Nat. **166**, 565p.

10 Jamieson BGM, Ausio J and Justine JL (1995) In: *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy* . Mem Mus Natn Hist Nat. **166**, 565 p.

11 Jamieson BGM, Dallai R and Afzelius BA (1999) *Insects: their spermatozoa and phylogeny* (Enfield, New Hampshire USA - Science Publishers Inc.)

12 Afzelius BA (1988) Microtubules in the spermatids of stick insects. *J Ultrastruct Mol Struct Res.* **98**, 94-102.

13 Bloom FE and Aghajanian GK (1968) Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res.* **22**, 361-375.

14 Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* **44**, 243-277.

15 Baccetti B (1972) Insect Sperm Cell. *Adv Insect Physiol.* **9**, 315-397.

16 Jamieson BGM (1987) *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. (Cambridge University Press, Cambridge, pp. 205-208).

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

18 Pitnick S, Hosken DJ and Birkhead TM (2009) Sperm morphological diversity. In: *Sperm Biology – An Evolutionary Perspective*, ed. Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S. (Academic Press Elsevier, UK. pp. 69-149).

19 Hellriegel B and Blackenhorn WU (2002) Environmental influences on the gametic investment of yellow dung fly males. *Evol. Ecol.* **16**, 502-522.

- 20** Name KPO, Barros-Cordeiro KB, Gama Filho JB, Wolff M, Pujol-Luz JR and Bao SN (2012) Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermiogenesis in three species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *J. Morphol* **273**, 160-172.
- 21** Name KPO, Pujol-Luz JR and Bao SN (2010) Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* **41**, 853-860.
- 22** Sivinski J (1980) Sexual selection and insect sperm. *Florida Entomologist* **63**, 99-111.
- 23** Rosati F, Baccetti B and Dallai R (1970) The spermatozoon of Arthropoda. X. Araneid and the lower myriapods. In: *Comparative Spermatology*, ed. B. Baccetti, pp. 247-254 (Academic Press, New York, USA).
- 24** Jamieson BGM (1986) The spermatozoa of Chilopoda (Uniramia): an ultrastructural review with data on the dimorphism in *Ethmostigmus rubripes* and phylogenetic discussion. *J. Submicrosc. Cytol.* **18**, 543-558.
- 25** Ndiaye M, Mattei X and Thiaw OT (1996) Spermatogenesis in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Submicrosc Cytol Pathol.* **28**, 375-384.
- 26** Dallai R, Carapelli A, Nardi F, Fanciulli PP, Lupetti P, Afzelius BA and Frati F (2004) Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae: Zygentoma: Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in Zygentoma. *Tissue Cell* **36**, 233-244.
- 27** Curtis SK, Benner DB and Musil G (1989) Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *J Morphol* **200**, 47-61.

- 28** Warner FD (1971) Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrastruct Res.* **35**, 210-232.
- 29** Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosatti F and Afzelius BA (1977) Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J Cell Biol* **73**, 594-600.
- 30** Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S and Afzelius BA (1993) The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zool Scripta* **22**, 193-202.
- 31** Dallai R and Afzelius BA (1990) Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J Struct Biol.* **103**, 164-179.
- 32** Bao SN, Lins U, Farina M and De Souza W (1992) Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon. Some new aspects evidenced by cytochemistry and Image Processing. *J Struct Biol.* **109**, 46-51.

Tabela 1. Dimensões e médias dos espermatozóides nas espécies de *Cochliomyia* analisadas.

| Espécies | Cabeça | Flagelo | Comprimento Total |
|------------------------|--|--|---|
| <i>Co. hominivorax</i> | 26.86 μm (n = 50, SD = 5.05) | 167.07 μm (n = 50, SD = 44.24) | 190.08 μm (108.03 – 311,97 μm) (n = 50, SD = 44.74) |
| <i>Co. macellaria</i> | 29.05 μm (n = 50, SD = 3.37) | 162.08 μm (n = 50, SD = 15.71) | 190.09 μm (144.23 – 227.07 μm) (n = 50, SD = 14.92) |

Media e desvio padrão (**SD**). Número de espermatozóides analisados (**n**).

FIGURAS

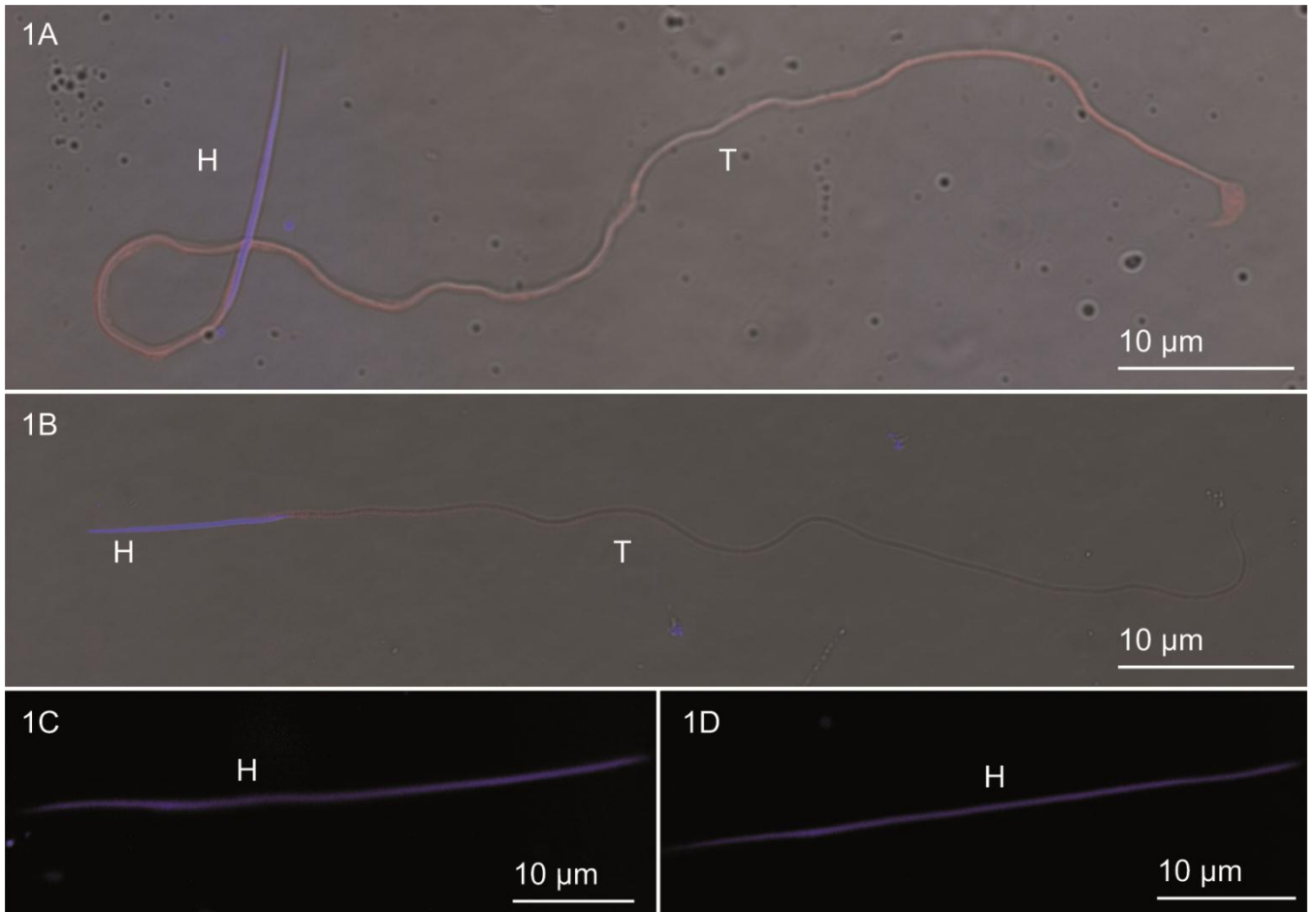


Figura 1. Microscopia de luz dos espermatozoides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*. Espermatozoides marcados com a lectina Concanavalin-A (conjugada com texas red). **(A-B)**. Comprimento total dos espermatozoides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*, respectivamente. **(C-D)**. Região da cabeça das duas espécies previamente descritas, respectivamente, marcadas com DAPI. Cabeça (H) e flagelo (T).

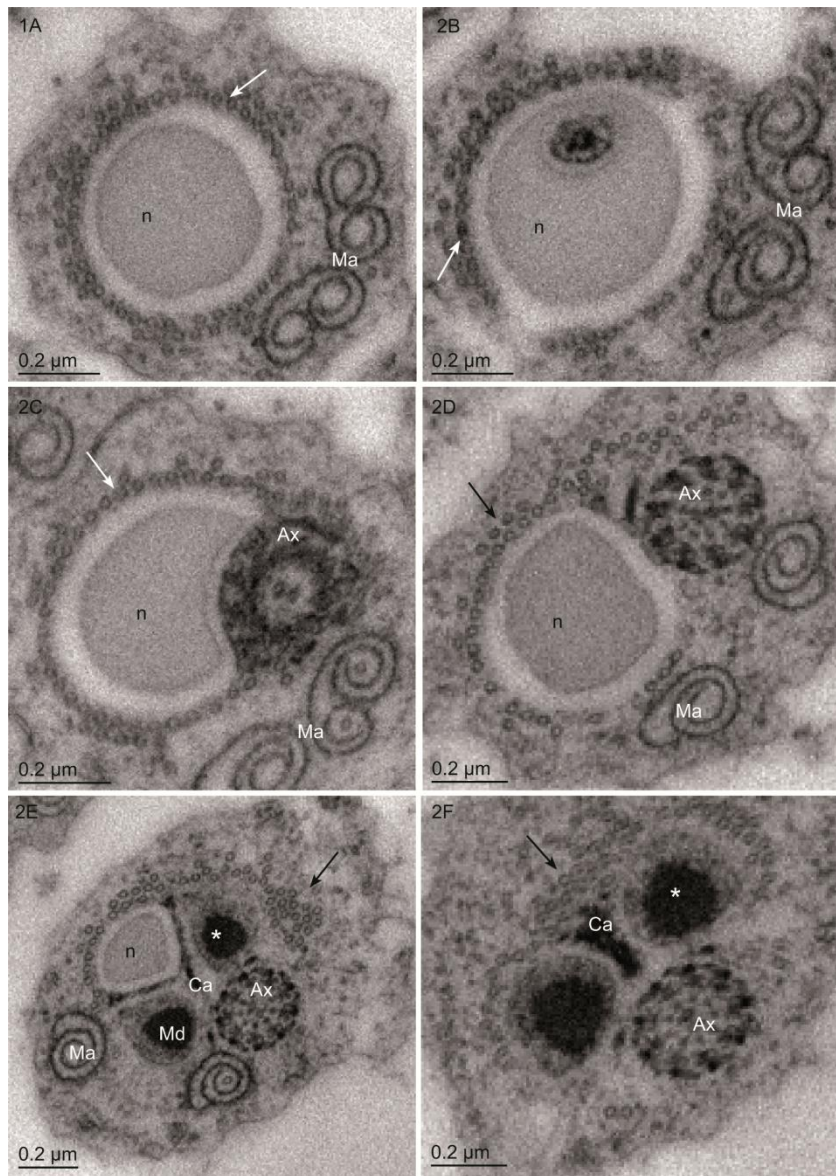


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de espermátides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*. **(A-D)**. Secções transversais da região da cabeça. **(A)**. Núcleo circundado por microtúbulos (seta). **(B-D)**. Implantação e completa emergência do axonema na região nuclear. **(E)**. Na região de justaposição foram observadas as membranas acessórias e os microtúbulos (seta). Essa região é marcada pela emergência do adjunto do centríolo. O material paracristalino é observado (asterisco). **(F)**. Região do flagelo na espécie *Co. hominivorax*. Presença de microtúbulos citoplasmáticos e ausência de membranas acessórias. Axonema com arranjo microtubular 9+9+2. Axonema (Ax), adjunto do centríolo (Ca), núcleo (n), membranas acessórias (Ma) e derivados mitocondriais (Md).

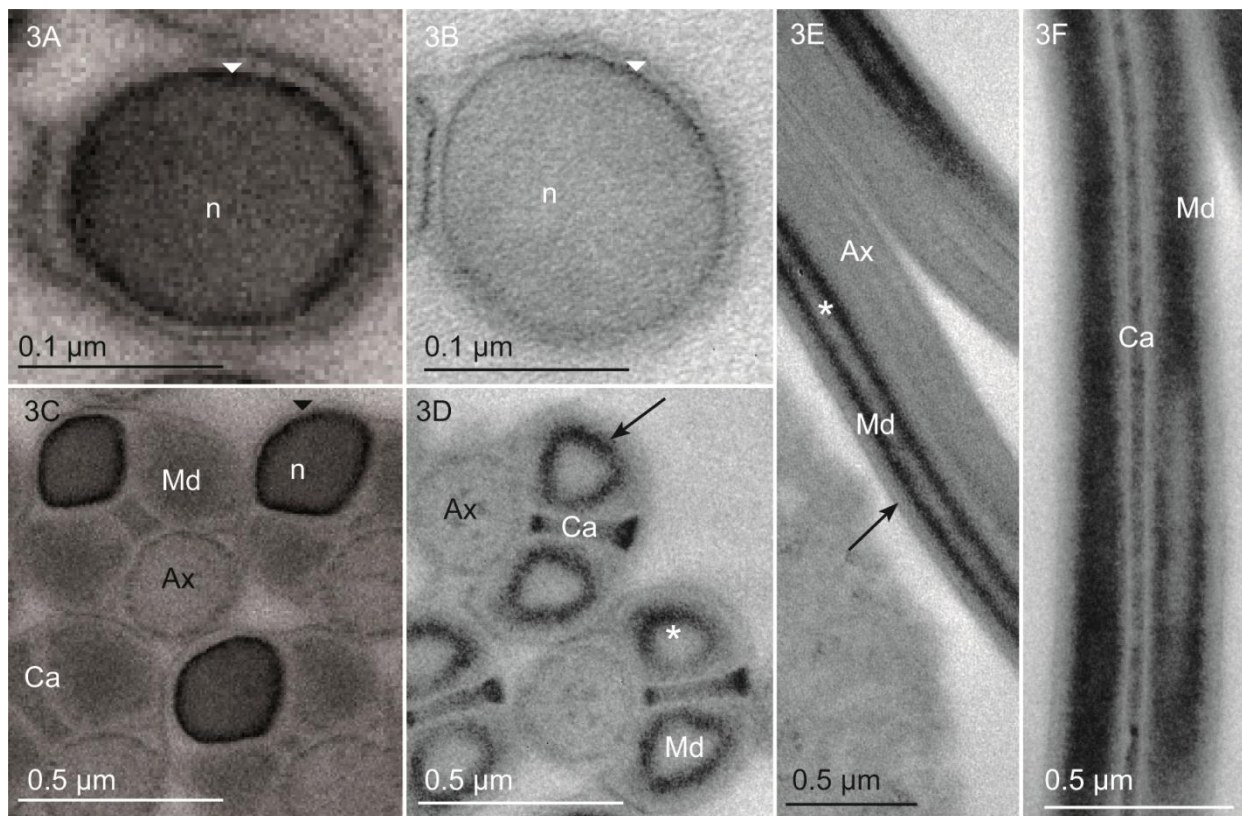


Figura 3. A-F. Secções transversais e longitudinais de espermatozóides de *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*, submetidos ao método do E-PTA. (A-C). Na primeira espécie, somente a periferia do núcleo e o envelope nuclear (cabeça de seta) são positivos para o método. (B-D). Na última espécie, a periferia do núcleo e o envelope nuclear (cabeça de seta) são positivos. Nas estruturas flagelares, somente a região da borda do derivado mitocondrial (seta) e o adjunto do centríolo são positivos. A estrutura paracristalina (asterisco) apresentou-se negativa para o método. Axonema (Ax), Adjunto do centríolo (Ca), núcleo (n), derivados mitocondriais (Md).

Análise Citoquímica de Carboidratos nas Espermátides e nos Espermatozóides de Califorídeos do Cerrado (Diptera: Calliphoridae)

Name, KPO^{a,b}, Barros-Cordeiro, KB^b, Pujol-Luz, JR^c, & Bão, SN^b

^a Programa de Pós graduação em Biologia Animal; ^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-DF, Brasil; ^c Núcleo de Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^a knrna@ig.com.br; ^b karine.brenda22@gmail.com; ^c jrpujol@unb.br; ^b snbao@unb.br

RESUMO – A família Calliphoridae possui distribuição mundial e algumas espécies descritas neste trabalho são cosmopolitas. As espécies *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria*, *Lucilia cuprina* e *Lucilia eximia* estão presentes na dipterofauna do Cerrado na região central do Brasil. Pesquisas envolvendo espermatozóides têm demonstrado a ampla diversidade dessas células tanto na morfologia quanto na sua composição de carboidratos. No espermatozóide, os carboidratos participam do processo de reconhecimento molecular e interação entre gametas. Em insetos esse mecanismo de interação ainda não é bem compreendido. Neste estudo fornecemos as primeiras evidências moleculares da presença de diferentes resíduos de carboidratos em espermatozóides de oito espécies de Calliphoridae. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que os resíduos de carboidratos terminais marcados pelas lectinas: Con-A, HPA, PNA, WGA, ULEX-I e GS-II são expressos em diferentes intensidades tanto na superfície da membrana plasmática quanto em todo o citoplasma da célula, nas espermátides. Nos espermatozóides o perfil de marcação apresenta variações entre as espécies, podendo estar presentes na região do acrossoma, do núcleo ou do flagelo, ou ainda em toda a extensão da célula.

Palavras Chave: Calliphoridae, Carboidratos, Glicoconjugados, Lectinas.

ABSTRACT - The family Calliphoridae is distributed worldwide, and some species analyzed in this work are cosmopolitan. The species *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria*, *Lucilia cuprina* and *Lucilia eximia* are present in the dipterofauna of the savanna like biome of Central Brazil. Research involving sperm has shown the wide diversity of these cells in both morphology and sugar composition. In the sperm cell the carbohydrate may be involved in the process of recognition and gamete interaction, and this interaction mechanism is not well understood in insects. In this study we provide the first molecular evidence of the presence of different carbohydrate residues in spermatozoa of eight species of Calliphoridae. The results of this study indicated that the terminal carbohydrate residues marked by the lectins: Con A, HPA, PNA, WGA, Ulex-I and GS-II are expressed in different intensities both on the surface of the plasma membrane and throughout the cell cytoplasm, in spermatids. In the spermatozoa binding profile varies between species, and may be present in the region of the acrosome, the nucleus or flagellum, or along the entire length of the cell.

Key words: Calliphoridae, Carbohydrate, Glycoconjugates, Lectin Binding.

INTRODUÇÃO

A subseção Caliptrata possui aproximadamente 18.000 espécies descritas e este taxon é um dos maiores e mais diversos dentro de Diptera (Kutty *et al.* 2010). Ao redor do mundo já foram identificadas aproximadamente 1.500 espécies de Calliphoridae (moscas-varejeiras), agrupadas em 97 gêneros (Pape *et al.*, 2011). Na região Neotropical são conhecidas 126 espécies, distribuídas em 28 gêneros (Amorim *et al.* 2002). A família é representada no Brasil por 36 espécies endêmicas pertencentes a 14 gêneros (Mello 2003).

De acordo com Kutty e colaboradores (2010), Calliphoridae apresenta uma grande diversidade ecológica e possui uma ampla variedade de estratégias de história de vida, usados tanto pelos adultos quanto pelas larvas (imaturos). Tais estratégias incluem a decomposição de matéria orgânica, parasitismo e predação de vertebrados e invertebrados, causando problemas de saúde e perdas importantes para a indústria pecuária, e ainda fitofagia em uma grande variedade de plantas.

As espécies utilizadas neste trabalho fazem parte da dipterofauna do Cerrado brasileiro (Biavati *et al.*, 2010; Cansi *et al.*, 2011; Kosmann *et al.*, 2011) e encontram-se distribuídas nos gêneros *Chrysomya*, *Cochliomyia*, *Chloroproctaa*, *Hemilucilia* e *Lucilia*.

Observações a cerca dos aspectos evolutivos do espermatozóide e sua especificidade, têm feito com que a utilização de sua ultraestrutura seja amplamente aceita em estudos de filogenia e taxonomia, por demonstrar eficiência na resolução de arranjos taxonômicos (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999). Uma vez que os dados referentes aos caracteres morfológicos destas células são usados em associação com dados moleculares, citoquímicos e da morfologia externa, o

conjunto de dados obtidos torna-se mais consistente e confiável para a compreensão das relações filogenéticas.

Carboidratos desempenham papel importante no reconhecimento entre gametas e no processo de fertilização (Perotti *et al.*, 2001; Intra *et al.*, 2006); na diferenciação e maturação celular (Dmjanov, 1987); no reconhecimento e adesão celular (Sharon & Lis, 1989) e na interação célula-célula (Wassarman, 1989). A localização das glicoproteínas na superfície celular tem sido analisada por diferentes métodos, no entanto, localização por meio de lectinas tem sido preferencialmente utilizada pela alta especificidade destas substâncias em reconhecer diferentes açúcares terminais dos carboidratos da superfície celular (Koehler, 1981).

O objetivo deste trabalho foi observar a distribuição dos carboidratos na superfície das espermátides e dos espermatozóides de várias espécies de moscas-varejeiras da família Calliphoridae, utilizando para isso, lectinas conjugadas com fluoróforos para marcação específica dos resíduos de carboidratos (Tabela 1).

MATERIAIS E MÉTODOS

Das oito espécies envolvidas neste estudo, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Lucilia cuprina* e *Lucilia eximia* foram obtidas em áreas urbanas do Distrito Federal, enquanto *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* foram obtidas em áreas rurais na região do Entorno. As espécies *Chloroprocta idioidea* e *Hemilucilia segmentaria* foram capturadas na Reserva Ecológica do IBGE – RECOR. Os espécimes selvagens utilizados neste estudo foram atraídos com carcaças de peixe e carne moída, e coletados com redes entomológicas e armadilhas tipo Van Someren-Rydon.

Dez machos de cada uma das espécies estudadas foram dissecados, seus testículos rompidos e os espermatozóides espalhados em lâminas histológicas. Em seguida os espermatozóides foram fixados em solução de 4% (wt/vol) de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 30 minutos. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar em temperatura ambiente. Logo após, foram armazenadas em porta lâminas, os quais foram vedados com parafilm e armazenadas em geladeira por vários meses.

Os grupamentos livres de aldeídos foram bloqueados com cloreto de amônia 0,1M em tampão fosfato salino (PBS), pH 8,2, por aproximadamente 60 minutos (sem agitação). Após lavagem em mesmo tampão, os espermatozóides foram incubados em temperatura ambiente, na ausência de luz por 40 minutos em solução de 100µg/ml de lectina conjugada com fluoróforo.

As lectinas utilizadas foram: *Concanavalin A* (Con-A) conjugada com Texas Red, preparada em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M (pH \cong 8,2), com adição de 2 mM azida de sódio (concentração final); *Helix pomatia* (HPA) conjugada com Alexa

Fluor 488 preparado em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,2; *Arachis hypogaea* (PNA) conjugada com Alexa Fluor 488 solubilizada em água deionizada com adição de 2 mM de azida de sódio (concentração final); *Ulex europaeus* I (UEA-I) conjugado com FITC e preparado em solução de cloreto de sódio 0,9% (soro fisiológico); *Triticum vulgare* (WGA) conjugada FITC preparada em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH \cong 7,2 e *Griffonia simplicifolia* II (GSII) conjugada com Alexa Fluor 488, preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% (soro fisiológico) pH \cong 7,2 com adição de 1,0 mM de cloreto de cálcio e ainda, azida de sódio (concentração final 2mM). As informações referentes ao preparo das soluções foram obtidas dos fabricantes (UEA-I e WGA – Sigma; Con-A, HPA, GS-II e PNA – Invitrogen).

Depois de incubadas com as lectinas e lavadas, as lâminas foram também incubadas com DAPI (diluição: 1:50 em água destilada), em temperatura ambiente por 20 minutos, seguido de lavagem em água destilada, secagem e montagem com Pro-Long Gold (reagente anti-fade do laboratório Sigma). Após montadas, as lâminas foram armazenadas em freezer ao abrigo da luz, observadas e fotografadas utilizando o Microscópio Confocal Leica SP5 – equipado com filtros específicos para os comprimentos de onda dos diferentes fluoróforos utilizados.

RESULTADOS

As seis lectinas utilizadas Con-A, GS II, HPA, PNA, UEA-I e WGA mostraram uma ampla variedade de perfis de marcação dos resíduos de carboidratos nas espermatídes e nos espermatozóides das oito espécies analisadas de Calliphoridae (Tabelas 2, 3 e 4).

O perfil de marcação, que variou tanto nas espermatídes quanto nos espermatozóides, foi interpretado como presente (+) ou ausente (-) (Tabelas 2 e 4). Nas espermatídes, sua intensidade foi caracterizada como baixa (*), moderada (**), e alta (***) (Tabela 3). O perfil de classificação depende não apenas da quantidade de cada carboidrato presente na célula, mas também de onde o mesmo foi encontrado – superficialmente na membrana plasmática, no interior da célula, ou ainda, em ambas as regiões.

Espermatídes apresentaram-se, na maioria das vezes marcadas (Tabela 2), e também demonstraram intensidade maior de marcação do que os espermatozóides. Por outro lado, além da diferença de intensidade, nos espermatozóides de algumas espécies, a marcação pode ser vista apenas na região da cabeça, incluindo ou não o acrossoma; apenas na região do flagelo, ou ainda, em toda a extensão da célula (Tabela 4).

Resíduos dos carboidratos N-acetil-D-galactosamina (de *Helix pomatia* - HPA), D-manose (de *Canavalia ensiformes* – Con-A), D-galactose (de *Arachis hypogaea* - PNA), β -N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuramínico (de *Triticum vulgare* - WGA) e α - e β -N-acetil-glucosamine (de *Griffonia simplicifolia* II – GS-II) foram observados, em quantidades variáveis, nas espermatídes de todas as espécies estudadas. Resíduos do carboidrato α -L-fucose (obtido de *Ullex europaeus*

I – UEA I) não esteve presente em apenas uma espécie estudada, *Chrysomya albiceps*, sendo encontrado nas demais espécies.

O carboidrato N-acetyl-D-galactosamina (HPA) foi observado em altas concentrações na membrana plasmática da espermátide da espécie *Chloroprocta idioidea* (Figs. 1A) e em concentrações moderadas nas espécies *Lucilia cuprina* e *L. eximia*. Resíduos deste carboidrato foram encontrados por toda a célula, em altas concentrações, nas espécies *Chrysomya albiceps* e *Cochliomyia hominivorax* e em concentrações moderadas nas espécies *Chrysomya megacephala*, *Cochliomyia macellaria* e *Hemilucilia segmentaria*.

D-manose (Con-A) foi observado, em baixas concentrações, tanto na membrana quanto no interior da célula em *L. cuprina* (Figs. 1B). Resíduos deste carboidrato foram encontrados em concentrações moderadas em toda a célula nas espécies *C. megacephala*, *C. idioidea* e *H. segmentaria*. Em altas concentrações foi observado em *C. albiceps*, *Co. hominivorax*, *Co. macellaria* e *L. eximia*.

Resíduos do carboidrato D-galactose (PNA) estão presentes em altas concentrações por todo o citoplasma da espermátide em *C. megacephala* (Figs. 1C), *Co. macellaria* e *L. eximia*. Nas espécies *C. albiceps*, *C. idioidea*, *L. cuprina* e *H. segmentaria*, o referido carboidrato também se distribui por todo o citoplasma da célula, em concentrações moderadas, enquanto em *Co. hominivorax* a concentração observada foi baixa.

As espécies *L. eximia* (Figs. 2A), *H. segmentaria*, *L. cuprina*, *Co. hominivorax*, *Co. macellaria* e *C. idioidea* apresentaram resíduos de α -L-fucose (UEA-I) em toda a célula, sendo que nas duas primeiras espécies a concentração foi alta e nas demais, as concentrações encontradas foram baixas. Em *C. megacephala* a concentração

encontrada foi moderada e *C. albiceps* é a única espécie onde esse carboidrato está ausente.

Em *Co. hominivorax* (Figs. 2B), *L. eximia*, *Co. macellaria* e *H. segmentaria* resíduos dos carboidratos β -N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuramínico (WGA) foram encontrados em altas concentrações por toda a célula, enquanto nas espécies *C. megacephala* e *Co. macellaria* tais carboidratos estão presentes apenas na região da membrana plasmática. Em *C. idioidea* ele está presente em concentração moderada em toda a célula e nas espécies *C. albiceps* e *L. cuprina* está presente apenas na região da membrana.

Nas espécies *H. segmentaria* (Figs. 2C), *Co. hominivorax* e *L. eximia*, foram encontrados resíduos de α -e β -N-acetil-glucosamina (GS-II) em toda a célula em altas concentrações, enquanto em *C. megacephala*, *Co. macellaria* e *L. cuprina* mesmo estando presente em toda a célula, sua concentração é moderada. Em *C. idioidea* tal carboidrato foi encontrado em concentração moderada apenas na membrana plasmática. Esse resíduo de açúcar foi observado ainda, em baixas concentrações, na espécie *C. albiceps*.

Nos espermatozóides a análise do perfil de marcação dos carboidratos foi feito levando em consideração sua localização na referida célula (Tabela 4).

O carboidrato N-acetil-D-galactosamina (HPA) foi observado tanto na região da cabeça quanto na região flagelar das espécies *C. megacephala*, *C. albiceps*, *Co. hominivorax*, *H. segmentaria* e *L. cuprina*. Nas espécies *C. idioidea* (Figs. 3A) e *L. eximia* tais resíduos são encontrados apenas na região da cabeça. Em *Co. macellaria* este carboidrato não estava presente. Foi observada ainda, a presença

do carboidrato em questão na região do acrossoma das espécies *C. albiceps*, *C. idioidea*, *Hemilucilia segmentaria*, *L. cuprina* e *L. eximia* (Tabela 4).

Das oito espécies envolvidas neste estudo, somente em *C. idioidea* e *L. cuprina* foram observadas a presença, na região da cabeça e do flagelo, de resíduos do carboidrato α -e β -N-acetil-glucosamina (GS-II). Na espécie *H. segmentaria* e *C. albiceps*, tal carboidrato está presente apenas na região da cabeça, enquanto em *Co. hominivorax* ele está presente apenas na região do flagelo (Figs. 3B). Nas demais espécies (*C. megacephala*, *Co. macellaria* e *L. eximia*) tal resíduo não foi observado.

Resíduos de D-manose (Con-A) foram observados na região da cabeça e do flagelo em *C. albiceps*, *Co. hominivorax* (Figs. 4A), *Co. macellaria*, *C. idioidea* e *H. segmentaria*. Nas espécies *C. megacephala* e *L. cuprina* tais resíduos não foram observados, e em *L. eximia* encontra-se presente apenas na região do flagelo.

Resíduos de D-galactose (PNA) foram observados na região da cabeça e do flagelo das espécies *C. megacephala*, *C. albiceps*, *Co. hominivorax*, *Co. macellaria* (Figs. 4B), *L. cuprina* e *L. eximia*. Na espécie *H. segmentaria* tais resíduos estavam presentes na região da cabeça, mas ausente na região do flagelo. Em *C. idioidea* tais resíduos não foram encontrados.

Nas espécies *C. albiceps* (Figs. 5A), *Co. macellaria*, *C. idioidea*, *H. segmentaria*, *L. cuprina* e *L. eximia*, resíduos dos carboidratos β -N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuramínico (WGA) foram encontrados nas regiões da cabeça e do flagelo. Em *Co. hominivorax* os resíduos estavam presentes apenas na região da cabeça, e em *C. megacephala* não estão presentes. Resíduos

do referido carboidrato foi encontrado também no acrossoma da espécie *C. albiceps* (Figs. 5A).

Resíduos do carboidrato α -L-fucose (UEA-I) foram observados na região da cabeça e também do flagelo nas espécies *L. eximia* (Figs. 5B) e *L. cuprina*. Em *C. idioidea* tais resíduos encontraram-se presentes apenas na região da cabeça. Nas demais espécies não foi observada marcação.

DISCUSSÃO

No presente estudo, as seis lectinas utilizadas demonstraram ampla variedade de marcações positivas nas espermatídes e nos espermatozóides das oito espécies de Calliphoridae analisadas. As seis lectinas Con-A, GS-II, HPA, PNA, UEA-I e WGA indicaram a distribuição de D-manose, α -e β -N-acetil-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose, α -L-fucose e β -N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuramínico, respectivamente.

Estudos envolvendo localização de carboidratos em espermatozóides de Diptera são escassos. Bão & De Souza (1992, 1993) analisaram ultraestrutural e citoquimicamente a presença de resíduos de carboidratos utilizando para isso, diferentes lectinas em espermatídes e espermatozóides de *Culex quiquefasciatus*.

Outros trabalhos envolvendo lectinas em Diptera vêm sendo realizado em *Drosophila* (Perotti & Riva, 1988; Intra *et al.*, 2006;) e em *Ceratitis capitata* (Intra *et al.*, 2011a,b), determinando não apenas a presença de resíduos de carboidratos como também utilizando enzimas específicas para a clivagem desses carboidratos presentes nas células espermáticas.

Observações realizadas neste experimento evidenciaram que as concentrações de carboidratos nas espermatídes são maiores do que nos espermatozóides e que, exceto pela ausência de resíduos de α -L-fucose na espermatíde da espécie *Chrysomya albiceps*, as demais espermatídes mostraram-se positivas para todos os carboidratos utilizados. Em *Culex quinquefasciatus* a análise citoquímica ultraestrutural em espermatídes mostrou-se positiva para as nove lectinas utilizadas (Bão & De Souza, 1992).

Em relação aos espermatozóides, foi comum encontrar alternância no perfil de marcação, de acordo com a especificidade da lectina. Con-A mostrou-se presente em toda extensão do espermatozóide nas espécies *C. albiceps*, *Co. hominivorax*, *Co. macellaria*, *C. idioidea* e *H. segmentaria*; entretanto, esteve presente apenas na região do flagelo de *L. eximia* e completamente ausente em *C. megacephala* e *L. cuprina*.

Estudos preliminares em espermatozóides de *Drosophila melanogaster* utilizando lectinas com especificidade para tipos diferentes de carboidratos terminais, conjugados com marcadores fluorescentes revelaram que a marcação se concentrava na região do acrossoma (Perotti, 1986). Nos espermatozóides das espécies aqui descritas, o padrão de marcação apresentou-se de forma diferenciada do observado em *Drosophila melanogaster*. A marcação no acrossoma só aconteceu em cinco espécies (*C. albiceps*, *C. idioidea*, *L. cuprina* e *L. eximia* e *H. segmentaria*) das oito observadas, e apenas com dois tipos de lectinas, das seis utilizadas (HPA e WGA), sendo HPA a mais comumente encontrada na região do acrossoma.

GS-II e UEA-I mostraram-se presentes em toda a extensão dos espermatozóides apenas em duas espécies. GSII foi observada em *C. idioidea* e *L. cuprina* e UEA-I foi observada em *L. cuprina* e *L. eximia*, respectivamente. Desta forma, os resíduos de α -e β -N-acetil-glucosamina e α -L-fucose, marcados por essas duas lectinas foram os menos presentes nos espermatozóides.

PNA e WGA estiveram presentes, cada uma delas, em toda extensão do espermatozóide em seis das oito espécies analisadas. Os resíduos de carboidratos marcados por estas duas lectinas foram os mais abundantes nas amostras

analisadas, seguidas por Con-A e PNA, presente em toda extensão do espermatozóide de cinco espécies, cada uma. WGA e Con-A vem sendo utilizada em estudos de mapeamento de funções dos oligossacarídeos em tecidos de *Drosophila* (Seppo & Tiemeyer, 2000).

Portanto, pelos resultados de marcação obtidos pode ser sugerido, que na maioria das vezes, em espécies de um mesmo gênero as diferenças em relação à presença ou ausência dos carboidratos são sutis, ou seja, eles compartilham perfis de marcação semelhantes, mas não idênticos em sua totalidade (Tabela 4).

As análises realizadas neste trabalho são inéditas e podem contribuir juntamente com outros dados moleculares e morfológicos, para esclarecer dúvidas relacionadas à taxonomia e filogenia dentro de Diptera e da própria família Calliphoridae.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- Amorim DS, Silva VC, Balbi, MIPA. 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, 29-36.
- Báo, S.N. & W. De Souza. 1992. Lectin binding sites on head structures of the spermatid and spermatozoon of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Histochemistry.* **98**: 365-371.
- Báo, S.N. & W. De Souza. 1993. Ultrastructural and cytochemical studies of the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Submicrosc Citol Pathol.* **25** 213-222.
- Biavati GM, Santana FHA & Pujol-Luz JR. 2010. A checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) associated with a Pig Carrion in Central Brazil. *J Forensic Sci* **55**, 1603-1606.
- Cansi ER, Bonorino R, Ataíde HS, Pujol-Luz JR. 2011. Myiasis by Screw Worm *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae) in a Wild Maned Wolf *Chrysocion brachyurus* (Mammalia: Canidae), in Brasília, Brazil. *Neotrop. Entomol* **40**, 150-151.
- Damjanov I. 1987. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* **57**, 5-19.
- Intra J, Cenni F, Perotti ME. 2006. An α -L-fucosidase potentially involved in fertilization is present on *Drosophila* spermatozoa surface. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1149-1158.

- Intra J, Caro D, Perotti ME, Pasini ME. 2011a. Glycosidases in the plasma membrane of *Ceratitidis capitata* spermatozoa. *Insect Biochem Mol Biol.* **41**, 90-100.
- Intra J, Perotti ME, Pasini ME. 2011b. Cloning, sequence identification and expression profile analysis of α -L-fucosidase gene from the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *J Insect Physiol.* **57**, 452-461.
- Jamieson BGM. 1987. *Ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa*. University Press, Cambridge. 320p.
- Jamieson BGM, Dallai R & Afzelius B A. 1999. *Isects: their spermatozoa and phylogeny*. Sciece publishers, Enfield, New Hampshire, USA. 555p.
- Koehler JH. 1978. The mammalian sperm surface. Studies with specific labeling techniques. *Int Rev Cytol.* **54**, 73-195.
- Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF, Pujol-Luz JR. 2011. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Entomol* **55**, (no prelo).
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM and Meyer R (2010) Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrapha) with an emphasis on de superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpines's fly. *Sys Entomol.* **35**, 614-635.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera: Cyclorrapha) encontradas no Brasil. *Entomol. Vect.* **10**, 255-268.

- Pape T, Blagoderov V & Mostovski MB. 2011. Order Diptera Linnaeus, 1758. *In*: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* **3148**, 222-229.
- Perotti ME. 1986. Regional distribution of surface glycoconjugates of *Drosophila* sperm. *In*: *Biology of Reproduction and Cell Motility in Plants and Animals* (M. Cresti & Dallai, Eds). 101-106, University of Siena, Siena.
- Perotti ME & Riva A. 1988. Concanavalin-A binding sites on the surface of *Drosophila melanogaster* sperm: A fluorescence and ultrastructural study. *J Ultramol Struct Res.* **100**, 173-182.
- Perotti ME, Cattaneo F, Pasini ME, Verni' F, Hackstein JHP. 2001. Male sterile mutant casanova gives clues to mechanisms of sperm-egg interactions in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 248-259.
- Seppo A & Tiemeyer M. 2000. Function and structure of *Drosophila* glycans. Mini Review. *Glycobiology* **10**, 751-760.
- Sharon N & Lis H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* **268**, 74-81.
- Wassarman PM. Role of carbohydrates in receptor-mediated fertilization in mammals. *In*: *Carbohydrate Recognition in Cellular Function* (G. Bock and S. Harnett, eds). Chichester: Wiley. 294p.

Tabela 1. Lectinas utilizadas, carboidratos correspondentes e concentração.

| Abreviação | Origem da lectina | Especificidade do Açúcar | Concentração da lectina (µg/ml) |
|------------|-----------------------------------|---|---------------------------------|
| PNA | <i>Arachis hypogaea</i> | D-galactose | 100 |
| UEA-I | <i>Ulex europaeus</i> I | α-L-fucose | 100 |
| GS-II | <i>Griffonia simplicifolia</i> II | α-e β-N-acetil-glucosamina | 100 |
| HPA | <i>Helix pomatia</i> | N-acetil-D-galactosamina | 100 |
| Con A | <i>Canavalia ensiformis</i> | D-manose | 100 |
| WGA | <i>Triticum vulgare</i> | β-N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuraminico | 100 |

Con-A, Concanavalin A; PNA, Peanut Agglutinin ; UEA I, Ulex europaeus Agglutinin; WGA, Wheat germ Agglutinin; GS-II, Griffonia simplicifolia II; HPA, Helix pomatia.

Tabela 2. Perfil de marcação com lectinas nas espermátides.

| Espécies Estudadas | Lectinas | | | | | |
|--------------------------------|----------|-------|-----|-----|-------|-----|
| | Con-A | GS-II | HPA | PNA | UEA-I | WGA |
| <i>Chrysomya megacephala</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | + | + | + | + | - | + |
| <i>Cochliomyia hominivorax</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Cochliomyia macellaria</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Lucilia cuprina</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Lucilia eximia</i> | + | + | + | + | + | + |

Perfil de marcação: positivo (+) e negativo (-).

Tabela 3. Localização e intensidade de carboidratos nas espermátides.

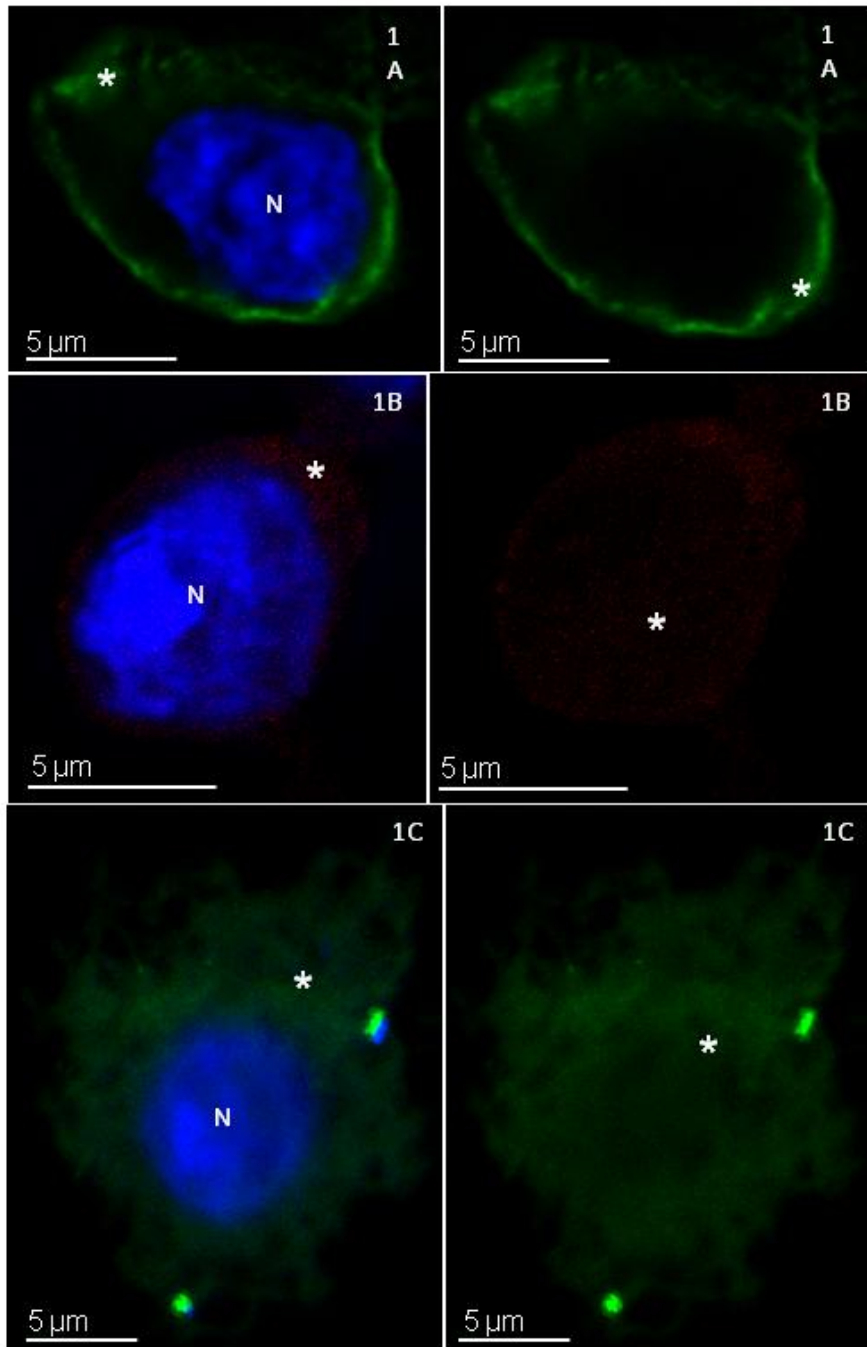
| Espécies Estudadas | Lectinas | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|
| | Con-A | | GS-II | | HPA | | PNA | | UEA-I | | WGA | |
| | M | CM | M | CM | M | CM | M | CM | M | CM | M | CM |
| <i>Chrysomya megacephala</i> | | *** | | ** | | ** | | *** | ** | | *** | |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | | *** | | * | | *** | | ** | | | ** | |
| <i>Cochliomyia hominivorax</i> | | *** | | *** | | *** | | * | | * | | *** |
| <i>Cochliomyia macellaria</i> | | *** | | ** | | ** | | *** | | * | *** | |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> | | ** | ** | | *** | | | ** | | * | | ** |
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> | | ** | | *** | | ** | | ** | | *** | | *** |
| <i>Lucilia cuprina</i> | | * | | ** | ** | | | ** | | * | ** | |
| <i>Lucilia eximia</i> | | *** | | *** | ** | | | *** | | *** | | *** |

Membrana plasmática(M). Citoplasma e membrana (CM). Intensidade: baixa (*), moderada (**), e alta (***).

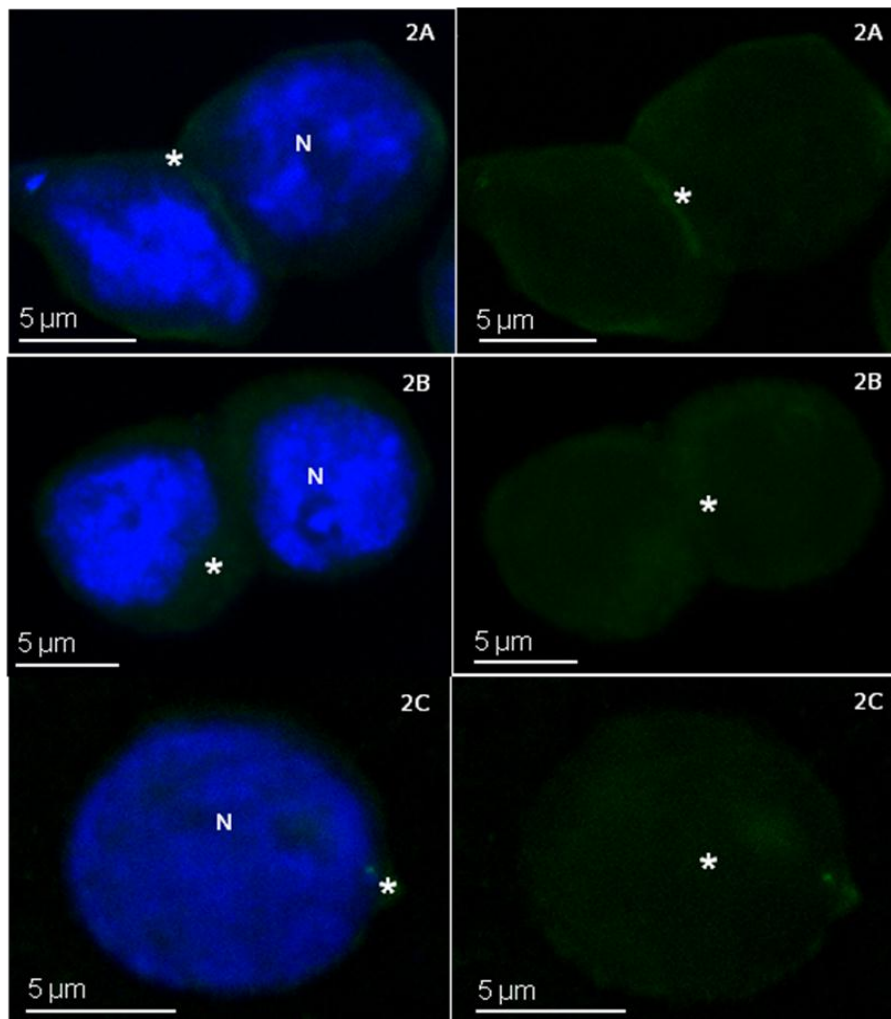
Tabela 4. Perfil de marcação com lectinas nos espermatozóides.

| Espécies Estudadas | Lectinas | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------|---|-------|---|-----|---|-----|---|-------|---|-----|---|
| | Con-A | | GS-II | | HPA | | PNA | | UEA-I | | WGA | |
| | H | T | H | T | H | T | H | T | H | T | H | T |
| <i>Chrysomya megacephala</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>Chrysomya albiceps</i> * | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + |
| <i>Cochliomyia hominivorax</i> | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| <i>Cochliomyia macellaria</i> | + | + | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> * | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + |
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> * | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | + |
| <i>Lucilia cuprina</i> * | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Lucilia eximia</i> * | - | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + |

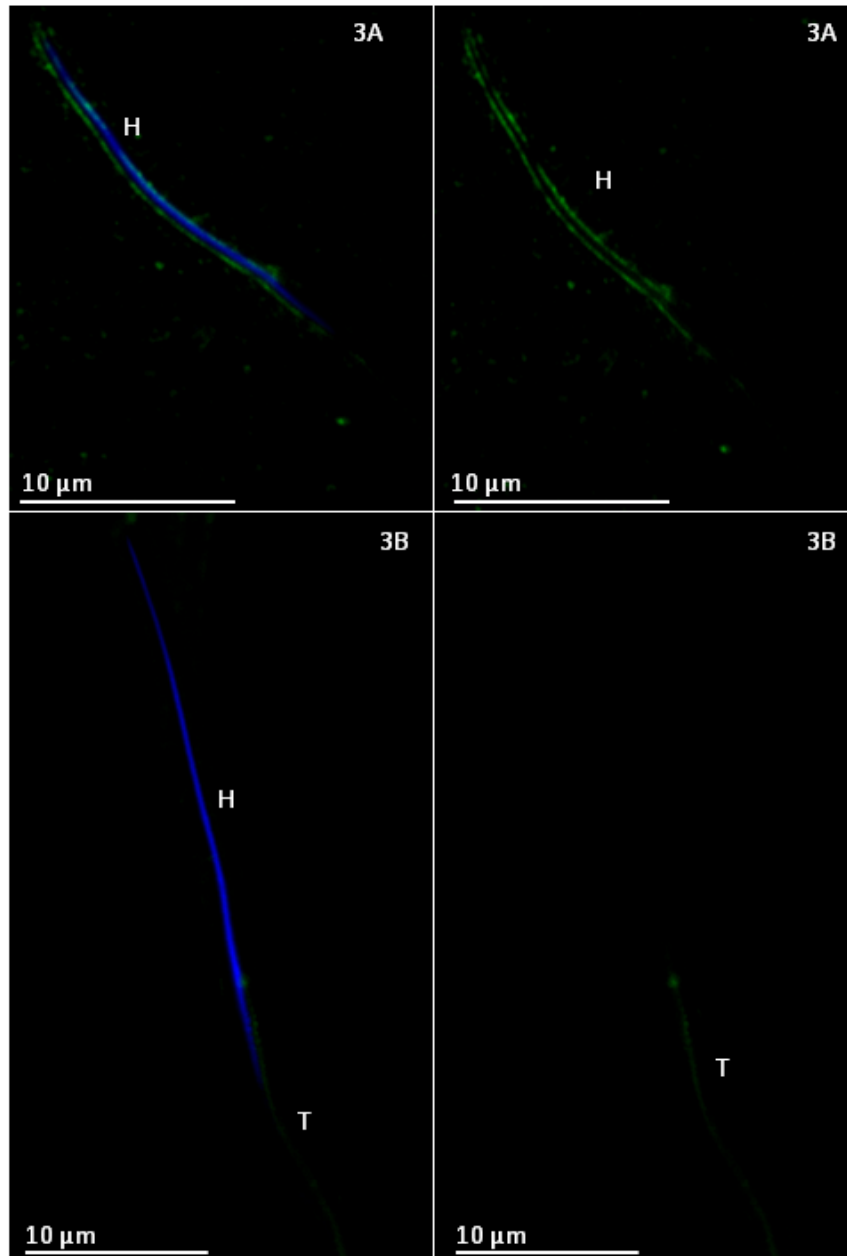
Região da cabeça (H). Região do flagelo (T). Espécies com marcação acrossomal e respectivas lectinas (*). Presença de marcação (+), ausência de marcação (-).



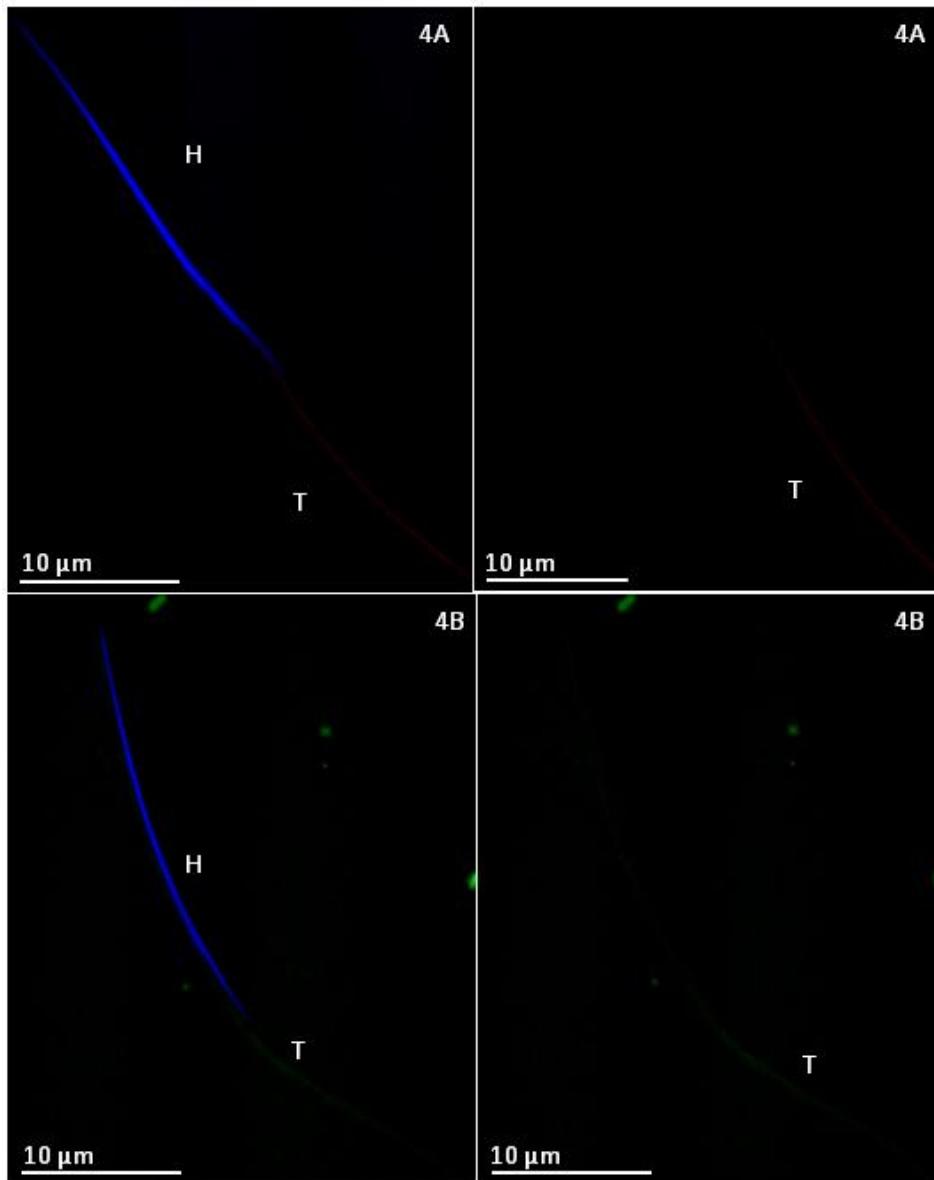
Figuras 1A-C. Localização de carboidratos específicos nas espermatídes de Calliphoridae. Núcleo (N) marcado com DAPI. **A.** Espermatíde de *Chloroprocta idioidea* marcada intensamente com HPA. Presença de resíduos do carboidrato N-acetil-D-galactosamina na membrana da célula (asterisco). **B.** *Lucilia cuprina* apresentou baixas concentrações de Con-A. Resíduos de D-manose (asterisco) estão presentes em toda a célula. **C.** *Chrysomya megacephala* marcada intensamente com PNA. Resíduos de D-galactose foram observados em toda a célula (asterisco).



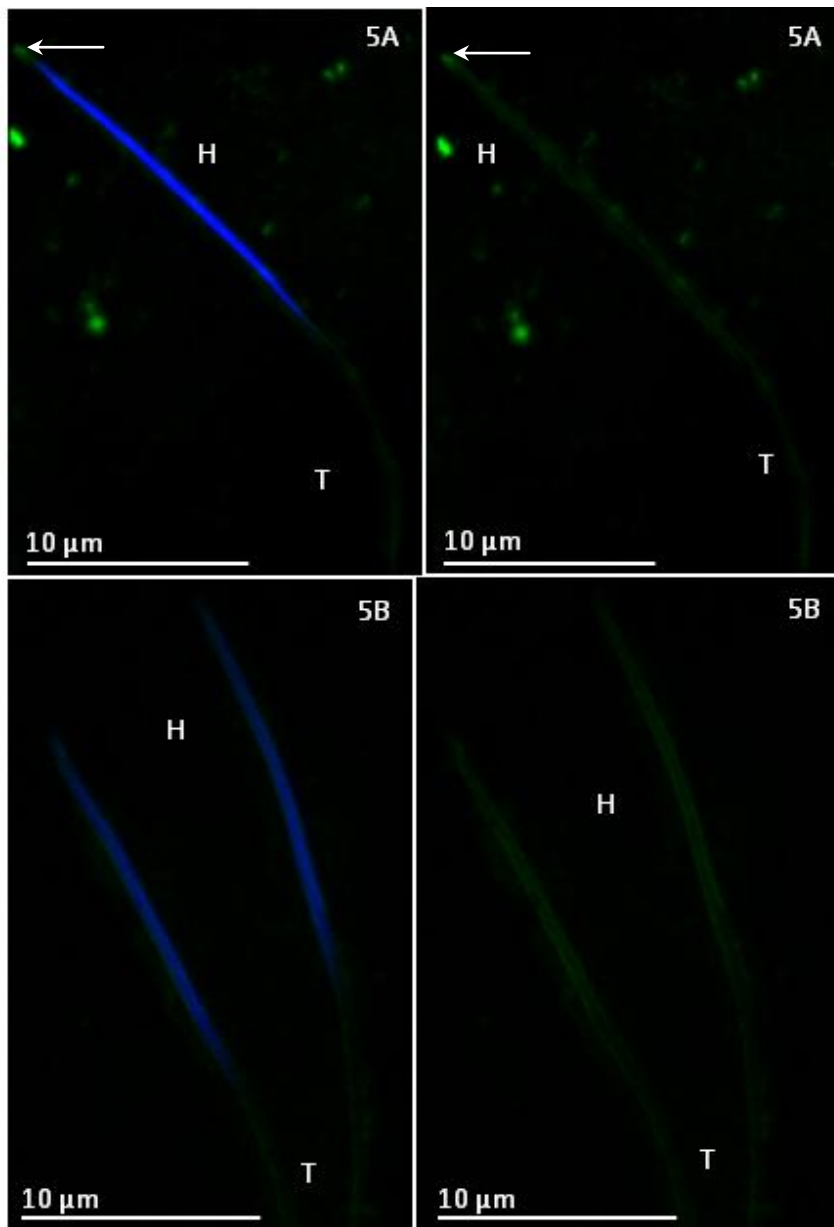
Figuras 2A-C. Localização de carboidratos específicos nas espermatídes de Calliphoridae. Núcleo (N) marcado com DAPI. **A.** Espermatíde de *Lucilia eximia* marcada intensamente com UEA-I. Presença de resíduos do carboidrato α -L-fucose em toda a célula (asterisco). **B.** *Cochliomyia hominivorax* marcada intensamente com WGA. Presença de resíduos de β -N-acetylglucosamina e ácido N-acetilneuraminico (asterisco) em toda a célula. **C.** *Hemilucilia segmentaria* marcada intensamente com GS-II. Presença de resíduos de α - e β -N-acetil-glucosamina em toda a célula (asterisco).



Figuras 3A-B. Localização de carboidratos específicos nos espermatozoides de Calliphoridae. Núcleo marcado com DAPI. **A.** *Chloroprocta idioidea* exibe marcação com HPA indicando presença de resíduos do carboidrato N-acetil-D-galactosamina na região da cabeça (H) do espermatozóide, incluindo acrossoma. **B.** *Cochliomyia hominivorax* exibe marcação na região do flagelo (T) do espermatozóide, com GS-II indicando resíduos de α - e β -N-acetil-glucosamina.



Figuras 4A-B. Localização de carboidratos específicos nos espermatozoides de Calliphoridae. Núcleo marcado com DAPI. **A.** *Cochliomyia hominivorax* exibe marcação com Con-A na região do flagelo (T) do espermatozoide. Presença de resíduos de D-manose. **B.** *Cochliomyia macellaria* exibe marcação em toda a extensão do espermatozoide com PNA. Presença de resíduos de D-galactose.



Figuras 5A-B. Localização de carboidratos específicos nos espermatozoides de Calliphoridae. Núcleo marcado com DAPI. **A-B.** Espermatozoides de *Chrysomya albiceps* e *Lucilia eximia* marcados em toda sua extensão por WGA e UEA-I, respectivamente. Presença de resíduos dos carboidratos β -N-acetilglucosamine e ácido N-acetilneuraminico e α -L-fucose, respectivamente. Acrossoma (seta).

Análise Morfológica dos Espermatozóides em representantes das Subfamílias Calliphorinae e Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae)

Name KPO^{a,b}, Wolff M^c, Pujol-Luz JR^d, & Bão SN^b

^a Programa de Pós graduação em Biologia Animal; ^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-DF, Brasil; ^c Grupo de Entomología, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia; ^d Núcleo de Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^{a,b} knrna@ig.com.br; ^c marta_wolff@yahoo.com; ^d jrpujol@unb.br; ^b snbao@unb.br

RESUMO – A Morfologia dos espermatozóides das moscas-varejeiras *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea*, *Compsomyiops verena*, *Calliphora peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* está sendo descrita pela primeira vez, utilizando microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os espermatozóides de *Chrysomya albiceps* são ultraestruturalmente similares aos descritos em outros Brachycera. Entretanto, nas outras cinco espécies a ultraestrutura dos espermatozóides demonstrou perfil diferente. Em *Chrysomya albiceps*, *Hemilucilia segmentaria* e *Chloroprocta idioidea* os espermatozóides são longos e delgados, medindo cerca de 109 µm, 73 µm, e 95 µm de comprimento, com a região da cabeça medindo aproximadamente 11 µm nas três espécies observadas. Foi observado polimorfismo em relação ao comprimento nos espermatozóides das três espécies analisadas. Em todas as espécies analisadas, a cabeça é formada por um acrossoma preenchido por material elétron lúcido. O formato do núcleo em secções transversais varia de circular a oval com cromatina completamente condensada. A implantação do axonema foi observada na região média do núcleo, conhecida como região de ‘peg’. Na região subsequente foi observado o início dos dois derivados mitocondriais, com diâmetros similares e diferentes comprimentos em *Chrysomya albiceps*; e apenas um derivado nas demais espécies. Na região de justaposição (‘overlap’), as seguintes estruturas foram observadas: núcleo, adjunto do centríolo, derivados mitocondriais e axonema. O axonema possui o padrão típico observado em insetos com arranjo microtubular de 9+9+2.

Palavras-chave: Entomologia, Células Germinativas, Espermatozóide de Insetos, Microscopia, Sistema Reprodutor.

ABSTRACT - Morphology of spermatozoa of the blowflies *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea*, *Compsomyiops verena*, *Calliphora peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* and *Hemilucilia semidiaphana* is first described using light and transmission electron microscopy. The sperm ultrastructure of *Chrysomya albiceps* is similar to that described for other Brachycera. However, in the five other species, the ultrastructure of spermatozoa showed a different profile. In *Chrysomya albiceps*, *Hemilucilia segmentaria* and *Chloroprocta idioidea* the sperm are long and slender, measuring about 109 μm , 73 μm and 95 μm in length, with the head measuring approximately 11 μm in the three observed species. Polymorphism in the length was observed in the sperm of the three observed species. In all species analyzed, the head is formed by an acrosome filled with electron lucid material. The shape of the nucleus, in cross sections, varies from circular to oval with completely condensed chromatin. The implantation of the axoneme was observed in the middle region of the nucleus, known as the 'peg' region. In the subsequent region the emergence was observed of two mitochondrial derivatives of similar diameter and different lengths in *Chrysomya albiceps*, and only one mitochondrial derivative in the other species. In the overlap region, the following structures were observed: nucleus, centriolar adjunct, mitochondrial derivatives and axoneme. The axoneme is of a conventional insectan type with a 9+9+2 microtubular arrangement.

Key words: Entomology, Germ Cells, Insect Sperm, Microscopy, Reproductive System.

INTRODUÇÃO

Os Calliphoridae, popularmente conhecidos como moscas-varejeiras, representam a família mais heterogênea das moscas caliptradas (Rognes, 1997), com aproximadamente 1.500 espécies descritas em todo o mundo (Pape *et al.*, 2011). Na região Neotropical são conhecidas 126 espécies, agrupadas em 28 gêneros (Amorim *et al.*, 2002).

Acredita-se que nas regiões tropicais essa seja uma das famílias mais importantes na ciclagem de matéria orgânica na natureza – eliminando carcaças do ambiente, fato este que despertou o interesse da perícia criminal pelo seu potencial na estimativa do intervalo *post-mortem* (Catts & Goff, 1992; Mello, 2003; Pujol-Luz *et al.*, 2006, 2008), e encontram-se ainda, envolvidos em um grande número de processos biológicos (Castañeda-Vildózola *et al.*, 1999; Marcondes, 2006; Wolff *et al.*, 2001).

Com relação às espécies envolvidas neste estudo, *Chloroprocta idioidea* (Robineau-Desvoidy, 1805) é comumente encontrada em áreas rurais ou de vegetação densa, o gênero ocorre do norte do Texas ao sul do Paraguai, com distribuição na América Central e Norte Neotropical (Dear, 1985); *Comptosmyiops verena* (Walter, 1849) com apenas um registro a 1500 m de altitude, na província Noradina (Antioquia - Colômbia) e *Calliphora peruviana* Maquart, 1851, ocorrem na região Andina (Colômbia) (Wolff, 2009); *Chrysomya albiceps* (Weidemann, 1819) possui distribuição abrangente - é uma espécie cosmopolita (Verves, 2004), nas regiões da Australásia, Holoártica, Neotropical e Oriental (Mariluis & Mulieri, 2003); *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) são assinantrópicas e são encontradas de forma abundante em ambientes naturais de florestas, não ocorrendo ou ocorrendo de forma reduzida em áreas

urbanas (Thyssen *et al.*, 2005). Sua distribuição vai do México à Argentina e das Ilhas do Caribe ao Peru (Dear, 1985).

De acordo com McAlpine (1989) e Rognes (1997), Calliphoridae constitui a família chave para que se possa chegar ao entendimento da evolução dentro do grupo Oestroidea. Muitas das incertezas a cerca das relações evolutivas dentro da família Calliphoridae e entre outras famílias dentro de Diptera provavelmente poderiam ser resolvidas com a inclusão de novos caracteres combinados aos tradicionalmente usados (Carcupino *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 1999). Estudos recentes têm demonstrado que a estrutura e a ultraestrutura dos espermatozóides em Diptera fornecem variações suficientes para fornecer caracteres adicionais para análises taxonômicas e filogenéticas (Jamieson 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

O objetivo deste estudo é descrever e comparar a morfologia dos espermatozóides em representantes das subfamílias Chrysomiinae e Calliphorinae e assim, além de possibilitar comparações com as demais espécies de Calliphoridae, agregar novos caracteres para estudos taxonômicos e filogenéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Espécimes adultos de *Chrysomya albiceps* foram coletados em área urbana do Distrito Federal, enquanto os espécimes adultos de *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* foram coletadas na Reserva Ecológica do IBGE – RECOR. Os espécimes selvagens utilizados neste estudo foram atraídos com carcaças de peixe e carne moída, e coletados com redes entomológicas e armadilhas tipo Van Someren-Rydon. Espermatecas de fêmeas de *Comptosomyiops verena* e *Calliphora peruviana* analisadas neste trabalho foram obtidas em colaboração com a Universidade de Antioquia em Medellín (Colômbia), onde foram coletadas e fixadas.

Em laboratório, as moscas das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* foram alimentadas com dieta à base de leite em pó, açúcar e levedo de cerveja (1:1:1) dissolvidos em água, e água à vontade durante uma semana, e em seguida foi oferecido 100 g de carne bovina moída como substrato para oviposição. Ovos em grande quantidade foram encontrados em baixo da carne e após um dia foram transferidos para potes plásticos cônicos. Em cada pote plástico foram colocados 20 ovos e 20 g de carne bovina fresca moída, para o completo desenvolvimento dos espécimes (estágio adulto).

Microscopia de Luz

Seis machos de cada uma das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea* e *Hemilucilia segmentaria* foram dissecados, seus testículos foram rompidos e os espermatozoides espalhados em lâminas histológicas. Em seguida os espermatozoides foram fixados em solução de 4% (wt/vol) de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e as lâminas foram lavadas posteriormente e secas em temperatura ambiente.

Para medição do comprimento total dos espermatozoides e da região do núcleo, essas preparações foram incubadas durante 15 minutos com 0,2µg/ml de 4,6-diamino-2-phenyndole (DAPI) em água, lavadas e montadas com uma solução de ProLong-Gold. As preparações foram então examinadas utilizando os microscópios Axiophot Zeiss® e Confocal Leica SP5 equipados com epifluorescência e com filtro de excitação de 405 nm respectivamente.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os testículos dos machos de *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (cinco de cada espécie), e espermateca de cinco fêmeas de *Comptosomyiops verena* e *Calliphora peruviana* foram fixados por 4 h em solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5mM CaCl₂ e 3% de sacarose em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2. Após a fixação, os espécimes foram lavados em mesmo tampão e pós-fixados por 1h em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em alguns casos os espécimes foram fixados em uma mistura contendo 2,5% de glutaraldeído e 1% de

ácido tânico em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, seguido de contrastação “*en bloc*” em solução de 1% de acetato de uranila em água destilada “overnight” (Dallai & Afzelius, 1990). 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, operado a 80 kV.

RESULTADOS

Microscopia de Luz (ML)

Os espermatozoides de *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea* (Figs. 1A-B) e *Hemilucilia segmentaria* (dados não demonstrados) são longos, delgados e filiformes, sendo a média de suas medidas (incluindo região da cabeça e da cauda), 109 μm em *Chrysomya albiceps* e 95 μm em *Chloroprocta idioidea*. A marcação do núcleo do espermatozoide com DAPI permitiu distinguir com clareza a região da cabeça e do flagelo. O núcleo em *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea* (Figs. 1C-D) e *Hemilucilia segmentaria* (dado não demonstrado) é longo, medindo em média 11 μm nas três espécies, quando marcados com DAPI e examinadas em microscópio de epifluorescência.

Foi observado polimorfismo em relação ao comprimento do espermatozoide nas três espécies analisadas. Ou seja, dentro de um mesmo testículo foram encontrados espermatozoides de diferentes tamanhos. Entretanto, os resultados mostraram que em *Chrysomya albiceps* e *Hemilucilia segmentaria* a variação no comprimento dos espermatozoides foi maior do que em *Chloroprocta idioidea*. Dados referentes às médias do comprimento da cabeça e da região da cauda, média do comprimento total do espermatozoide, maior e menor espermatozoide encontrado em cada espécie, são apresentados na Tabela 1.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Nas espécies estudadas a região da cabeça do espermatozóide consiste em acrossoma e núcleo. O acrossoma é cônico e espesso, não possui membrana extra-acrossomal e o material interno possui elétrons de densidade moderada (Fig. 2B). Em secções transversais ele apresenta-se elíptico (Fig. 2A, 3A). Em secções transversais o formato do núcleo varia de circular a oval (Fig. 2C, 3B), e a cromatina pode ser vista completamente compactada.

O local de implantação do axonema no núcleo pode ser visto em secção transversal como um círculo de citoplasma (Fig. 2D). Na região subsequente é possível observar o desenvolvimento do axonema, com o surgimento do par central de microtúbulos (Fig. 3C) e posteriormente o axonema completo com sua configuração definitiva de 9+9+2 microtúbulos (Figs. 2E, 3D).

A presença de um único derivado mitocondrial na mesma região em que se encontram o núcleo e o axonema foi observada nas espécies *Chloroprocta idioidea*, *Compsomyiops verena*, *Calliphora peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* (Fig. 2F). Dois derivados mitocondriais nesta mesma região foram observados em *Chrysomya albiceps* (Fig. 3D).

Na região de justaposição ('overlap') no espermatozóide, o núcleo e os componentes flagelares (axonema, derivado mitocondrial e adjunto do centríolo) podem ser vistos em um mesmo plano de corte em todas as espécies analisadas (Figs. 2G, 3E).

O adjunto do centríolo está centralmente localizado entre as demais estruturas na região de justaposição. Em secções transversais de todas as espécies

analisadas, esta estrutura apresenta-se menos elétron densa do que as demais estruturas (Figs. 2G, 3F).

O adjunto do centríolo inicia-se logo abaixo da região posterior do núcleo e continua paralelo ao axonema e derivados mitocondriais. Somente na espécie *Chrysomya albiceps* essa estrutura foi observada entre os dois derivados mitocondriais (Fig. 3F). Nas demais espécies, tal estrutura foi observada sempre entre o derivado mitocondrial e o núcleo, ou lateralmente ao axonema e ao derivado mitocondrial (Figs. 2G-H).

Em *Chrysomya albiceps*, em secções transversais, os derivados mitocondriais foram observados posicionados lado a lado próximos à linha média e ventralmente ao axonema e, embora seus diâmetros sejam similares (Figs. 3E-G), seus comprimentos são diferentes (3H-I). Nas espécies *Chloroprocta idioidea*, *Compsomyiops verena*, *Calliphora peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* o derivado mitocondrial foi observado ventralmente ao axonema (Figs. 2F, H-I). Em todas as espécies, estas estruturas estão quase completamente preenchidas por material paracristalino (Figs. 2F, H-J; 3F-I).

Em todas as espécies estudadas, o axonema possui a configuração típica de 9+9+2 microtúbulos, com nove microtúbulos acessórios exteriores simples, nove duplas periféricas e dois microtúbulos centrais. Entre os microtúbulos acessórios foi observado material intertubular proeminente (Fig. 2I, 3I).

DISCUSSÃO

A estrutura do espermatozóide em *Chrysomya albiceps*, *Hemilucilia segmentaria* e *Chloroprocta idioidea* é similar à descrição geral dos espermatozóides de insetos (Phillips, 1970; Jamieson 1987; Jamieson et al., 1999). Nas espécies estudadas, os espermatozóides são longos e delgados como na maioria dos Diptera. Nestas espécies foi observado que os espermatozóides apresentam variações significantes no comprimento. Tais variações ocorrem nas regiões da cabeça e da cauda e também no comprimento total dos espermatozóides, caracterizando um polimorfismo.

Polimorfismo é um exemplo de diversificação da morfologia do espermatozóide, onde tipos distintos de espermatozóides são encontrados em um mesmo ejaculado. Polimorfia no espermatozóide pode incluir diferenças na morfologia, no comprimento total dos espermatozóides, ou ainda, comprimentos diferentes em algumas estruturas e diferença nas funções (Swallow & Wilkinson 2002; Pitnick *et al.*, 2009).

O tipo de polimorfismo mais comum nos espermatozóides de insetos está relacionado ao comprimento do núcleo e do flagelo. No grupo de *Drosophila* é comum encontrar machos produzindo dois ou mais tipos morfológicos de espermatozóides no conteúdo ejaculado por um único macho (Jamieson *et al.*, 1999; Swallow & Wilkinson 2002). Embora o comprimento do espermatozóide possa variar de acordo com as espécies examinadas, a exposição a ambientes estressantes, incluindo temperatura relativamente alta, em estudos realizados com machos de *Scathophaga stercoraria* também demonstraram aumento na variação do comprimento do espermatozóide (Hellriegel & Blackenhorn 2002).

Chrysomya albiceps, *Hemilucilia segmentaria* e *Chloroprocta idioidea* produzem espermatozoides com mais de um comprimento em um mesmo testículo. Quando analisado em microscopia de luz, foi observado que o espermatozoide exibe variações de comprimento na cabeça e na cauda. Em *Chrysomya albiceps* e *Hemilucilia segmentaria* os dados mostram uma grande variação no comprimento total dos espermatozoides, enquanto em *Chloroprocta idioidea* essa variação também existe, mas é menos acentuada do que nas outras duas espécies.

Polimorfismo no comprimento do espermatozoide foi observado também em outros Calliphoridae. Nas espécies *Lucilia cuprina* e *L. eximia*, foi observada uma variação significativa no comprimento dos espermatozoides (Name *et al.*, 2012), enquanto em *Chrysomya megacephala* essas variações não foram observadas (Name *et al.*, 2010). Este é o tipo mais comum de polimorfismo descrito em insetos (Sivinski, 1980) e tem sido documentado em vários grupos de invertebrados (Rosati *et al.*, 1970; Jamieson 1986).

A condição de ausência de membrana extra acrosomal no acrossoma, observada no espermatozoide das espécies aqui descritas é também aparentemente compartilhada pelo espermatozoide de todos os Calliphoridae já examinados (Name *et al.*, 2010, 2012). De acordo com Dallai *et al.* (1984), o acrossoma em Diptera possui diferentes formas. Em algumas famílias ele é pequeno e desprovido de perforatorium e membranas extra acrossomais e em outras famílias ele é uma organela alongada, inserindo-se lateralmente no núcleo. Nas seis espécies estudadas, o acrossoma possui o último aspecto descrito.

Nos espermatozóides das seis espécies aqui descritas, a cromatina nuclear é altamente condensada como em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010), *Lucilia cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana* (Name *et al.*, 2012) e em outros Brachycera (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

A região posterior do núcleo nas espécies analisadas possui uma característica peculiar, observada em secção transversal, que é o início do axonema, seguido das demais estruturas flagelares. Em todas as espécies analisadas, as estruturas que formam a região de justaposição ('overlap') (axonema, derivado mitocondrial e adjunto do centríolo), estão presentes no espermatozóide. Descrições detalhadas desta região podem ser encontradas em *Megaselia scalaris* (Curtis *et al.*, 1989) e *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010).

A região do flagelo é marcada pelo completo desaparecimento do núcleo e pelo aumento em diâmetro do adjunto do centríolo. Acredita-se que o papel de tal estrutura na maioria dos insetos seja dar suporte, estabilizando a inserção do axonema na base do núcleo e também, a de ancorar os derivados mitocondriais no axonema (Jamieson, 1987; Jamieson *et al.*, 1999).

O adjunto do centríolo nas seis espécies estudadas possui elétron densidade moderada, padrão observado também em outras espécies de Brachycera (Warner, 1971; Name *et al.*, 2010, 2012). Nas espécies analisadas, tal estrutura foi observada em secções transversais, na região de justaposição. Em *Chrysomya albiceps* o adjunto do centríolo é circundado pelo núcleo e estruturas flagelares (derivados mitocondriais e axonema), enquanto em *Chloroprocta idioidea*, *Comptosomyiops verena*, *Calliphora peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiphana*, tal

estrutura encontra-se localizada lateralmente ao axonema e ao núcleo, ou em frente ao axonema entre o núcleo e o derivado mitocondrial.

O perfil encontrado para o preenchimento dos derivados mitocondriais pela proteína paracristalina – cristalomitina (Baccetti, 1977), em todas as espécies aqui descritas, também foi observado em outras espécies de Calliphoridae (Name *et al.*, 2010, 2012), assim como em outros Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999).

De acordo com Dallai *et al.* (1993), as estruturas presentes no axonema dos espermatozóides em Brachycera são relativamente uniformes, enquanto na subordem Nematocera existe uma considerável diversidade, que é maior do que a encontrada em qualquer outra ordem de insetos. Como esperado e encontrado para a maioria dos Brachycera estudados (Dallai *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010; 2012), o axonema nas seis espécies aqui examinadas possui 9+9+2 microtúbulos localizados paralelamente uns aos outros, e de fato, o perfil é similar ao descrito para a maioria dos insetos (Dallai & Afzelius, 1990).

O material intertubular em todas as espécies aqui analisadas é proeminente e encontra-se entre os microtúbulos acessórios. Esse padrão foi também observado em *C. megacephala* (Name *et al.*, 2010), *L. cuprina*, *L. eximia* e *L. peruviana* (Name *et al.*, 2012) e em outras espécies de Brachycera (Dallai *et al.*, 1993; Dallai & Afzelius, 1999).

Com base nas características mostradas neste trabalho, a morfologia dos espermatozóides nas seis espécies estudadas é, na maior parte, similar ao descrito para a maioria dos Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999). Entretanto, cinco das espécies aqui descritas (*Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Calliphora peruviana* e *Compsomyiops verena*) apresentam apenas

um derivado mitocondrial, como descrito anteriormente em *L. cuprina* e *L. eximia* (Name *et al.*, 2012). Desta forma, concluímos que os dados aqui obtidos são consistentes e ilustram a diversidade dos espermatozóides em Diptera, podendo fornecer um sistema de caracteres, que usados em associação com outras ferramentas ajudarão na solução de várias incertezas sobre as relações evolutivas deste grupo de insetos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

REFERÊNCIAS

- Amorim DS, Silva VC, Balbi, MIPA. 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.
- Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosatti F, Afzelius BA. 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J Cell Biol* **73**, 594-600.
- Carcupino M, Profili G, Kathirithamby J, Mazzini M. 1995. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mem. Mus. Natn. Hist. Nat.* **166**, 291-296.
- 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. *Rev. Chap., Ser. Hort.* **5**, 129-136.
- Catts EP & Goff ML. 1992. Forensic Entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol* **37**, 253-272.
- Curtis SK, Benner DB, Musil G. 1989. Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *J Morphol* **200**, 47-61.
- Dallai R, Afzelius BA. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J Struct Biol* **103**, 164-179.
- Dallai R, Afzelius BA. 1999. Accessory microtubules in insect spermatozoa: structure, function and phylogenetic significance. *In: Gagnon, C. (ed), The Male Gamete. From Basic Sciences to Clinical Applications.* Cache River Press, 516p.

- Dallai, R., Baccetti, B., Mazzini, M., Sabatinelli, G. 1984. The spermatozoon of three species of *Phlebotomus* (Phlebotominae) and the acrosomal evolution in nematoceran dipterans. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **13**, 1-10.
- Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S, Afzelius BA. 1993. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zool Scripta* **22**, 193-202.
- Dear, J.P. 1985. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Zool* **3**, 109-169.
- Hellriegel B and Blackenhorn WU (2002) Environmental influences on the gametic investment of yellow dung fly males. *Evol. Ecol.* **16**, 502-522.
- Jamieson BGM (1986) The spermatozoa of Chilopoda (Uniramia): an ultrastructural review with data on the dimorphism in *Ethmostigmus rubripes* and phylogenetic discussion. *J. Submicrosc. Cytol.* **18**, 543-558.
- Jamieson BGM, 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge. 320p.
- Jamieson BGM, Dallai R, Afzelius BA. 1999. *Insects: their spermatozoa and phylogeny*. Enfield, New Hampshire (USA) Science Publishers Inc. 555p.
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM, Meyer R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Sys Entomol* **35**, 614-635.

- Marcondes CB. 2006. *Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Florianópolis. Ed. Da UFSC.
- Mariluis JC & Mulieri PR. 2003. The distribution of the Calliphoridae in Argentina (Diptera). *Rev Soc Entomol Argent*, **62**, 85-97.
- McAlpine JF. 1989. Phylogeny and classification of the Muscomorpha. In: *Manual of Nearctic Diptera*. (J.F. MacAlpine, Ed.). Vol. 3. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 32, 1397-1518.
- McAlpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR, Wood DM (eds.). 1981, 1987. *Manual of Nearctic Diptera, Vol. 1 & 2*. Research Branch, Agriculture Canada. Monographs 27 & 28.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da Família Calliphoridae (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomol Vectores*, **10**, 255-268.
- Name KPO, Barros-Cordeiro KB, Gama Filho JB, Wolff M, Pujol-Luz JR and Bão SN (2012). Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermiogenesis in three species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *J. Morphol.* **273**, 160-172.
- Name KPO, Pujol-Luz JR, Bão SN. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* **41**, 853-860.
- Pape T, Blagoderov V & Mostovski M B. 2011. Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* **3148**, 222-229.

Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* **44**, 243-277.

Pitnick S, Hosken DJ and Birkhead TM (2009) Sperm morphological diversity. In: *Sperm Biology – An Evolutionary Perspective*, ed. Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S. (Academic Press Elsevier, UK). 683p.

Pujol-Luz JR, Marques H, Ururahy-Rodrigues A, Rafael JA, Santana FHA, Arantes LC, Constantino R. 2006. A Forensic Entomology case from the Amazon Rain Forest of Brazil. *J Forensic Sci* **51**, 1151-1153.

Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R. 2008. Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* **52**, 485-492.

Rognes K. 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group. *Cladistics* **13**, 27-68.

Rosati F, Baccetti B and Dallai R (1970) The spermatozoon of Arthropoda. X. Araneid and the lower myriapods. In: *Comparative Spermatology*, ed. B. Baccetti, pp. 247-254 (Academic Press, New York, USA).

Schrankel KR, Schwalm FE. 1974. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tissue Res* **153**, 44-53.

Sivinski J (1980) Sexual selection and insect sperm. *Florida Entomologist* **63**, 99-111.

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

- Thyssen PJ. 2005. *Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Díptera) de importância forense*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Campinas, 102 p.
- Verves YG. 2004. Records of *Chrysomya albiceps* in the Ukraine. *Med Vet Entomol* **18**, 308-310.
- Wolff M. 2009. Entomología Forense en Colombia. *Entomología Forense en Latinoamérica*. [HTTP://entoforenselatam.wordpress.com/2009/04/29/](http://entoforenselatam.wordpress.com/2009/04/29/). Acesso em 10/01/2011.
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Sci Int* **120**, 53-59.
- Warner FD. 1971. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrastruc Res* **35**, 210-232.

Tabela 1. Dimensões e médias dos espermatozoides nas espécies *Chrysomya albiceps*, *Hemilucilia segmentaria* e *Chloroprocta idioidea*.

| Espécies | Cabeça | Flagelo | Comprimento Total |
|--------------------------------|--|--|--|
| <i>Chrysomya albiceps</i> | 10,71 μm (n = 50, SD = 1,95) | 102,32 μm (n = 50, SD = 20,67) | 109,46 μm (58,95 – 155,95 μm) (n = 50, SD = 21,20) |
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> | 10,85 μm (n = 50, SD = 1,21) | 61,92 μm (n = 50, SD = 10,57) | 73,13 μm (40,47 – 111,94 μm) (n = 50, SD = 13,23) |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> | 11,50 μm (n = 50, SD = 1,58) | 83,53 μm (n = 50, SD = 10,92) | 95,65 μm (71,42 – 122,65 μm) (n = 50, SD = 11,01) |

Media e desvio padrão (**SD**). Número de espermatozoides analisados (**n**).

FIGURAS

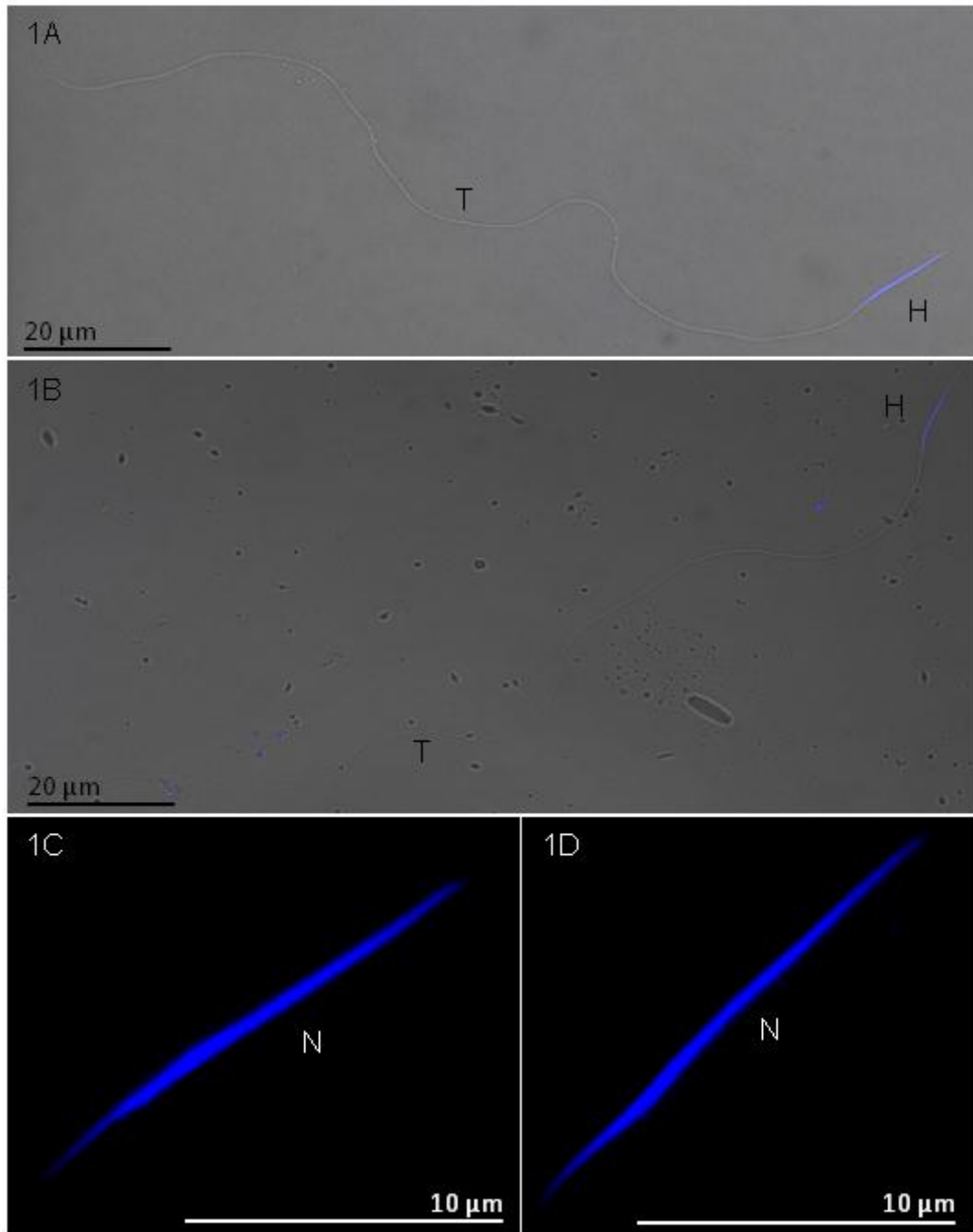


Figura 1. A-D. Micrografia de luz dos espermatozóides de *Chloroprocta idioides* e *Chrysomya albiceps*. A-B. Comprimento total dos espermatozóides de *Chloroprocta idioides* e *Chrysomya albiceps*, respectivamente. Cabeça (H) e flagelo (T). C-D. Marcação com DAPI na região nuclear (N) nas duas espécies, respectivamente.

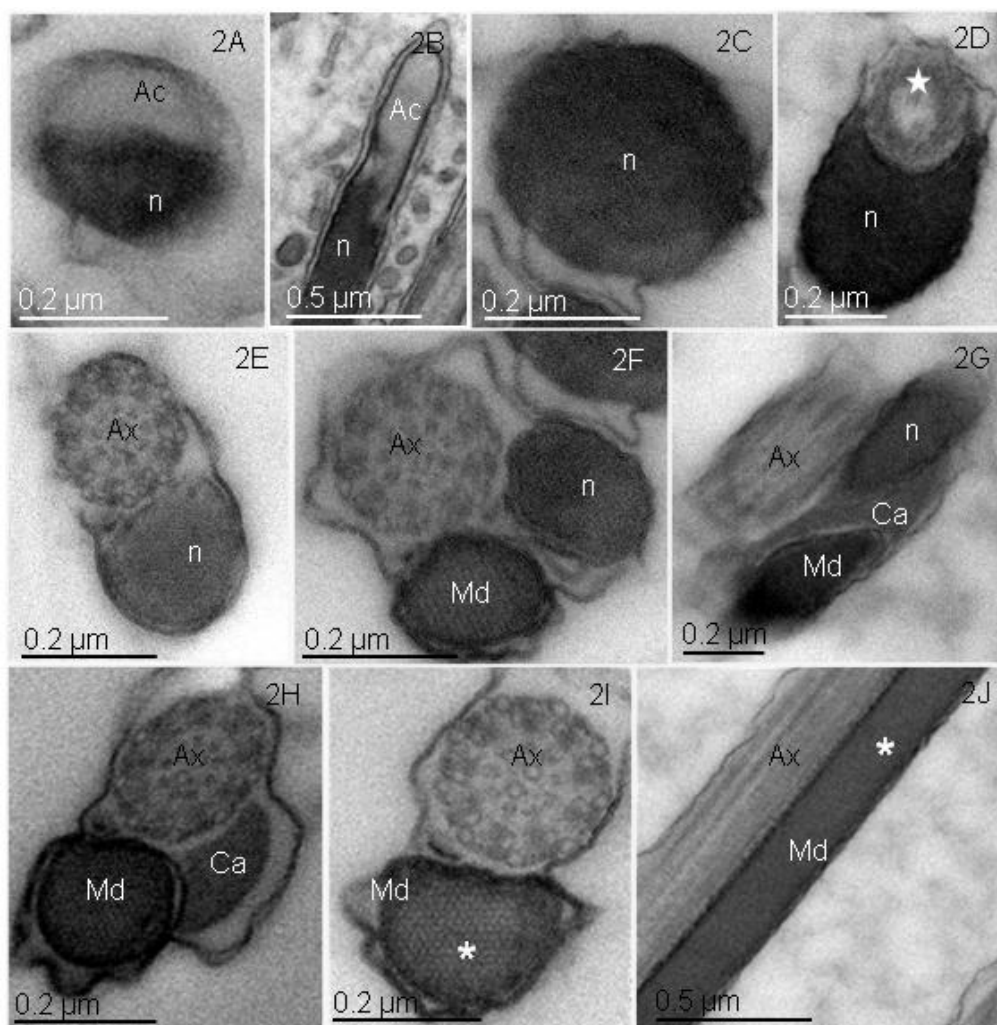


Figura 2. A-J. Aspectos ultraestruturais dos espermatozoides de *Chloroprocta idioidea*, *Calliphora peruviana*, *Compsomyiops verena*, *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana*. **(A, E, F, H, I)** *Chloroprocta idioidea*, **(B)** *Hemilucilia segmentaria*, **(C, D, J)** *Calliphora peruviana* e **(G)** *Compsomyiops verena*. O material de *Calliphora peruviana* e *Compsomyiops verena* analisado foi obtido de espermateca. **A.** Secção transversal do acrossoma (Ac) evidenciando o aspecto elíptico e desta estrutura. **B.** Em secção longitudinal do acrossoma (Ac) observa-se o aspecto cônico e espesso desta estrutura. **C.** Núcleo (n) em secção transversal, com a cromatina altamente condensada. **D.** Em secção transversal é possível observar a região de implantação do axonema (estrela). **E.** Ainda na região nuclear é possível observar o axonema (Ax) completo. **F.** Pouco antes da região de justaposição observou-se a presença do derivado mitocondrial (Md) ao lado do núcleo (n), ambos em frente ao axonema (Ax). **G.** A região de justaposição ('overlap') é marcada pelo aparecimento do adjunto do centríolo (Ca). Nesta região, o núcleo e as estruturas flagelares (axonema e derivado mitocondrial) podem ser observados. **H-J.** Região flagelar. **H.** A região do flagelo é marcada pelo aumento em volume do adjunto do centríolo (Ca), presença do axonema (Ax) e do derivado mitocondrial (Md). **I.** A região subsequente é caracterizada pelo desaparecimento do adjunto do centríolo e presença apenas do derivado mitocondrial, preenchido por material paracrystalino (asterisco) e do axonema. **J.** Secção longitudinal da região flagelar. Material paracrystalino (asterisco).

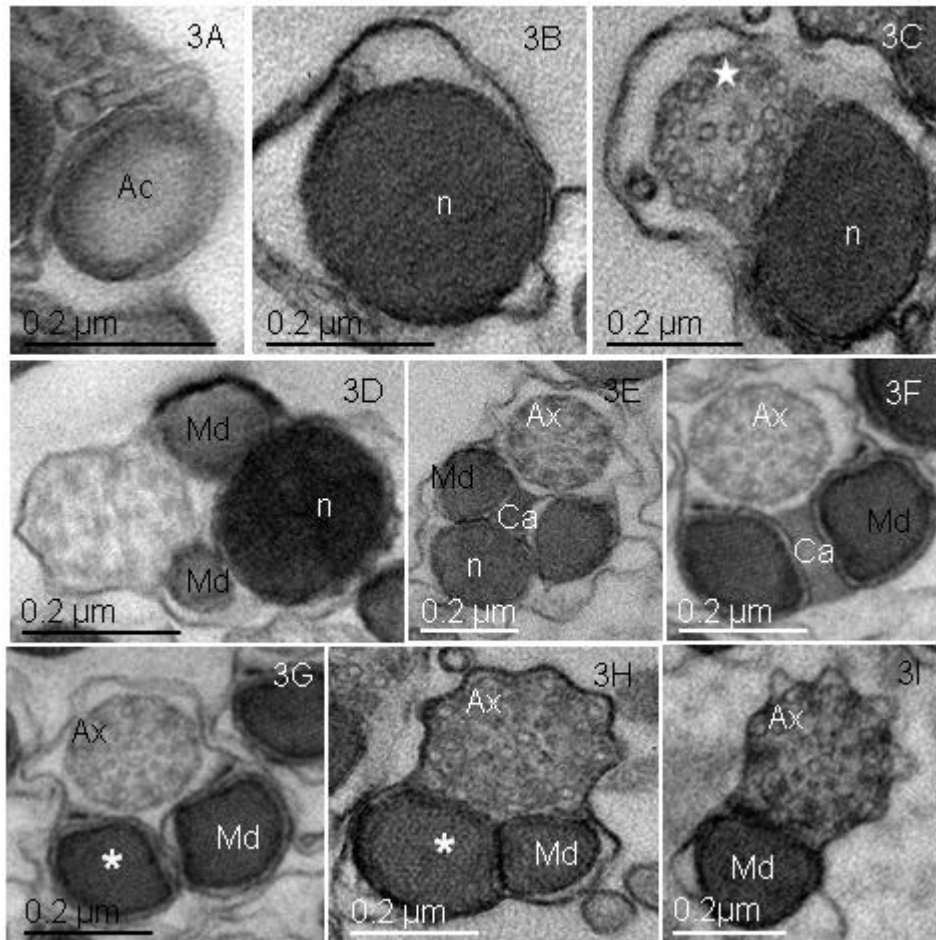


Figura 3. A-I. Aspectos ultraestruturais do espermatozóide de *Chrysomya albiceps* **A.** Secção transversal do acrossoma (Ac) evidencia o aspecto elíptico desta estrutura. **B.** Em secção transversal núcleo (n) com a cromatina altamente condensada. **C.** Secção transversal da região de implantação do axonema (estrela). **D.** Antes da região de justaposição ('overlap') observou-se a presença dos derivados mitocondriais ao lado do núcleo, em frente ao axonema. **E.** Região de justaposição ('overlap') marcada pelo aparecimento do adjunto do centríolo (Ca). Nesta região, o núcleo (n) e as estruturas flagelares (axonema e derivados mitocondriais) podem ser observados. **F-I.** Região flagelar. **F.** Região do flagelo marcada pelo aumento do tamanho do adjunto do centríolo (Ca), presença do axonema (Ax) e dos derivados mitocondriais (Md). **G-I.** As regiões subsequentes são caracterizadas pelo desaparecimento do adjunto do centríolo, **(H)** redução do diâmetro e perda de um dos derivados mitocondriais e **(I)** presença apenas de um derivado mitocondrial e do axonema. Derivados mitocondriais preenchidos por material paracrystalino (asterisco).

CONCLUSÕES FINAIS

A análise morfológica do aparelho reprodutor interno das espécies *Lucilia cuprina* e *L. eximia* (dados publicados); *Cochliomyia hominivorax* e *Co. macellaria* (dados não publicados); *Chrysomya megacephala* (dados publicados); *C. albiceps*, *Chloroprocta idioidea* e *Hemilucilia segmentaria* (dados não publicados), revelou que os mesmos são formados por: dois testículos com ductos deferentes emparelhados e glândulas acessórias, uma vesícula seminal e um ducto ejaculatório. Apenas nas espécies do gênero *Lucilia* observou-se que a vesícula seminal possui uma dilatação, característica esta que a torna distinta das demais espécies.

As espécies *Lucilia cuprina*, *L. eximia*, *Cochliomyia hominivorax*, *Co. macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *Chloroprocta idioidea* e *Hemilucilia segmentaria* tiveram seus espermatozóides analisados em microscopia de luz e os espermatozóides mostraram-se longos, delgados e filiformes. Nestas espécies foram observadas variações significativas no comprimento, ou seja, o espermatozóide apresenta polimorfismo. Apenas na espécie *Chrysomya megacephala* o polimorfismo não foi observado.

Dentre as espécies que possuem polimorfismo, os maiores espermatozóides encontrados pertencem à espécie *Lucilia cuprina*, tanto para comprimento total quanto para o comprimento do flagelo. Os maiores comprimentos observados na região da cabeça, foram encontrados em *Cochliomyia macellaria*, e o menor comprimento total do espermatozóide foi encontrado em *Hemilucilia segmentaria*.

A análise citoquímica de carboidratos foi feita em oito espécies de Calliphoridae: *Lucilia cuprina*, *L. eximia*, *Cochliomyia hominivorax*, *Co. macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *Chloroprocta idioidea* e *Hemilucilia segmentaria*. Foi observada a presença de resíduos de carboidratos nas espermátides e nos espermatozóides. O perfil de marcação foi diferente nos dois tipos celulares, evidenciando maiores concentrações de carboidratos nas espermátides do que nos espermatozóides. Nos espermatozóides as marcações variaram de acordo com a região podendo estar presentes na membrana da região do acrossoma e do núcleo, apenas na membrana da região nuclear, na membrana da região flagelar ou ainda, em toda a extensão da célula.

Com relação à ultraestrutura do espermatozóide, foram analisadas doze espécies entre as encontradas no Brasil (*Lucilia cuprina*, *L. eximia*, *Cochliomyia hominivorax*, *Co. macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana*) e as espécies encontradas nos Andes Colombianos (*Lucilia peruviana*, *Calliphora peruviana* e *Compsomyiops verena*). Com base em estudos realizados anteriormente em representantes de Brachycera, os espermatozóides possuem duas regiões distintas, sendo a região da cabeça formada pelo acrossoma e o núcleo e a região do flagelo formada pelo axonema, dois derivados mitocondriais e o adjunto do centríolo.

Entretanto, como resultados das análises ultraestruturais realizadas neste trabalho estamos propondo dois tipos de espermatozóides dentro de Brachycera. O primeiro compartilha as características descritas anteriormente: um acrossoma apical do tipo mais simples (sem membrana extra-acrossomal); um núcleo compacto; dois derivados mitocondriais de diâmetros iguais e comprimentos diferentes, preenchidos por material paracristalino e um axonema com arranjo 9+9+2

de microtúbulos e um adjunto do centríolo circundado por todas as estruturas da região de justaposição “overlap”. O segundo levaria em consideração as diferenças encontradas na ultraestrutura: um acrossoma apical do tipo mais simples (sem membrana extra-acrossomal), um núcleo compacto; um único derivado mitocondrial, preenchido por material paracristalino e um axonema com arranjo 9+9+2 de microtúbulos, e um adjunto do centríolo. Por possuir um único derivado mitocondrial, o novo tipo de espermatozóide apresenta alterações com relação à disposição das organelas na região de justaposição. A estrutura do adjunto do centríolo pode ser observada em frente ao axonema e entre o derivado mitocondrial e o núcleo, e não entre os derivados mitocondriais, núcleo e axonema, como é observado no primeiro tipo.

As espécies que possuem o primeiro tipo de espermatozóide são: *Chrysomya megacephala*, *C. albiceps*, *Cochliomyia hominivorax*, *Co. macellaria* e *Lucilia cuprina*. Com relação à classificação atual destas espécies, as duas espécies do gênero *Chrysomya*, bem como as duas do gênero *Cochliomyia*, pertencem à subfamília Chrysomyinae (Dear 1985) e a espécie do gênero *Lucilia* à subfamília Luciliinae (Rognes, 1997).

As espécies que possuem o segundo tipo de espermatozóides, com um único derivado mitocondrial são: *Lucilia eximia*, *L. peruviana*, *Chloroprocta idioidea*, *Compsomyiops verena*, *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana*. Com relação à classificação atual destas espécies, as duas espécies do gênero *Lucilia* pertencem à subfamília Luciliinae (Rognes, 1997), e as demais espécies pertencem à subfamília Chrysomyinae (Dear 1985).

Além da presença de um único derivado mitocondrial nas espécies *Lucilia eximia*, *L. peruviana*, *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana*, estas espécies compartilham outra característica comum, que é o acrossoma espesso, morfológicamente diferente do acrossoma presente nas outras espécies analisadas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com Rognes (1997), pelo fato de existirem muitas espécies de Calliphoridae e poucas delas terem sido estudadas até o momento, a taxonomia do grupo ainda deve sofrer variações, à medida que mais espécies forem sendo descritas.

Com base nas observações ultraestruturais dos espermatozoides de todas as espécies analisadas neste trabalho, e reconhecendo que existe uma grande variabilidade de estruturas que ocorrem nos espermatozoides de dípteros (Tabela 1), o estudo da morfologia comparada nos permitiu discutir aqui, alguns caracteres que poderão ser utilizados em estudos futuros de taxonomia e filogenia de Calliphoridae. Tais caracteres têm sido utilizados com sucesso em outros grupos de insetos (Dallai *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1999; Zama *et al.*, 2005).

I - Acrossoma

A ausência de acrossoma em Diptera foi observada por Dallai & Mazzini (1983) e Dallai e colaboradores (1996) em representantes de Cecidomyiidae. Tal estrutura encontra-se ausente na subfamília Lestremiinae, considerada morfologicamente a mais basal de Cecidomyiidae. Estamos considerando que nos demais representantes de Diptera, onde o acrossoma encontra-se presente, esse caráter seja apomórfico. Uma vez estando presente, tal estrutura apresenta uma série de variações em sua morfologia (Dallai *et al.*, 1984; Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012).

O acrossoma dotado de *perforatorium* foi observado na família Psychodidae (Dallai *et al.*, 1984; Fausto *et al.*, 1995). Nas demais espécies de Diptera, tal estrutura não foi observada. Com base na posição taxonômica ocupada por Psychodidae dentro do grupo, e também por esta estrutura estar restrita a este táxon estamos considerando que ela seja uma plesiomorfia. A ausência deste caráter nos demais Nematocera e em todos os Brachycera já estudados (Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012) propõe que essa característica seja derivada dentro do grupo.

Considerada uma estrutura vesicular que apresenta variações morfológicas nos diferentes espécimes analisados, o acrossoma pode ser encontrado justaposto ao núcleo, entre a membrana plasmática e o perforatorium, como em *Lutzomyia* (Fausto *et al.*, 1985); pequeno e esférico na região apical do núcleo como observado em *Culicidae* (Báo & De Souza, 1992), ou ainda, alongado e inserido lateralmente em uma indentação do núcleo, como acontece na maioria das famílias em Nematocera e em todos os Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999), incluindo todos os representantes de Calliphoridae aqui analisados. Com base nas observações feitas, estamos considerando a morfologia do acrossoma em *Lutzomyia* como sendo uma característica plesiomórfica, por estar restrita a um pequeno grupo e ausente nos grupos mais recentes, e as descrições subseqüentes como características apomórficas.

Com relação ao conteúdo acrossomal, organizações cristalinas (fibras e corpos cristalinos) que são comuns mesmo em dípteros mais basais, podem também estar presentes em grupos considerados mais derivados. As fibras cristalinas estão presentes na maioria dos Nematocera (Dallai *et al.*, 1984) e corpos

paracristalinos foram observados em representantes da família Psychodidae (Dallai *et al.*, 1984, Fausto *et al.*, 1995) e também em *Sacophaga bullata* (Warner, 1971).

Com relação à membrana extra-acrossomal, ela pode apresentar dupla camada como ocorre em representantes de Psychodidae ou ainda, uma única camada, como acontece na maioria dos Nematocera (Dallai *et al.*, 1994) e em todos os Brachycera já estudados (Jamieson, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012), confirmado também para todas as espécies de Calliphoridae analisadas neste trabalho. Pelo fato deste caráter (membrana acrossomal com dupla camada) estar presente somente em Psychodidae e ausente nos demais representantes de Diptera ele está sendo considerado aqui, como um caráter basal e sua variação (mono camada) considerada como um caráter derivado.

2 – Núcleo

Com relação à forma do ápice do núcleo, e considerando a região de inserção do acrossoma nele, ele pode ser: triangular, chanfrado em um dos lados ou nos dois lados; trapezoidal e levemente chanfrado em uma das laterais, ou ainda, côncavo. O ápice do núcleo em forma côncava foi observado em representantes de Psychodidae (*Phlebotomus*) (Dallai *et al.*, 1984); trapezoidal e levemente chanfrado em uma das laterais (Dallai *et al.*, 1984), e triangular (chanfrado dos dois lados) (Báo & De Souza, 1992) foi observado em representantes de Culicidae; triangular pontiagudo e fortemente chanfrado em um dos lados foi observado na maioria dos Nematocera e em todos os Brachycera analisados (Jamieson, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012). Estamos considerando a última forma como a forma derivada do caráter uma vez que a característica em questão ocorre na maioria dos Nematocera e está presente em todos os Brachycera conhecidos.

3 – Derivado Mitocondrial

O derivado mitocondrial é formado a partir da fusão das mitocôndrias e pode assumir aspectos morfológicos distintos neste grupo. Com relação ao número de derivados, foram encontradas espécies com um, dois, três ou quatro derivados mitocondriais. *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae) (Fausto *et al.*, 1995), *Plecia neartica* (Bibionidae) (Trimble & Thompson, 1974) e *Sciara coprophila* (Makielski, 1966) são alguns dos exemplos de nematóceros que possuem apenas um derivado mitocondrial. A maioria dos Nematocera possui dois derivados mitocondriais, e todos os Brachycera descritos até o presente momento também apresentavam dois derivados mitocondriais (Jamieson *et al.*, 1999). Entretanto, na família Calliphoridae foi observado que sete das doze espécies analisadas possuem apenas um derivado enquanto as demais possuem dois derivados. Em *Anaretella cincta* (Cecidomyiidae) (Dallai *et al.*, 1996) foram observados de dois a quatro derivados mitocondriais. Nesta espécie observou-se ainda uma mitocôndria completamente circundada pelos microtúbulos periféricos. Com base nestas observações, pode-se afirmar que a forma apomórfica do caráter ocorre em *A. cincta*, uma vez que tal característica não é observada em representantes de grupos derivados dentro de Diptera.

Com relação à disposição dos derivados mitocondriais em relação ao axonema, em secções transversais da região flagelar, observou-se que eles podem ser encontrados: um de cada lado do axonema, em frente ao axonema, ou ainda, ventralmente localizados em relação a tal estrutura. Em alguns representantes de Chironomoidea (Dallai *et al.*, 2007), os dois derivados mitocondriais podem ser vistos um em cada lado do axonema, no mesmo alinhamento. Em *Limonia nuberculosa* (Limoniidae) (Dallai *et al.*, 2008) e em *Lucilia eximia* e *L. peruviana* (Calliphoridae) (Name *et al.*, 2012), ele pode ser observado em frente ao axonema,

na região flagelar. Na maioria dos Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999), inclusive em alguns representantes de Calliphoridae, ele pode ser observado ventralmente ao axonema (Name *et al.*, 2010). De acordo com as variações observadas para o caráter em questão, e observando que a primeira disposição (na qual os derivados mitocondriais encontram-se um em cada lado do axonema) esteve presente apenas em grupos basais, a proposta é de que este seja um estado plesiomórfico do caráter e os demais estados sejam considerados apomórficos.

Considerando o aspecto do material paracristalino presente no interior dos derivados mitocondriais, ele pode ser parcialmente cristalizado ou totalmente cristalizado. Em Mycetophilidae (Dallai & Mazzini, 1983), bem como em outros Nematocera o material paracristalino apresenta cristalização incompleta. Em todos os Brachycera observados até o presente momento, o material paracristalino apresenta-se completamente cristalizado. Por este motivo, esse perfil de cristalização está sendo considerado como o caráter mais derivado.

A disposição do material paracristalino no interior do derivado mitocondrial apresenta variações. Ele pode ser encontrado preenchendo totalmente o derivado mitocondrial ou ainda, localizado em uma região específica do derivado. O preenchimento parcial foi observado em representantes de Cecidomyiidae (Dallai *et al.*, 1996), Chironomidae (Dallai *et al.*, 2007) e Ceratopogonidae (Baccetti *et al.*, 1974), sendo comumente observado em Nematocera (Jamieson *et al.*, 1999). Nos braquíceros descritos, incluindo as espécies de Calliphoridae aqui analisadas, o interior do derivado mitocondrial pode ser considerado totalmente preenchido pela estrutura paracristalina. Com base nestas observações, acredita-se que as espécies mais basais para este caráter sejam as espécies de Nematocera.

4– Adjunto do Centríolo

O adjunto do centríolo pode estar presente na espermatíde e não estar presente no espermatozóide (Phillips, 1970; Baccetti, 1972). Em *Sarcophaga bullata* (Sarcophagidae) (Warner, 1971) o adjunto do centríolo desaparece à medida que a célula se diferencia, não sendo encontrado no espermatozóide. Tal estrutura está presente na espermiogênese da maioria dos representantes de Calliphoridae aqui estudados, permanecendo no espermatozóide de todas elas. Em Nematocera, o adjunto do centríolo é encontrado em representantes de algumas famílias (Breland *et al.*, 1966; Dallai *et al.*, 1996; 2007).

O adjunto do centríolo pode ser encontrado tanto em representantes de Nematocera quanto em representantes de Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999). Corpos acessórios, estruturas análogas ao adjunto do centríolo, também ocorre em representantes das duas infraordens de Diptera. Em Brachycera, corpos acessórios só foram descritos até o momento nas espécies *Megaselia scalaris* (Phoridae) (Curtis *et al.*, 1989) e *Anthrax* sp. (Bombyliidae) (Jamieson *et al.*, 1999). O adjunto do centríolo foi observado em representantes de Culicidae (Breland *et al.*, 1966) e está presente em quase todos os Brachycera estudados (incluindo as doze espécies de Calliphoridae envolvidos neste estudo), exceto os que apresentam corpos acessórios. Não foi possível chegar a uma conclusão sobre qual forma do caráter aqui apresentado pode ser considerado basal ou derivado.

Com relação ao número de estruturas, pode apresentar-se com uma configuração única; composto por nove subestruturas ou ainda com um número indeterminado de subestruturas compostas de corpos densos poligonais circundando o início do axonema. Esta última descrição corresponde ao adjunto do

centríolo em *Lestremia* sp (Dallai *et al.*, 1996), que pode ser considerado aberrante, quando comparado aos demais. A presença das nove subestruturas foi observada nas espécies *Polypedilum nuberculosum* e *Cricotopus cf annulator* (Cecidomyiidae) (Dallai *et al.*, 2007), respectivamente. A estrutura única foi observada em representantes da família Culicidae (Breland *et al.*, 1966), Cecidomyiidae (Dallai *et al.*, 1996) e também nos Brachycera já descritos (Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012). Por estar presente tanto em Nematocera quanto em Brachycera, o caráter que se apresenta como único pode ser considerado apomórfico para o grupo.

Morfologicamente pode possuir forma de arcos, reniforme, circular, semicircular, retangular e triangular. A forma de arcos foi descrita na espécie *Polypedilum nuberculosum* e a reniforme na espécie *Cricotopus cf annulator* (Cecidomyiidae) (Dallai *et al.*, 2007). A estrutura em forma circular foi observada em Culicidae (Breland *et al.*, 1966) circundando todo o axonema. A forma semicircular foi observada em *Anaretella cincta* (Cecidomyiidae) (Dallai *et al.*, 1996), em frente ao axonema, ancorando os três derivados mitocondriais. A forma retangular e triangular foi observada em *Lestremia* (Cecidomyiidae) e em alguns representantes de Brachycera (Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012). Embora existam diversas variações para este caráter, o fato de existir um perfil de repetição nos representantes de Brachycera, neste grupo ele está sendo considerado como sendo um caráter derivado.

5 – Axonema

O axonema é a estrutura que possui maior variação em sua morfologia dentro de Diptera. Quanto ao número de microtúbulos no axonema, ele pode ser: 0+9+0;

9+1; 9+2; 9+3; 9+9+0; 9+9+1; 9+9+2; 9+9+3; 7+9+2; 2+9+2; N+N+0, sendo todas essas variações encontradas em Diptera. O axonema convencional observado nos pterigotas, com a organização de 9+2 microtúbulos, persiste em poucas famílias de Nematocera (Trichoceridae, Tipulidae, Ceratopogonidae e Chironomidae) (Jamieson *et al.*, 1999).

Com relação aos microtúbulos acessórios, eles podem não estar presentes, como observado em representantes de Cecidomyiidae (Lanzavecchia *et al.*, 1991); podem apresentar apenas 2 ou 7 microtúbulos como observado em representantes de Mycetophilidae (Dallai *et al.*, 1993); podem não existir nesta configuração, apresentando-se aberrante como observado em Sciaridae (Dallai & Afzelius, 1990) ou podem ainda, estar presentes em número de nove, em grande parte dos Nematocera e em todos os Brachycera já estudados.

Foi observado que os microtúbulos centrais sofrem variações em suas quantidades. Podem estar ausentes (0), podem ser únicos (1) ou ainda, em número de dois (2) ou três (3). Estão ausentes em Sciaridae (Dallai & Afzelius, 1990) e alguns representantes de Cecidomyiidae (Lanzavecchia *et al.*, 1991); é único em alguns representantes de Culicidae e Bibionidae (Dallai *et al.*, 1993); dois microtúbulos centrais são observados na maioria dos Nematocera e em todos os Brachycera (Dallai *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1999; Name *et al.*, 2010, 2012) e três microtúbulos centrais foram observados em representantes de Simuliidae e Cecidomyiidae (Baccetti *et al.*, 1974; Dallai & Mazini, 1983, respectivamente).

As variações morfológicas observadas nos microtúbulos centrais do axonema são discutidas por Dallai e colaboradores (1993). Na família Culicidae, *Anopheles maculipennis* não possui os microtúbulos centrais, enquanto em *Culex pipiens* e

Culex quinquefasciatus (Báo *et al.*, 1992) ele encontra-se modificado em forma de bastão. Em *Chironomus* (Chironomidae) apenas um microtúbulo foi observado, com características morfológicas distintas das observadas nas demais espécies. Em *Biblio* sp tal estrutura encontra-se modificada em forma de roseta, com o lúmen translúcido e a borda espessa e elétron densa.

Com relação às estruturas observadas no axonema de todas as espécies de Diptera aqui relatadas, estamos considerando a organização 9+9+2 de microtúbulos como sendo um caráter apomórfico dentro do grupo, uma vez que em Brachycera, que é um grupo considerado derivado, tal estrutura não sofre variação.

6 – Região de Justaposição (“overlap”)

A região de justaposição “overlap” em Calliphoridae compreende o final da região nuclear e o início da região flagelar (Name *et al.*, 2010, 2012). Nesta região, observa-se a presença do núcleo e de todas as estruturas flagelares. Tais características foram observadas também nas espécies *Megaselia scalaris* (Curtis *et al.*, 1989) e *Anthrax* sp (Jamieson *et al.*, 1999). A organização observada nesta região não foi descrita em representantes de Nematocera até o momento, sugerindo que esta seja uma forma derivada deste caráter.

Os aspectos estruturais, ultraestruturais e citoquímicos dos espermatozóides de representantes de Calliphoridae analisados neste trabalho, por si só não corroboram a hipóteses de monofiletismo proposta para a subfamília Chrysomiinae por Baneshwar & Wells (2011). Por outro lado, os resultados aqui observados concordam com a hipótese de Rognes (1997) de que Calliphoridae não é um grupo monofilético.

Algumas características presentes nas três espécies de *Lucilia* aqui analisadas (vesícula seminal expandida, glândulas acessórias longas, acrossoma volumoso) as tornam distintas das demais espécies estudadas, concordando com a classificação proposta por Rognes (1997), onde Luciliinae torna-se uma subfamília de Calliphoridae, com base na seguinte característica morfológica externa: presença de um esclerito verde metálico setoso posteriormente na crista supra esquamal.

Estudos envolvendo um maior número de representantes de Calliphoridae são necessários - uma vez que poucas espécies encontram-se descritas até o momento, para que se possa chegar a um consenso sobre as relações de parentesco dentro da referida família.

Tabela 1. Caracteres ultraestruturais obtidos a partir da análise dos espermatozóides de Calliphoridae (destacados em vermelho), comparados com dados de outros representantes de Diptera*.

| Espécies | Acrossoma | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|---|--|---------------------------------------|---|--------------------------------|--|---|---|--|
| | Acrossoma | Perforatorium | Justaposto ao núcleo (entre membrana plasmática e perforatorium) | Pequeno e esférico no ápice do núcleo | Alongado e inserido em uma indentação do núcleo | Presença de fibras cristalinas | Membrana extra-acrossomal monocamada | Membrana extra-acrossomal bicamada | | |
| Cecidomyidae | | | | | | | | | | |
| Calliphoridae | x | | | | x | | x | | | |
| Culicidae | x | | | x | | | | | | |
| Lutzomyia | x | | x | | | | | | | |
| Psychodidae | x | x | | | | | | x | | |
| <i>Sarcophaga bullata</i> | x | | | | | x | | | | |
| Outros Nematocera | x | | | | x | x | x | | | |
| Outros Brachycera | x | | | | x | | x | | | |
| Espécies | Núcleo (em relação à inserção do acrossoma) | | | | | | | | | |
| | Triangular e chanfrado em um dos lados ou nos dois lados | Trapezoidal e levemente chanfrado em uma das laterais | | Côncavo | Triangular, pontiagudo e fortemente chanfrado em um dos lados | | | | | |
| Calliphoridae | | | | | x | | | | | |
| Culicidae | | x | | x | | | | | | |
| Psychodidae | | | | | x | | | | | |
| Outros Nematocera | | | | | x | | | | | |
| Outros Brachycera | | | | | x | | | | | |
| Espécies | Derivados Mitocondriais | | | | | | | | | |
| | 1 derivado | 2 derivados | 2-4 derivados | Lateralmente ao axonema | Em frente ao axonema | Ventralmente ao axonema | Cristalização do material paracristalino | Preenchimento material paracristalino (total) | Preenchimento material paracristalino (parcial) | |
| Bibionidae | x | | | | | | | | | |
| Calliphoridae | x | x | | | x | x | completa | x | | |
| Cecidomyidae | | | x | | | | | | x | |
| Chironomoidea | | x | | x | | | | | x | |
| Ceratopogonidae | | | | | | | | | x | |

| | | | | | | | | | |
|-------------------|---|---|--|--|---|---|------------|---|---|
| Limoniidae | | | | | x | | | | |
| Mycetophilidae | | | | | | | incompleta | | |
| Psychodidae | x | | | | | | | | |
| Sciaridae | x | | | | | | | | |
| Outros Nematocera | | x | | | | x | | x | |
| Outros Brachycera | | x | | | | x | completa | x | x |

| Espécies | Adjunto do Centríolo | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------|----------|--------------|------------|------------|
| | Presente ou | Ausente | Único | Quantidade indeterminada | Morfologia do adjunto do centríolo | | | | | |
| | | | | | Arcos | Reniforme | Circular | Semicircular | Retangular | Triangular |
| Calliphoridae | x | | x | | | | | | x | x |
| Culicidae | | | x | | | | x | | | |
| Cecidomyiidae | | | x | | x | x | | x | | |
| <i>Lestremia</i> sp | | | | x | | | | | x | x |
| Alguns Nematocera | x | x | | | | | | | x | |
| Brachycera | x | x | x | | | | | | x | x |

| Espécies | Axonema | | | | | | | |
|----------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|--|--|--|
| | Microtúbulos Acessórios | Microtúbulos Periféricos | Microtúbulos Centrais | Morfologia dos Microtúbulos centrais | | | | |
| | | | | Forma de Bastão | Forma de Roseta | | | |
| Bibionidae | | | 1 | | x | | | |
| Calliphoridae | 9 | 9 | 2 | | | | | |
| Cecidomyiidae | ausente | | 3 ou ausentes | | | | | |
| Chironomidae | | | 1 | | x | | | |
| Culicidae | | | 0 ou 1 | x | | | | |
| Mycetophilidae | 2 ou 7 | | | | | | | |
| Sciaridae | aberrante | | ausente | | | | | |
| Simuliidae | | | 3 | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------|---------------|---|--|--|--|--|--|--|
| Brachycera | 9 | | 2 | | | | | | |
| Alguns Nematocera | 9 | | 2 | | | | | | |
| Espécies | Região de Justaposição | | | | | | | | |
| | Presente | Não observada | | | | | | | |
| Calliphoridae | x | | | | | | | | |
| Megaselia scalaris | x | | | | | | | | |
| Outros Brachycera | | x | | | | | | | |
| Nematocera | | x | | | | | | | |

* Nunez *et al.*, 1963; Breland *et al.*, 1966; Makielski, 1966; Phillips, 1970; Warner, 1971; Baccetti, 1972; Baccetti *et al.*, 1974; Trimble & Thompson, 1974; Dallai & Mazzini 1983; Dallai *et al.*, 1984; Curtis *et al.*, 1989; Dallai & Afzelius, 1990; Lanzavecchia *et al.*, 1991; Bão & De Souza, 1992; Dallai *et al.*, 1993; Fausto *et al.*, 1995; Dallai *et al.* 1996; Jamieson *et al.*, 1999; Dallai *et al.*, 2007; Dallai *et al.*, 2008; Name *et al.*, 2010, 2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agungpriyono S, Kurohmaru M, Prasetyaningtyas WE, Kaspé L, Leus KYG, Sasaki M, Kitamura N, Yamada J, Macdonald AA. 2007. A lectin histochemical study on the testis of Babirusa, *Babyroussa babyroussa* (Suidae). *Anat Histol Embryol* **36**, 343-348.
- Amorim DS, Silva VC, Balbi MIPA. 2002. Estado do conhecimento dos Díptera 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.
- Baccetti B. 1972. *Insect Sperm Cell*. *Adv Insect Physiol* 575 p.
- Baccetti B. & Afzelius BA. 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. Díptera), *Redia* **49**, 1-29.
- Baccetti B, Dallai R, Giusti F, Bernini F. 1974. The spermatozoon of Arthropoda XXIII. The 9+9+3 spermatozoon of simuliid Díptera. *J Ultrastruct Res* **46**, 427-440.
- Baneshwar S & Wells JD. 2011. Chrysomyinae (Díptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. *Syst Entomol* **36**, 415-420.

- Báo SN & Dolder H. 1990. Ultrastructural localization of acid phosphatase in spermatid cells of *Ceratitis capitata* (Diptera). *Histochem* **93**, 439-442.
- Báo SN & Dolder H. 1991a. Testicular organization in adult *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): RA mutant and Wild-type lineages. *Rev Bras Biol* **51**, 313-319.
- Báo SN & Dolder H. 1991b. Abnormal characteristics observed in spermatid cell during spermiogenesis in the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Rev Bras Gen* **14**, 287-297.
- Báo SN. & W De Souza. 1992. Lectin binding sites on head structures of the spermatid and spermatozoon of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Histochem* **98**, 365-371.
- Breland OP, Gassner G, Ries RW, Biesele JJ. 1966. Certain aspects of the centriole adjunct, spermiogenesis, and the mature sperm of insects. *Can J Genet Cytol* **8**, 759-773.
- Calvo A, Pastor LM, Bonet S, Pinart E, Ventura M. 2000. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J Reprod Fertil* **120**, 325-335.
- Carcupino 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). *Mem Mus Natn Hist Nat* **166**, 291-296.
- Carvalho CJB. & Ribeiro PB. 2000. Chave para identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* **9**, 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 EP. & Goff ML. 1992. Forensic Entomology in criminal investigations. *Ann Rev Entomol* **37**, 253-272.
- Curtis SK, Benner DB, Musil G. 1989. Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *J Morphol* **200**, 47-61.
- Dallai R & Afzelius BA. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: results obtained with a new fixative. *J Struct Biol* **103**, 164-179.
- Dallai R & Afzelius BA. 1991. Sperm flagellum of *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritide) and *Drosophila melanogaster* Meigen (Drosophilidae) (Diptera). *Int J Insect Morphol Embryol* **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*. Mem. Mus. Nat. Hist. Nat. 166.
- Dallai R & Mazzini M. 1993. Spermatozoa and Diptera phylogeny, in: *The Sperm Cell* (Ed. J. André), Martinus Nijhoff, The Hague, 440-445p.
- Dallai R, Baccetti B, Mazzini M, Sabatinelli G. 1984. The spermatozoon of three species of *Phlebotomus* (Phlebotominae) and the acrosomal evolution in nematoceran dipterans. *Int J Insect Morphol Embryol* **13**, 1-10.
- Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S, Afzelius BA. 1993. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zool Scr* **22**, 193-202.

- Dallai R, Lombardo BM, Lupetti P. 2007. Sperm ultrastructure in Chironomoidea (Insecta, Diptera). *Tissue Cell* **39**, 179-194.
- Dallai R, Lombardo BM, Mercati D, Vanin S, Lupetti P. 2008. Sperm structure of Limoniidae and their phylogenetic relationship with Tipulidae (Diptera, Nematocera) *Arthropod Struct Dev* **37**, 81-92.
- Dallai R, Lupetti P, Afzelius BA, Mamaev BM. 1996. The sperm structure of the gall-midges *Anaretella* and *Lestremia* (Insecta, Diptera, Cecidomyiidae). *Tissue Cell* **28**, 331-338.
- David JAO, Rocha T, Caetano FH. 2008. Ultramorphological characteristics of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) eggs and its eclosion. *Micron*, **39**, 1134-1137.
- Evenhuis NL. Pape T, Pont AC, Thompson FC (eds). 2007. *BioSystematic Database of World Diptera, Version 10*. Available at <http://www.diptera.org/biosys.htm>, accessed 20 january 2008.
- Fausto AM, Mazzini M, Maroli M, Feliciangeli MD. 1995. Spermatozoon of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz. and Neiva) (Diptera, Psychodidae), *B Zool* **62**, 339-343.
- Ferreira A & Dolder H. 2003. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochem* **105**, 339-352.
- Gassner G. (1970). Studies on the housefly centriole adjunct. *J Cell Biol*, **47**, 69a.

- Gassner G, Klemetson DJ, Richard RD. (1972). Spermiogenesis in the housefly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): a transmission electron microscope study. *Int J Insect Morphol Embryol* **1**, 105-120.
- Ghandour AM. 1988. Health hazards in humans and animals caused by imported livestock diseases in Saudi Arabia. *Pro Entomologia*, Basle, Switzerland **9**, 468-477.
- Guimarães JH & Papavero N. 1999. *Miíasis in man and animals in Neotropical region*. São Paulo. Editora Pleiade/FAPESP. 308p.
- Heifetz I, Tram U, Wolfner, F. 2001. Male contributions to egg production: the role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci* **268**, 175-180.
- James MT. 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 BGM (1987) *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge, 320p.
- Jamieson BGM, Dallai R and Afzelius BA (1999) *Insects: their spermatozoa and phylogeny* (Enfield, New Hampshire USA - Science Publishers Inc.). 555p.
- Koehler JH. 1978. The mammalian sperm surface. Studies with specific labeling techniques. *Int Rev Cytol.* **54**, 73-195.
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM, Meyer R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on de superfamily

- Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpines's fly. *Sys Entomol* **35**, 614-635.
- Lanzavecchia S, Dallai R, Bellon PL, Afzelius BA. 1991. The sperm tail of a gall midge and its microtubular arrangement studied by two strategies of image analysis. (Cecidomyiidae, Diptera, Insecta). *J Struct Biol* **107**, 65-75.
- Lee W-Y, Sun C-Y, Tsai W-S. 1975. The acrosome formation of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel. *Bull Inst Zool, Academia Sinica (Taipei)*, **14**, 27-34.
- Marcondes CB. 2006. *Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Florianópolis. Ed. da UFSC. 89p.
- McAlpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR., Wood DM. (eds.). 1987. *Manual of Nearctic Diptera, Vol. 1 & 2*. Research Branch, Agriculture Canada. Monographs 27 & 28.
- Makielski SK. 1966. The structure and maturation of the spermatozoa of *Sciara coprophila*. *J Morphol* **118**, 11-42.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera: Cyclorhapha) encontradas no Brasil. *Entomol. Vect.* **10**, 255-268.
- Name KPO, Barros-Cordeiro KB, Gama Filho JB, Wolff M, Pujol-Luz JR and Bão SN (2012). Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermiogenesis in three species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *J. Morphol.* **273**, 160-172.
- Name KPO, Pujol-Luz JR, Bão SN. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* **41**, 853-860.

- Pape T, Blagoderov V & Mostovski M B. 2011. Order Diptera Linnaeus, 1758. *In*: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* **3148**, 222-229.
- Perotti ME. 1986. Regional distribution of surface glycoconjugates of *Drosophila* sperm. *In*: *Biology of Reproduction and Cell Motility in Plants and Animals* (M. Cresti & Dallai, Eds). 101-106, University of Siena, Siena.
- Perotti ME & Riva A. 1988. Concanavalin-A binding sites on the surface of *Drosophila melanogaster* sperm: A fluorescence and ultrastructural study. *J Ultramol Struct Res* **100**, 173-182.
- Phillips DM. 1966. Substructure of flagellar tubules. *J Cell Biol* **31**, 635-638.
- Phillips DM. 1970. Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J. Cell Biol* **44**, 243-277.
- Pinart E, Bonet S, Briz M, Pastor LM, Sancho S, Garcia N, Badia E, Bassols J. 2001. Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid postpubertal boars. *Int J Androl* **24**, 153-164.
- Pujol-Luz JR, Marques H, Ururahy-Rodrigues A, Rafael JA, Santana FHA, Arantes LC, Constantino R.. 2006. A Forensic Entomology case from the Amazon Rain Forest of Brazil. *J Forensic Sci* **51**, 1151-1153.
- Pujol-Luz. JR, Arantes LC, Constantino. 2008. Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* **52**, 485-492.
- Quagio-Grassiotto I & Lello E DE. 1996. Cytoplasmic bridges, intercellular junctions, and individualization of germ cells during spermatogenesis in *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). *J Morphol* **227**, 145-154.

- Rognes K. 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Díptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. **Cladistics** **13**, 27-66.
- Roth J. 1983. Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin section. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **31**: 987-999.
- Schrankel KR & Schwalm FE. 1974. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tiss Res* **153**, 44-53.
- Schrankel KR & Schwalm FE. 1975. Virus like particles in spermatids of *Coelopa frigida* (Diptera). *J Invert Pathol* **26**, 265-268.
- Sharon N. & Lis H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am* **268**, 74-81.
- Sinclair BJ, Borkent A, Wood DM. 2007. The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zool J Linnean Soc* **150**, 711-742.
- Trimble JJ & Thompson SA. 1974. Fine structure of the sperm of the lovebug *Plecia neartica* Hardy (Diptera: Bibionidae). *Int J Insect Morphol* **3**, 425-432.
- Varzim FLSB, Moreira K, Vitorelo J, Torres MLM, Prado AP. 2004. Criação e Manutenção de Moscas Varejeiras para Utilização das Larvas em Bioterapia. *In: VI Conpavet/ IV Congresso Paulista de Buiatria/ I Congresso Brasileiro de odontologia Veterinária/ VI Encontro das Entidades de Classe/ I Encontro da Região Sudeste de Buiatria/ LIX Conferência Anual da SPMV.* p. 57-58.

- Warner FD. 1970. New observations on flagellar fine structure. The relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. *J Cell Biol* **47**, 159-182.
- Warner FD. 1971. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrast Res* **35**, 210-232.
- Weil GC, Simon RJ, Sweadner WRA. 1993. Biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg* **19**, 36-48.
- Williamson DL. 1989. Oogenesis and spermatogenesis. *World Crop Pests* Vol. **3A** Fruit Flies. Robinson AS, Hopper G, editors. Elsevier Amsterdam.
- Withwort, T. 2010. Keys to genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa* **2663**, 1-35.
- Wolfner, MF. 1997. Tokens of Love: Functions and Regulations of *Drosophila* Male Accessory Gland Products. *Insect Biochem Molec Biol* **3**, 179-192.
- Yeates DK & Wiegmann BM. 2005. *The evolutionary biology of flies*. Columbia University Press, Chichester, West Sussex. 441p.
- Zama U, Brito P, Lino-Neto J, Campos LAO, Dolder H, Báo SN. 2005. Sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indication of bees relation. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **37**, 313-321.
- Zumpt, F. 1965. *Myiasis in Man and in Animal in the Old World*. Butterworths, London, p. 257.

Anexo I: “Structure and ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in three species of *Lucilia Robineau-Desvoidy*, 1830 (Diptera, Calliphoridae)”. *Journal of Morphology* 273, 160-172. 2012.

Anexo II: “Morphological and cytochemical aspects of spermatozoa in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae)”. Submetido para publicação no *Journal of Microscopy Research and Technique*, 2012.

Anexo I

Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermogenesis in Three Species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae)

Khesler P.O. Name,^{1,2} Karine B. Barros-Cordeiro,² José B. Gama Filho,³ Marta Wolff,⁴ José R. Pujol-Luz,⁵ and Sônia N. Bão^{2*}

¹Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil

²Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil

³Centro Veterinário Asa Sul. Brasília, Distrito Federal, Brazil

⁴Grupo de Entomología, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia

⁵Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brazil

ABSTRACT Morphology of male internal reproductive organs, spermatozoa, and spermogenesis of the blowflies *Lucilia cuprina*, *Lucilia eximia*, and *Lucilia peruviana* is first described here, using light and transmission electron microscopy. Spermogenesis follows the characteristics described for others insect species. The spermatozoa of *L. cuprina* are similar to those described for other Brachycera. However, in *L. eximia* and *L. peruviana*, some differences were found. In *L. cuprina* and *L. eximia* species, the spermatozoa are long and thin, measuring about 211 μm and 146 μm in length, of which the head region measures approximately 19 μm and 17 μm , respectively. A polymorphism was observed in *L. cuprina* and *L. eximia* spermatozoa. In all three species, the head includes a monolayered acrosome with electron-lucent material. The shape of the nucleus, in cross sections, varies from circular to oval with completely condensed chromatin. Implantation of the axoneme was observed in the middle region of the nucleus, known as the “peg” region. In the next region, the beginning of two mitochondrial derivatives of similar diameter and different lengths in *L. cuprina* and only one in *L. eximia* and *L. peruviana* was observed. In the overlap region, the following structures were observed: nucleus, centriolar adjunct, mitochondrial derivatives, and axoneme. The axoneme is of a conventional insectan type with a 9 + 9 + 2 microtubular arrangement. The male internal reproductive tract consists of testis, deferent ducts, a strongly developed seminal vesicle, accessory glands, and ejaculatory duct. These features are consistent with the structural diversity of the dipteran reproductive tract and spermatozoa, comprising an essential tool for understanding the complex variations found in the Diptera. *J. Morphol.* 000:000–000, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: entomology; germ cells; insect sperm; microscopy; reproductive system

INTRODUCTION

According to Kutty et al. (2010), the subsection Calyptratae contains ~18,000 described species, and this taxon is one of the largest and most diverse of Diptera, including the important families that cause, for example, parasitism such as Calliphoridae, Sarcophagidae, and Oestridae. Around the world more than 1,000 species of Calliphoridae (blow-flies) are currently known, grouped in 150 genera and 12 subfamilies (Rognes, 1997). In the Neotropical region, there are 130 described species (Pape et al., 2004; Carvalho and Mello-Patiu, 2008).

Calliphoridae present a great ecological diversity and have a wide variety of life history strategies used by both adults and larvae. Such strategies include decomposition from organic matter, parasitism, and predation on vertebrates and inverte-

Contract grant sponsors: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

*Correspondence to: S.N. Bão, Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, CEP: 70919-970, Brazil. E-mail: snbao@unb.br

Received 21 May 2011; Revised 26 July 2011; Accepted 3 August 2011

Published online in
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/jmor.11012

brates causing medical problems and important losses in the livestock industry and phytophagy on a great variety of plants (Kutty et al., 2010). The genus *Lucilia* Robineau-Desvoidy is predominantly Palaearctic in distribution, and the worldwide dispersion of some species took place following the migration and occupation of new habitats by man and animals. The species of the genus *Lucilia* are also considered as blow-flies, because they exhibit the same synanthropic and feeding behavior observed in other Calliphoridae species (Stevens and Wall, 1996).

The Australian sheep blow-fly *Lucilia cuprina* was first described in China (Smith, 1986) and is currently considered a cosmopolitan species (Gomes and Von Zuben, 2004). *Lucilia eximia* is predominantly Neartic and Neotropical and is the most common species of the genus in Brazil (Moura et al., 1997). *Lucilia peruviana* is found in the Andes region and usually collected at altitudes between 1,900 and 2,800 m in rural areas or preserved forests. There are few studies on this species, and together with *L. cuprina* and *L. eximia*, it is also associated with the active phase of decomposition of carcasses, being an important tool in forensic investigations (Wolff et al., 2001).

Currently, studies have demonstrated that the structure and ultrastructure of internal reproductive organs and spermatozoa in insects (Jamieson et al., 1999) provide a useful tool for the reconstruction of phylogenies in various insect groups, including Diptera (Baccetti 1987; Carcupino et al., 1995; Dallai and Afzelius, 1995; Jamieson et al., 1995, 1999).

The spermatozoa in brachyceran flies are filiform with an apical monolayered acrosome, a compact nucleus, fully crystallized mitochondrial derivatives, and a 9 + 9 + 2 axoneme. Until now, it was believed that all investigated species of brachyceran flies shared a common spermatozoal model (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999), except for a detailed analysis of the intertubular material obtained by technique of computer reconstruction (Dallai and Afzelius, 1999). In this article, we present some differences found in the ultrastructure of spermatozoa of this group. In the family Calliphoridae, only *Calliphora vomitoria* (Dallai and Afzelius, 1990) and *Chrysomya megacephala* (Name et al., 2010) have previously been described.

The aim of this study is to describe and compare the morphology of spermatozoa of *L. cuprina*, *L. eximia*, and *L. peruviana*.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

L. cuprina and *L. eximia* adult specimens were collected in the urban and rural zones of Brasilia, Brazil, to start a colony and begin laboratory analyses. The flies were attracted by fish

carcasses and minced beef and collected with entomological nets and Van Someren-Rydon traps. Spermathecae of females of *L. peruviana* analyzed in this study were obtained in collaboration with Universidad de Antioquia in Medellín (Colombia).

In the laboratory, the flies were fed with milk, sugar, brewer's yeast (1:1:1) mixed into water, and water ad libitum for 1 week, and then they were provided with 100 g minced beef as a medium for egg-laying. Numerous eggs were found on the underside of the meat after 1 day and were placed twenty to a cup in tapered plastic, each containing 20 g of fresh bovine minced meat, until pupariation and complete development (adult stages).

Light Microscopy

The flies were briefly submitted to cold-induced dormancy, and the reproductive system of six males of *L. cuprina* and *L. eximia* (three of each species) was removed in its entirety by dissection of the animal in saline solution of NaCl 0.9%. After dissection, these structures were placed on a slide for examination. Observations and image acquisitions were made using a Zeiss® (SPEMI 2000C) stereomicroscope.

Testes used for transmission electron microscopy (TEM) were also sectioned for light microscopy. Semithin sections (4 µm) were stained with 0.25% toluidine blue, pH 11, observed, and photographed with an Axiophot Zeiss® Microscope equipped with a Zeiss® Axiocam MRc digital camera and Axiovision 4.5 software.

Males of *L. cuprina* and *L. eximia* (10 of each species) were dissected, and their testes were smeared on clean glass microscope slides to release the sperm within them and fixed in a solution of 4% (wt/vol) paraformaldehyde in 0.1 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.2. After drying at room temperature, the preparations were observed in a photomicroscope (Zeiss® Axiocam MRc digital camera and Axiovision 4.5 software) equipped with differential interference and contrast phases.

For measurement of sperm nucleus length (10 glass microscope slide of each species), these preparations were stained for 15 min with 0.2 µg/mL 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) in sodium phosphate buffer, washed, and mounted with a solution of antifade reagent—ProLong Gold. They were then examined by Axiophot Zeiss® and Confocal Leica SP5® microscopes equipped with epifluorescence and with 405 nm excitation filters, respectively.

Transmission Electron Microscopy

The testes of males of *L. cuprina* and *L. eximia* (10 of each species) and spermathecae of five females of *L. peruviana* were fixed for 4 h in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 5 mmol L⁻¹ CaCl₂, and 3% sucrose, buffered in 0.1 mol L⁻¹ sodium cacodylate, at pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in the same buffer, and postfixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, and 5 mmol L⁻¹ CaCl₂ in 0.1 mol L⁻¹ sodium cacodylate buffer. In some cases, the specimens (10 testes) were fixed in a mixture of 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer, at pH 7.2, followed by block-staining in 1% uranyl acetate in distilled water (Afzelius, 1988). The material was dehydrated in an ascending acetone series (30–100%) and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed using a Jeol® 1011 transmission electron microscope operating at 80 kV.

For detection of basic proteins, the ethanolic phosphotungstic acid method (E-PTA), modified from Bloom and Aghajanian (1968), was applied. Testes of six males of each species were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4, for 4 h at 4°C. After washing in phosphate buffer and dehydrating in alcohol, the material was treated "en bloc" with a solution of 2% of PTA in absolute ethanol for 24 h at 4°C, washed in absolute ethanol and embedded in Spurr's resin.

Some ultrathin sections were observed, unstained, and partly stained with uranyl acetate.

RESULTS

The descriptions given by light microscopy and spermiogenesis were observed only in *L. cuprina* and *L. eximia* species. However, the ultrastructure of spermatozoa has been described for the three species studied (*L. cuprina*, *L. eximia*, and *L. peruviana*).

In sexually mature males of the genus *Lucilia*, the spermatozoa are stored in the testes and seminal vesicle. In sexually mature females, these cells are stored in the spermathecae, after copulation.

The male internal mature reproductive system in *L. cuprina* and *L. eximia* is similar and formed by the following organs: two testes with paired deferent ducts and accessory glands, and one seminal vesicle, and ejaculatory duct. Typically, each of the testes opens into the deferent duct which then unites to connect with the seminal vesicle. The accessory glands are directly connected to the seminal vesicle and the ejaculatory duct is located at the end portion of this organ (Fig. 1A).

In light microscopy, the testes show an intense and brilliant reddish-brown color. This organ has a kidney-like appearance (Fig. 1A). In cross section, it is observed that the wall of the organ is formed by two distinct layers: an external layer with pigmented cells and an inner layer of muscle (Fig. 1B). The organization of the germ cells inside the testes shows that this structure is formed by a unique and long follicle with several cysts in different phases of spermatogenesis (Fig. 1B). In TEM, it is possible to observe that the testicle is made up of an external wall, surrounding the germinative cells (Fig. 2A).

The spermatozoa of the examined species are very long, slender, and filiform, measuring ~211 μm in *L. cuprina* and 146 μm in *L. eximia*, in total length, including the head and tail regions (Fig. 1E,F). Staining the sperm nucleus with DAPI reveals the head piece which can otherwise hardly be distinguished from the flagellum. The nucleus in *L. cuprina* and *L. eximia* measures about 19 μm and 17 μm , respectively (Fig. 1C,D).

A polymorphism was observed in *L. cuprina* and *L. eximia*, in relation to the length of spermatozoa, where within the same testis spermatozoa of different sizes were found. Data concerning the length of the head and tail, total length of the sperm, the higher and lower sperm found in each species, the mean, and standard deviation are presented in Table 1.

Spermiogenesis

The differentiation of the spermatids in the two species occurs within the cysts (surrounded by a

somatic cell), and inside these cysts, all spermatids are in the same stage of maturation (Fig. 2B). There are ~256 germ line cells per cyst. It was observed that in some cases, in *L. cuprina*, the cysts are not surrounded by the somatic cell, but the organization of these cells suggests that they have been surrounded at some point of differentiation (Fig. 2B).

The events of spermiogenesis in these species are very similar. The process of differentiation is characterized by acrosome and nebenkern formation, nuclear condensation, cell elongation including flagellum development, and cytoplasmic sloughing. Early spermatids possess a spherical proacrosomal granule (about 200-nm diameter) located between the concave face of the Golgi complex, which participate actively in this formation, and the spermatid nucleus (Fig. 2C). During intermediate stages of spermatid maturation, the developing acrosome is positioned at the anterior of the elongation nucleus, and the acrosomal contents are relatively electron dense (Fig. 2D). With the maturation of the spermatids, the acrosome elongates and in the spermatozoa is found laterally positioned in relation to the nucleus apex (Fig. 4C,D).

In early spermatids, the nucleus has an almost circular appearance with dispersed and granular chromatin and an excess of cytoplasm (Fig. 2C,D). During intermediary stages of differentiation gradual condensation of chromatin was observed, with an increase in its electron density (Fig. 2E). The process of chromatin condensation can occur in two ways: homogeneously across the nucleus and heavily centralized in a particular region (Fig. 2D,E). The elongation of the nucleus of spermatids is accompanied by the fibrous, lamellar, and fully compacted aspect acquired by the chromatin with simultaneous loss of cytoplasm (Fig. 2F–H). Even in the last stage of spermiogenesis, in cross section, the accessory membranes and a row of microtubules encircling the nucleus (Fig. 2H) were observed.

At the beginning of spermatid differentiation, a large number of mitochondria fuse together, forming the "nebenkern" (Fig. 3A), which after a series of transformations (Fig. 3B,C) turns into mitochondrial derivatives. In the course of differentiation of this structure in *L. cuprina*, the nebenkern turns into two mitochondrial derivatives with equal size (Fig. 3E–G). However, in *L. eximia* although the nebenkern gives evidence that it will divide into two (Fig. 3B,C,I), it in fact remains single (Fig. 3J,K). Even during the differentiation process, in both species, the mitochondrial derivatives are gradually filled with a paracrystalline material. The mitochondrial derivatives appear before the "overlap" region, between the nucleus and axoneme.

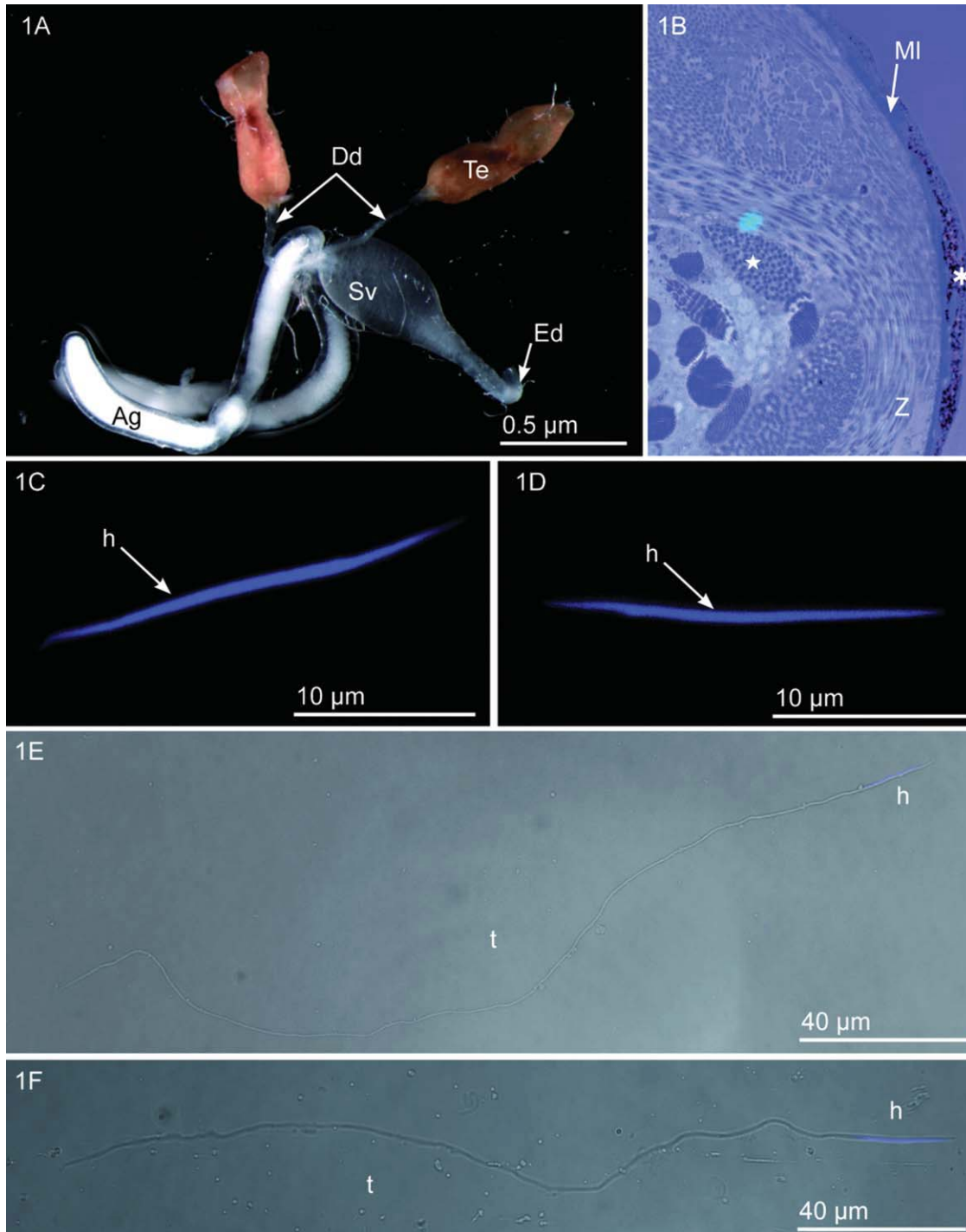


Fig. 1. **A:** Light micrograph of male internal reproductive organs and structure of the testis in *L. eximia*. Male internal reproductive organs: testes (Te), deferent ducts (Dd), seminal vesicle (Sv), accessory glands (Ag), and ejaculatory duct (Ed). **B:** Cross section shows the morphology of testis wall, the internal organization of the cyst and the spermatozoa, in *L. cuprina*. Peritoneal sheath (asterisk), layer of muscles (MI), cyst in distinct stages of differentiation (star), and spermatozoa (Z). **C–F:** Light micrograph of spermatozoa of *L. cuprina* and *L. eximia*. **C,D:** DAPI-stained head region of the two species previously described, respectively. **E,F:** Spermatozoa in total length of *L. cuprina* and *L. eximia*, respectively. Head (h) and tail (t).

The “overlap” region is characterized by a decrease in the diameter of the nucleus, the presence of the complete axoneme, the increase in the

size of the mitochondrial derivatives, and the hallmark of this region, the beginning of the centriolar adjunct. In this region, besides the nucleus, all tail

TABLE 1. Dimensions (mean and standard deviation, SD) of spermatozoa taken from light microscopy

| Species | Head | Tail | Total length |
|-------------------|---|---|--|
| <i>L. cuprina</i> | 19.26 μm ($n = 50$ SD = 2.70) | 191.80 μm ($n = 50$ SD = 24.02) | 211.28 μm (134,29–238,24 μm ; ($n = 50$ SD = 24.04) |
| <i>L. eximia</i> | 17.62 μm ($n = 50$ SD = 1.75) | 129 μm ($n = 50$ SD = 14.23) | 146.62 μm (144,10–224,41 μm ; ($n = 50$ SD = 18.31) |

n , number; range given for total length.

structures are present (axoneme, mitochondrial derivatives, and centriolar adjunct; Fig. 3F). In cross sections, the centriolar adjunct of *L. cuprina*

species is located in the region surrounded by the nucleus, mitochondrial derivatives, and axoneme (Fig. 3F,G). In *L. eximia*, in longitudinal section, it can be observed posterior to the nucleus with a moderate electron density (when compared with the nucleus) and some electron-lucent areas throughout (Fig. 3H). The implantation and development of the axoneme could be observed in a region eccentrically located at the nucleus, where only the central microtubules are visible (Fig. 3D). As the axoneme completes its development, the peripheral and accessory microtubules are observed (Fig. 3E). The large number of microtubules and the accessory membranes, present in the nuclear region, is also observed in the tail region (Fig. 3E,F).

Spermatozoon

In the species studied here, the head of spermatozoa consists of two structures: acrosome and nucleus. The acrosome is conical and thick, monolayered and consists of a moderately electron-dense material. In cross sections, it displays an elliptical substructure (Fig. 4A,B), while in longitudinal sections it fits closely into an indentation on the surface of the nucleus (Fig. 4C,D). In cross sections, the nuclear shape varies from circular to oval, and the chromatin is condensed (Fig. 4E,F). In longitudinal sections, the nucleus is elongated with the acrosome at one pole and the axoneme implantation and the “overlap” region at the other (Fig. 4C,D,G).

When submitted to E-PTA methodology, the concentration of basic proteins in the head region of

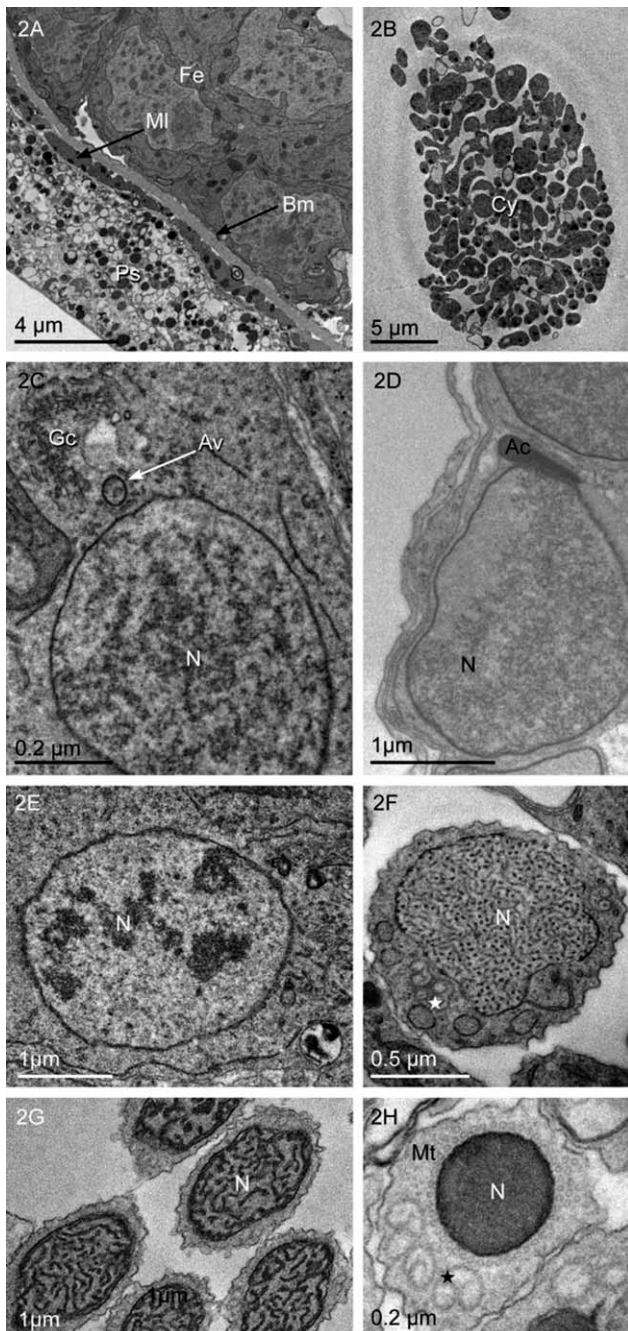


Fig. 2. A–H. TEM of *L. cuprina* and *L. eximia*. A: Cross sections of the testis wall in *L. eximia*. In the strata, forming the testis wall, it is possible to see: an external layer with pigmented grains named peritoneal sheath (Ps); a layer of muscle (MI) delimited by basement membrane (Bm), and follicular epithelium (Fe). B–H: *L. cuprina*. B: Cyst (Cy) showing spermatozoa. Observe the absence of membrane delimitation of cystic cell. C–H: Cross sections through testes, showing early spermatids. C,D: Acrosome (Ac) formation. C: Acrosomal vesicle (Av) is observed near to the Golgi complex (Gc). The chromatin of nucleus (N) appears dispersed. D: The acrosome (Ac) could be seen at the apex of the nucleus (N) in process of elongation. E–H: Chromatin condensation. The first aspect observed is the increase of aggregation of chromatin forming masses in some regions of nucleus (N); followed by the fibrous, lamellar, and highly compacted aspects, respectively. Accessory membranes (star) and microtubules (Mt).

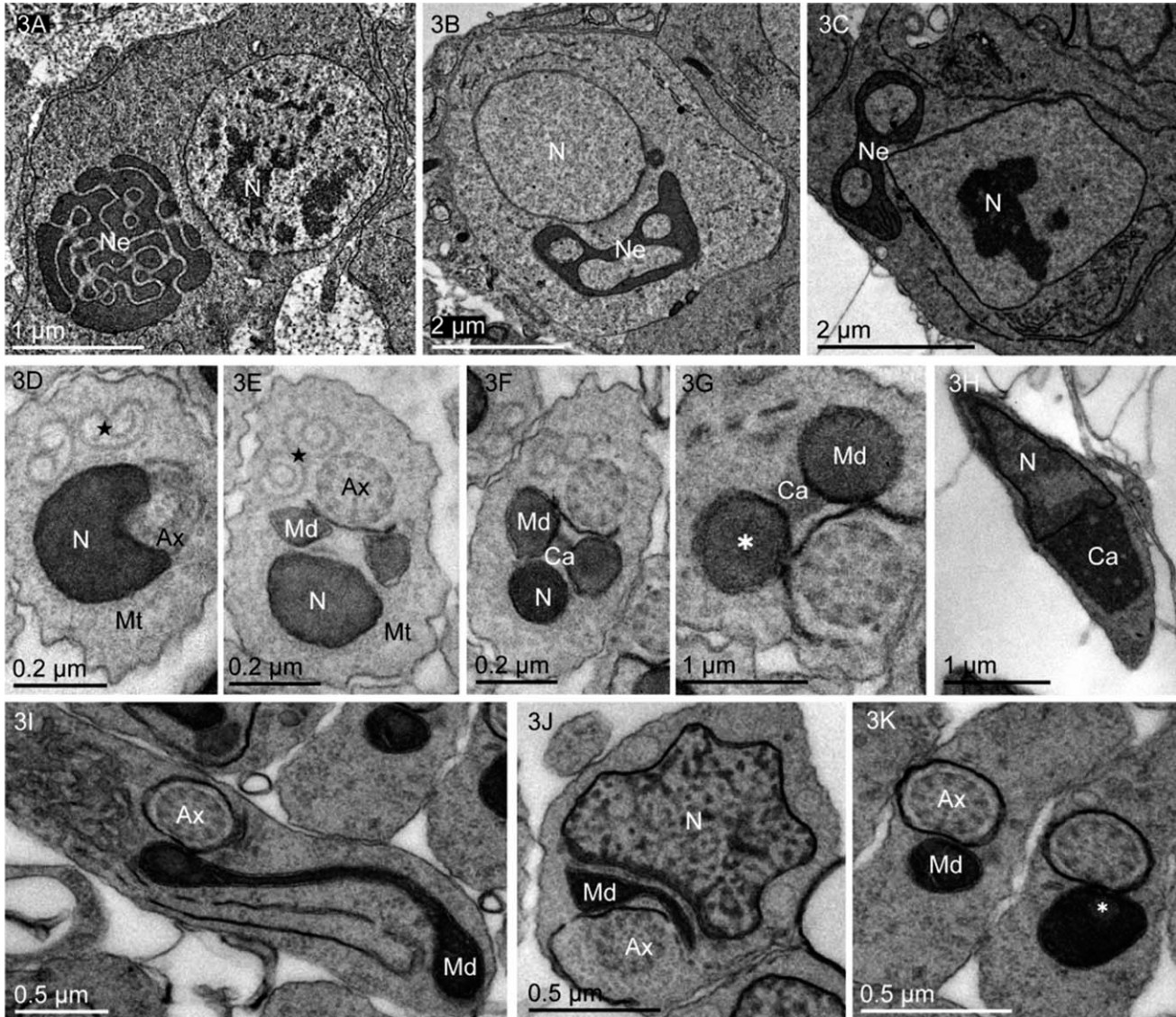


Fig. 3. TEM of early spermatids of *L. cuprina* (A,D-H) and *L. eximia* (B,C,I-K). A-C: In cross section of the tail region the fusion was observed of several mitochondria to form the nebenkern (Ne). D: The implantation of the axoneme (Ax) occurs in the nuclear region. Nucleus (N), accessory membranes (star), and microtubules (Mt). E-G: The nuclear, "overlap" and tail region in spermatid. The accessory membranes (star) and microtubules (Mt) are present in these regions. E: The feature of nuclear region shows the nucleus (N), the axoneme (Ax), and the beginning of two mitochondrial derivatives (Md). F: This is the "overlap" region, marked by the beginning of the centriolar adjunct (Ca). G: The tail region is marked by the disappearance of the nucleus and presence of the flagellar structures. H: In longitudinal section, it is possible to observe the nucleus (N) and the centriolar adjunct (Ca) in their posterior region. I-K: Tail structures. I: The morphologic aspect of the mitochondrial derivative (Md) suggests that it will divide into two, but it remains single. J-K: It is possible to observe only one mitochondrial derivative (Md), located between the nucleus (N) and the axoneme (Ax) and in front of the axoneme (Ax), respectively. The paracrystalline material is observed (asterisk).

L. cuprina and *L. eximia* is observed on the periphery of the nucleus, and also in the nuclear envelope (Fig. 6A,C).

The site of the origin of the axoneme, in cross section, is a small peg-like structure, where a "peg" of cytoplasm is completely surrounded by the nucleus (Fig. 4F). In longitudinal section, this region in the nucleus shows a notched appearance (Fig. 4G). In the subsequent region of the nucleus, it is possible to observe in cross section the com-

plete axoneme (9 + 9 + 2), the beginning of the mitochondrial derivatives of the same size and a large nucleus, in *L. cuprina* (Fig. 5A). In *L. eximia* and *L. peruviana* species, only one mitochondrial derivative is observed in this region (Fig. 5H).

In the "overlap" region in spermatozoa, the nucleus and tail components (axoneme, mitochondrial derivatives, and the centriolar adjunct) can be seen in the same section in all analyzed species (Fig. 5B,C,I,J). The centriolar adjunct is centrally

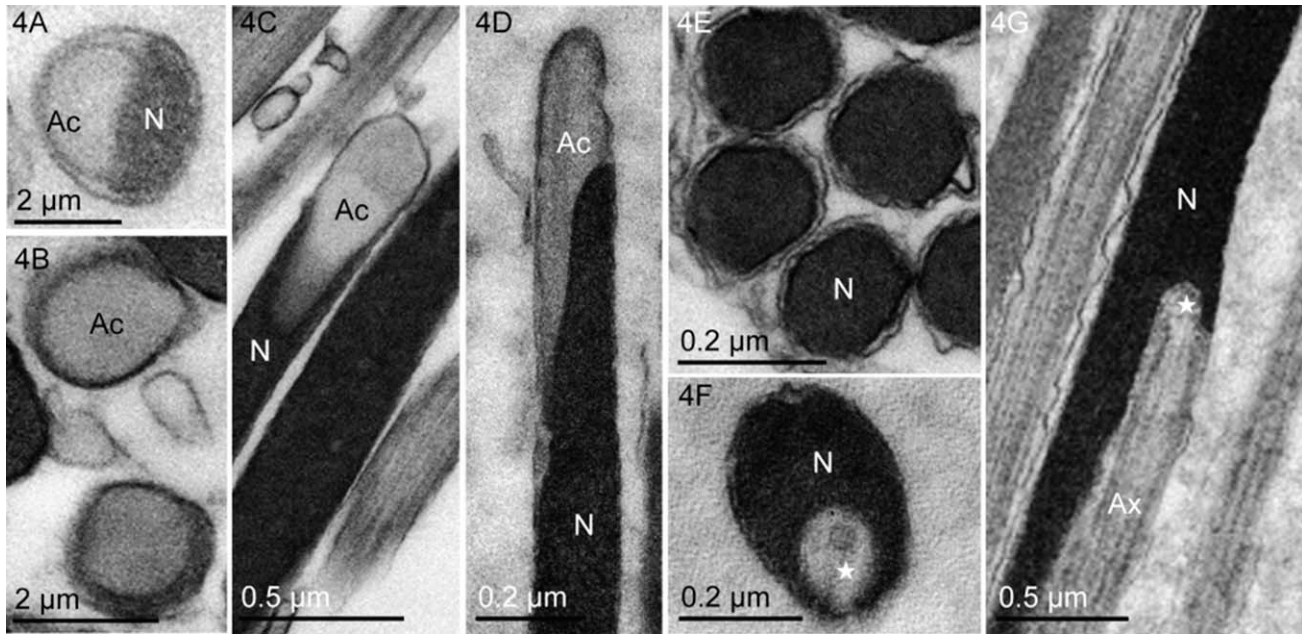


Fig. 4. TEM of head region of spermatozoa of *L. cuprina* (A), *L. eximia* (B,C,E), and *L. peruviana* (D,F,G). The *L. peruviana* material analyzed was obtained from spermathecae. A,B: Cross sections of acrosome (Ac) show the elliptic aspect of this structure. C,D: The acrosome (Ac) has a large volume and is laterally inserted in the nucleus (N). E: The nuclear shape varies from circular to oval and the chromatin appears highly condensed. Nucleus (N). F,G: In cross and longitudinal sections it is possible to observe the region of axoneme implantation (star). In cross section, this region is named “peg” region; in longitudinal section, it shows the notched appearance of the nucleus.

located between the other structures of the “overlap” zone. In longitudinal section, this structure is electron dense with electron-lucent areas, long (Fig. 5G), and in cross section, they have a rectangular or triangular shape (Fig. 5B,C). The centriolar adjunct starts before the posterior region of the nucleus and continues parallel to the axoneme and mitochondrial derivatives. In *L. cuprina* alone, this structure was observed between the mitochondrial derivatives (Fig. 5B,C). In *L. eximia* and *L. peruviana*, this structure can always be seen laterally to the axoneme and nucleus, or axoneme, and mitochondrial derivative (Fig. 5I,J).

In *L. cuprina*, in cross section, the mitochondrial derivatives were observed, positioned side by side near the midline and ventral to the axoneme, and although their diameters are similar (Fig. 5A–D), their lengths are different (Fig. 5E,F). In *L. eximia* and *L. peruviana*, the mitochondrial derivative was observed, laterally or in front of the axoneme (Fig. 5I–K), this feature being very peculiar in the group. In all species, these structures are almost entirely filled by the paracrystalline material (Fig. 5C,J–L).

In all species, the axoneme follows the typical 9 + 9 + 2 configuration microtubules, with nine simple exterior microtubule accessories, nine peripheral doublets, and two central microtubules. Between the microtubule accessories, a prominent intertubular material is observed (Fig. 5M). In the

wall of each accessory microtubule of these species, 13 protofilaments with an electron lucid lumen could be seen (Fig. 5N). In the final portion of the flagellum, the axoneme is the last structure to finish. In this region, microtubules are gradually disorganized. In the genus *Lucilia*, the nine accessories and the two central microtubules finish first, followed by the peripheral doublets (Fig. 5O–Q).

When submitted to E-PTA methodology, the basic proteins in *L. cuprina* tail are present in the following structures: mitochondrial derivatives (region of paracrystalline material), centriolar adjunct, and intertubular material. In *L. eximia* tail structures, the border regions of the centriolar adjunct, the intertubular, and paracrystalline material are positive for the method (Fig. 6B–D).

DISCUSSION

Internal reproductive organs in Diptera are poorly known, with few detailed comparative studies (Sinclair et al., 2007). Morphological aspects of the male internal reproductive organs in the analyzed species of *Lucilia* comprise: testes, deferent ducts, accessory glands, seminal vesicle, and ejaculatory duct, and they are similar to those described for most Diptera (Sinclair et al., 2007).

In most species of Diptera studied, the testis is considered to be a subdivided sac-like organ equivalent to tubular follicles observed in the testes of other insect orders (Williamson, 1989). However,

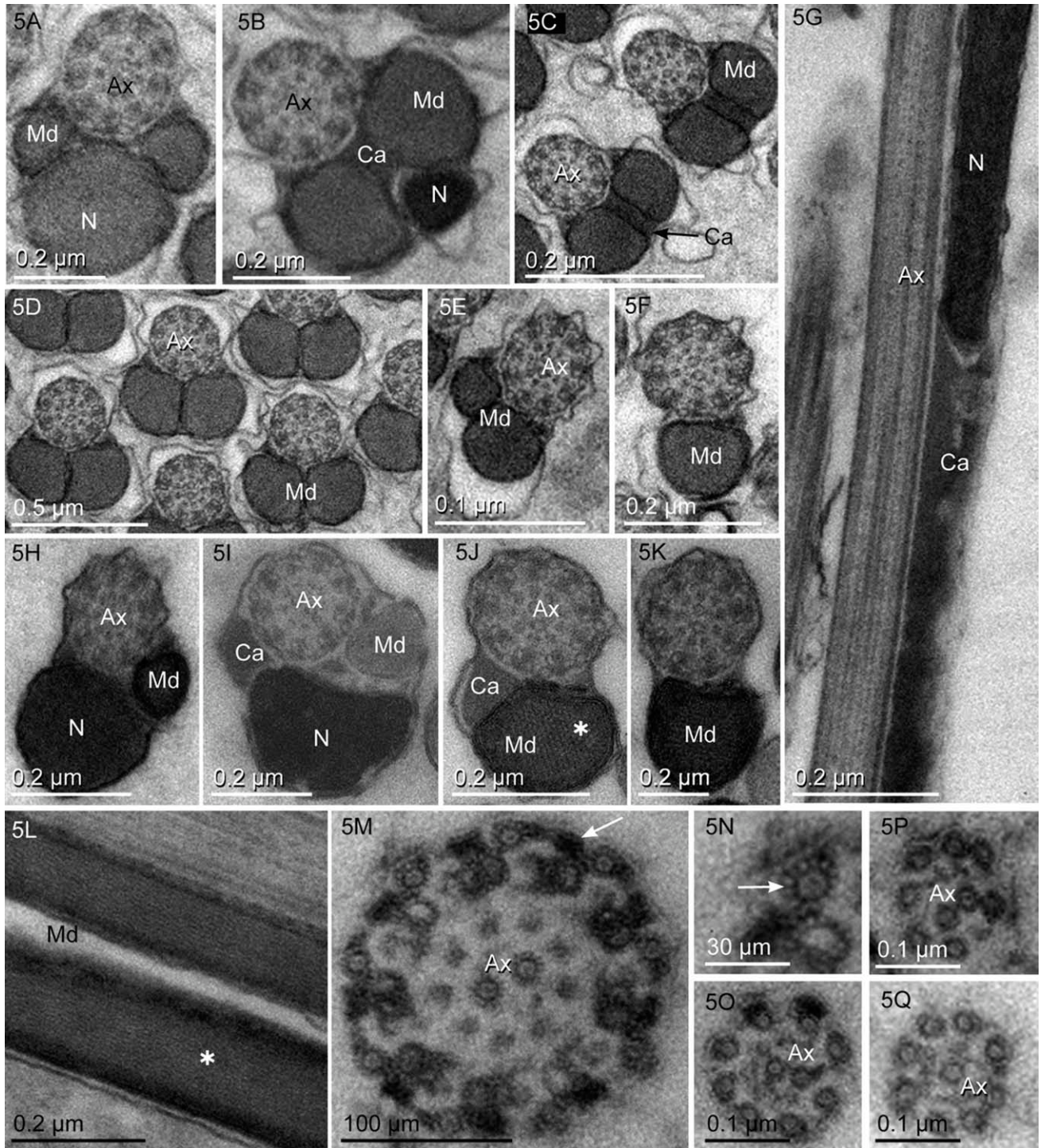


Fig. 5. TEM of the nuclear, “overlap” and tail regions in the three species analyzed. **A–F**: Cross sections of spermatozoa of *L. cuprina*. **A**: Even in the nuclear region, it is possible to observe the complete axoneme (Ax) and the beginning of the symmetric mitochondrial derivatives (Md). **B**: The “overlap” region is marked by the appearance of the centriolar adjunct (Ca). In this region, the nucleus (N) and the tail structures can be observed. Axoneme (Ax) and mitochondrial derivatives (Md). **C–F**: Tail region. **C**: The region of the tail is marked by the end of the nucleus, the increase in the centriolar adjunct (Ca), and presence of the axoneme (Ax), and the mitochondrial derivatives (Md). **D–F**: The next regions are characterized by the disappearance of the centriolar adjunct, reduction in diameter and loss of one mitochondrial derivative (Md). **G**: Longitudinal section of nucleus and tail region in *L. eximia*. In this region, it is possible to observe the nucleus (N), the centriolar adjunct (Ca), and the axoneme (Ax). **H–K**: Cross sections of spermatozoa in *L. eximia* and *L. peruviana*. The material of *L. peruviana* was obtained from spermathecae. **H**: *L. eximia*. Even in the nuclear region, it is possible to observe the complete axoneme (Ax) and the beginning of only one mitochondrial derivative (Md). **I**: The “overlap” region of *L. peruviana*. **J–K**: Tail region in *L. peruviana* and *L. eximia*, respectively. **L–Q**: *L. eximia*. **L**: Longitudinal section of mitochondrial derivative (Md), showing the paracrystalline material (asterisk). **M–Q**: Features of the axoneme. **M**: See the intertubular material (arrow). The axoneme in all analyzed species is made up of nine accessory microtubules, nine doublets, and a central pair. **N–Q**: The accessory microtubules (arrow) possess 13 protofilaments, and in a final portion of flagellum, one can see the gradual disorganization of the axoneme (Ax).

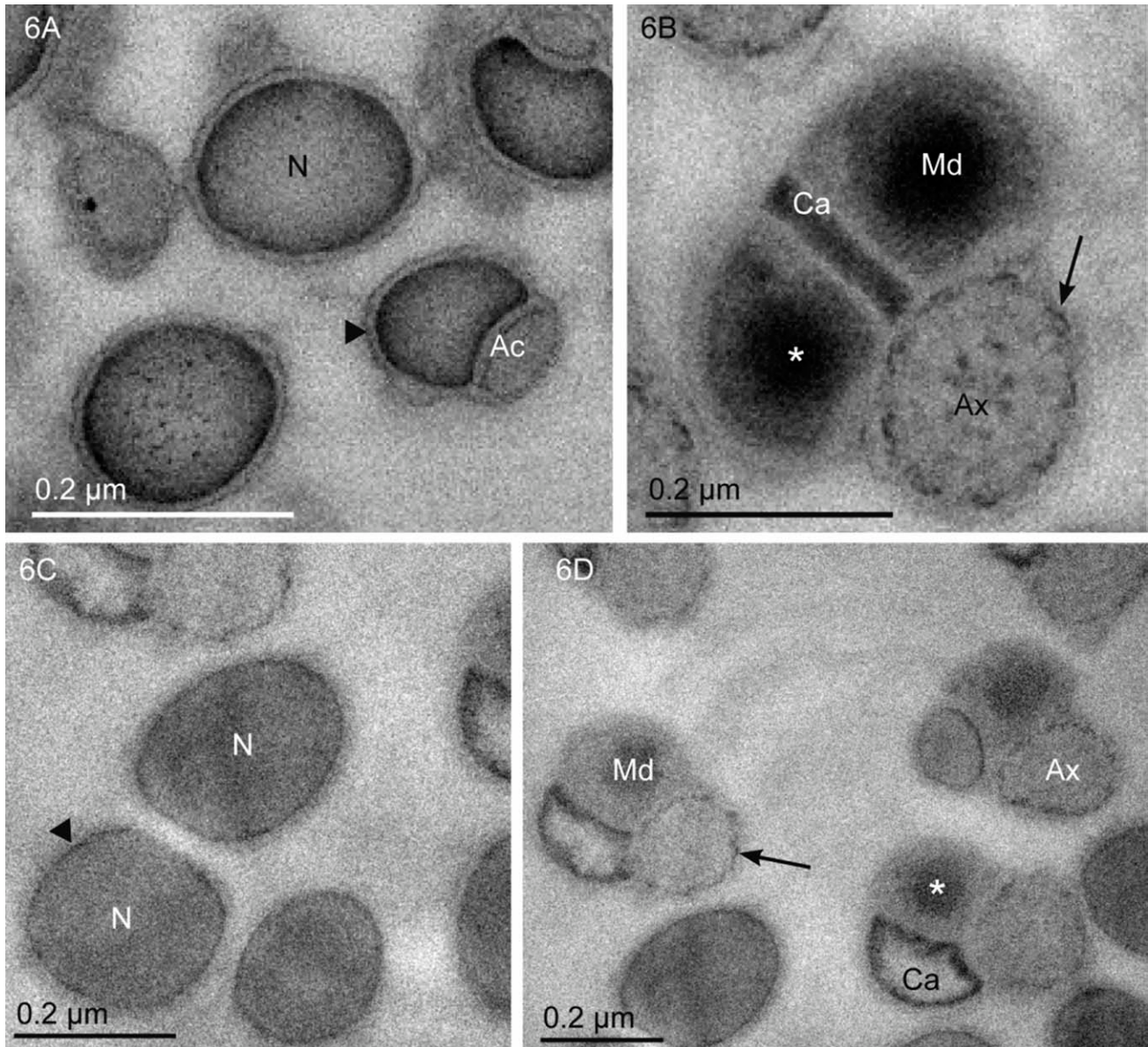


Fig. 6. Cross sections through the testis of *L. cuprina* and *L. eximia*, submitted to E-PTA method. **A,B**: In the former species, the periphery of the nucleus and a nuclear envelope (arrowhead), the intertubular material (arrow), the centriolar adjunct, and paracrystalline material (asterisk) are positive for the method. **C,D**: In the latter species, the periphery of the nucleus and the nuclear envelope (arrowhead) are positive. In the tail structures, the border region of the centriolar adjunct, the intertubular (arrow), and paracrystalline (asterisk) material is positive. Nucleus (N), acrosome (Ac), centriolar (Ca) adjunct, mitochondrial derivatives (Md), and axoneme (Ax).

the number of follicles present in the interior of the testes varies considerably among the various groups. In *C. megacephala* (Name et al., 2010) and in the species studied here, *L. cuprina*, and *L. eximia*, only one follicle was observed per testis.

The aspect observed in the seminal vesicle of the two species of the genus *Lucilia*, a very enlarged and modified region in the initial portion of the ejaculatory duct, is not described for other Calliphoridae. The accessory glands are tubular and very long, and their content has a milky aspect in

L. cuprina and *L. eximia*. In *C. megacephala*, the same aspect is observed, but the accessory glands are shorter (Name et al., 2010). Previous studies in *Drosophila melanogaster* (Wolfner, 1997; Heifetz et al., 2001) have demonstrated that proteins present in the accessory glands induce both egg-laying and oogenic progression in females.

It was observed that in *L. cuprina* and *L. eximia* the spermatozoa derive from primordial germ cells found at the apical end of the testes, and these stem cells go through a synchronous process of

mitosis without cellular division to produce the spermatocytes. This process was also observed in other species such as *C. megacephala*, Calliphoridae (Name et al., 2010), *Drosophila*, Drosophilidae (Tokuyasu et al., 1972a,b), and *Ceratitidis capitata*, Tephritidae (Báo and Dolder, 1991).

In *L. cuprina* and *L. eximia*, the spermatids found in the distal and medial regions in the testes are encapsulated by a somatic cell, forming the cyst, where they complete the differentiation process. In the proximal region of the testes, near to insertion of the seminal vesicle, these cells are free. These aspects of testicular organization were also described in other Calliphoridae (Name et al., 2010), in some Tephritidae (Báo and Dolder, 1991; Valdez, 2001), in Drosophilidae (Tokuyasu et al., 1972a,b), in Sarcophagidae (Warner, 1971), and in a large number of other insect orders (Phillips, 1970). However, it was observed that in *L. cuprina*, the cysts were sometimes not encapsulated by a somatic cell but maintains a cellular organization, similar to that found within them.

In most insects, it was observed that the number of spermatozoa per bundle is variable. Research shows that for Diptera, the number of sperm per bundle varies among species (Oguma et al., 1987; Cruz-Landim, 2001). For Virkki (1969), archaic orders of insects have a greater number of sperm per bundle than recent (derived) orders. The most recent or specialized groups tend to have a smaller number of sperm per bundle.

In *L. cuprina* and *L. eximia*, the number of sperm per cyst varies, but it is common to find a maximum number of 256 cells per cyst. In *C. megacephala* (Name et al., 2010) and *S. bullata* (Warner, 1971), 127 cells were observed per cyst. Therefore, when compared with other groups, this feature is consistent with the current taxonomic and phylogenetic position of these species within Diptera.

The structure of spermatozoa in *L. cuprina* and *L. eximia* is similar to the general description for insect sperm (Phillips, 1970; Baccetti, 1972; Jamieson 1987; Jamieson et al., 1999). In both studied species, the spermatozoa are very long and slender as in the majority of the Diptera and present significant variations in the length, that is, the spermatozoa exhibits polymorphism.

The most common polymorphism in insect spermatozoa is related to the length of the nucleus and flagellum. In *Drosophila*, it is common to find males producing spermatozoa of various sizes (Jamieson et al., 1999). The total sperm length can vary according to strains or species examined, from 0.3 mm in *D. pseudoobscura* (Bairati and Perotti, 1970) to 58 mm in *D. bifurca* (Pitnick et al., 1995).

The polymorphism in *L. cuprina* and *L. eximia* can be divided in two types (Fig. 7): when analyzed in light microscopy, we observed that the sperma-

tozoa exhibits variations in the length of head and tail, the most common type of polymorphism described in insects. However, when analyzed using TEM, we observed differences in the ultrastructural morphology of spermatozoa (mitochondrial derivatives) in three analyzed species of genus *Lucilia* (Fig. 7). The polymorphism here mentioned is not observed in other Calliphoridae (Dallai and Afzelius, 1990; Name et al., 2010).

Spermiogenesis in *L. cuprina* and *L. eximia* is similar to that described in other dipterans and does not differ markedly from what happens in other insect orders (Phillips, 1970; Ndiaye et al., 1996; Jamieson et al., 1999; Dallai et al., 2004; Name et al., 2010). In early spermatids of *L. cuprina* and *L. eximia*, the Golgi complex lies in close proximity to a proacrosomal granule, suggesting that it is involved in the formation of the acrosome. The role of the Golgi complex in the formation of the proacrosomal granule and its differentiation in an acrosome has been reported into various species of Diptera (Dallai et al., 1984; Báo et al., 1989; Ndiaye and Mattei, 1992). In the three species studied here, the monolayer condition observed in the acrosome is apparently shared by all brachyceran spermatozoa already examined. However, the bulky appearance of acrosome is found in genus *Lucilia* and described for Calliphoridae for the first time.

The maturation of the nucleus characterized by elongation and a reduction in diameter with a simultaneous condensation of chromatin was observed in some Diptera (Schrankel and Schwalm, 1974; Curtis et al., 1989; Name et al., 2010) and other insect orders (Phillips, 1970; Jamieson et al., 1999; Dallai et al., 2004).

In *L. cuprina* and *L. eximia*, the condensation of chromatin can occur in two ways: heavily centralized in a particular region and even homogeneously across the nucleus. In the early stages of spermiogenesis, the chromatin has a granular appearance and in subsequent stages is observed the following aspects: fibers, lamellae, and fully compacted.

In the spermatozoa of the three species studies, the nuclear chromatin is highly condensed as in *C. megacephala* (Name et al., 2010) and in other Brachycera (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999). When treated with E-PTA, the nucleus in *L. cuprina* and *L. eximia* showed positive reaction only on the periphery of the nucleus and in the nuclear envelope. The two accessory membranes observed near to the nucleus in *L. cuprina* and *L. eximia* also appear in spermatids of *Coelopa frigida*, Coelopidae (Schrankel and Schwalm, 1974) and named "scroll-like structure." These structures can be observed parallel to the nuclear envelope, extending along to the nucleus. With increased condensation of the nucleus, the accessory membranes tend to disappear.

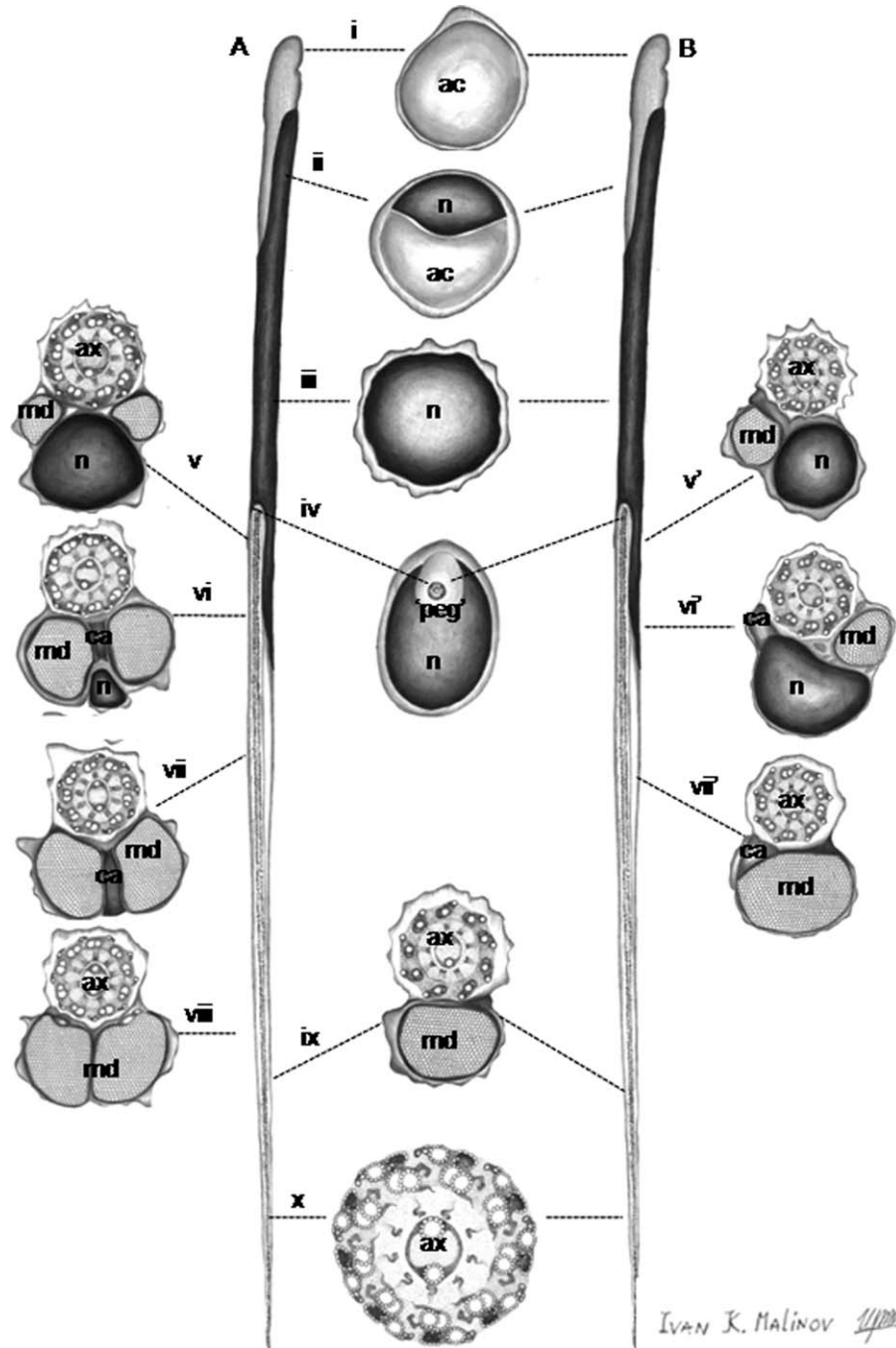


Fig. 7. Schematic representation of spermatozoa of (A) *L. cuprina*, (B) *L. eximia*, and *L. peruviana*, corresponding to the longitudinal and cross sections. (i) acrosome; (ii) acrosome and nucleus; (iii) nucleus; (iv) "peg" region; (v,v') beginning of mitochondrial derivative; (vi,vi') region of "overlap"; (vii,vii') beginning the flagellar region; (viii) ending of the centriolar adjunct; (ix,x) end-piece of flagellum. Acrosome (ac), axoneme (ax), centriolar adjunct (ca), mitochondrial derivative (md), and nucleus (n).

The posterior region of the nucleus in studied species has a peculiar feature, observed in longitudinal and cross sections, which is the beginning of the axoneme, following the other tail structures. A notched appearance of the nucleus in longitudinal section was observed, and a "peg-like" structure was observed in the cross section. Just below the

region of the implantation of the axoneme in the nucleus, the complete axoneme appears.

In *L. cuprina* and *L. eximia*, structures that make up the "overlap" region (axoneme, mitochondrial derivatives, and centriolar adjunct) can be observed both in spermiogenesis and in mature sperm. In *L. peruviana*, this region was observed

in mature sperm but is similar to the other species. Detailed descriptions of this region can be found for *M. scalaris* and *C. megacephala* (Curtis et al., 1989; Name et al., 2010).

The tail region is marked by the complete disappearance of the nucleus and the increase in size of the centriolar adjunct. It is believed that the role of this structure in most of the insects is as a support organelle stabilizing the insertion of the axoneme at the nuclear base and anchoring the mitochondrial derivatives on each side of the axoneme (Jamieson, 1987; Jamieson et al., 1999). The centriolar adjunct in three studied species is relatively long and presents a moderate electron density with some electron-lucent areas, a pattern also observed in other species of Brachycera (Warner, 1971; Name et al., 2010). In the spermatozoa of the three studied species, the centriolar adjunct was observed in the "overlap" region (in cross section). In *L. cuprina*, this structure is observed surrounded by the nucleus and tail structures (mitochondrial derivatives and axoneme), while in *L. eximia* and *L. peruviana*, it is observed laterally located between the axoneme and the nucleus and in front of the mitochondrial derivative. The early stage of formation of the tail is associated with the accumulation of a group of mitochondria that fuse to form the "nebenkern," and posteriorly, this structure divides to form two mitochondrial derivatives (Phillips, 1970; Warner, 1971) which are filled with a protein that presents a three-dimensional paracrystalline organization, crystallomitin (Baccetti et al., 1977).

In *L. cuprina*, the pattern observed is the same as that found in *C. megacephala* (Name et al., 2010), while in *L. eximia* and *L. peruviana*, the profile found is described for the first time in Calliphoridae. In the last two species, even during spermiogenesis, the mitochondria fuse, the "nebenkern" is formed, but it is not divided, and only one mitochondrial derivative is formed. In all species here described, the derivative is completely filled with paracrystalline material.

According to Dallai et al. (1993), the sperm structures of the axoneme in Brachycera are relatively uniform, whereas in suborder Nematocera, there is a considerable diversity, which is greater than that in any other insect order. As expected and found for most Brachycera studied (Dallai et al., 1993; Jamieson et al., 1999; Name et al., 2010), the axoneme in the three species examined have 9 + 9 + 2 microtubules arranged parallel to each other, and in fact, the profile is similar to that described for most other insects (Dallai and Afzelius, 1990). The intertubular material in all analyzed species of genus *Lucilia* is prominent and found between the microtubule accessories. This pattern was observed in *C. megacephala* (Name et al., 2010) and in other species of Brachycera (Dallai et al., 1993; Dallai and Afzelius, 1999). The

end piece of flagellum in the genus *Lucilia* is characterized by a progressively reduced number of microtubular elements with the nine accessories finishing first, followed by the two central microtubules and with the peripheral doublets being the last ones terminate. In *C. megacephala* (Name et al., 2010), it was observed that the nine doublets finish first, followed by the two central microtubules and finally, by the accessory ones.

The disorderly aspect of the axoneme has been taken into consideration in a few studies of Diptera spermatozoa, whereas in other groups, this parameter has been used as an important tool, to be highly conserved it probably indicates a phylogenetic relationship (Zama et al., 2001, 2005).

In the tail region of *Lucilia* spermatozoon, the ethanolic-phosphotungstic method permitted the identification of the basic proteins in different regions of the axoneme, similar to the observed in *C. megacephala* (Name et al., 2010) and in *Culex quinquefasciatus*, Culicidae (Báo et al., 1992).

On the basis of the characteristics shown in his work, the morphology of spermatozoa of the three *Lucilia* species is, for the most part, similar to the majority of the Brachycera (Jamieson et al., 1999). However, some distinct differences were found: 1) the enlarged and modified region of the ejaculatory duct forming the seminal vesicle observed in *L. cuprina* and *L. eximia*; 2) the polymorphism of sperm length in *L. cuprina* and *L. eximia*; 3) the polymorphism of ultrastructure of spermatozoa in genus *Lucilia*, with the presence of only one mitochondrial derivative in *L. eximia* and *L. peruviana*; 4) the bulky region of the acrosome in all studied species; and 5) the differences observed in the sperm structure such as the presence or absence of basic proteins structure (E-PTA method). Thus, these characteristics are consistent data that illustrate the structural diversity of the dipteran reproductive tract and spermatozoa, which might provide a character system that can be used in association with other tools to resolve various uncertainties about the evolutionary relationships of this insect group.

LITERATURE CITED

- Afzelius BA. 1988. Microtubules in the spermatids of stick insects. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 98:94–102.
- Baccetti B. 1972. Insect sperm cell. *Adv Insect Physiol* 9:315–397.
- Baccetti B. 1987. Spermatozoa and phylogeny in orthopteroïd insects. In: Baccetti B, editor. *Evolutionary Biology of Orthopteroïd Insects*. Chichester, UK: Ellis Harwood. 612 p.
- Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosatti F, Afzelius BA. 1977. Protein of insect sperm mitochondrial crystals: Crystallomitin. *J Cell Biol* 73:594–600.
- Bairati A, Perotti ME. 1970. Some comparative considerations on the ultrastructure of *Drosophila melanogaster* spermatozoon. In: Baccetti B, editor. *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press. 573 p.

- Báo,SN, Dolder H. 1991. Testicular organization in adult *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): RA mutant and wild-type lineages. *Rev Bras Biol* 51:313–319.
- Bao SN, Quargio-Grassiotto I, Dolder H. 1989. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Cytobios* 58:93–100.
- Báo SN, Lins U, Farina M, De Souza W. 1992. Mitochondrial derivatives of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon. Some new aspects evidenced by cytochemistry and image processing. *J Struct Biol* 109:46–51.
- Bloom FE, Aghajanian GK. 1968. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res* 22:361–375.
- Carcupino M, Profili G, Kathirithamby J, Mazzini M. 1995. Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mem Mus Natn Hist Nat* 166:291–296.
- Carvalho CJB, De Mello-Patiu CA. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 52:390–406.
- Cruz-Landim C. 2001. Organization of the cyst in bee (Hymenoptera: Apidae) testis: Number of spermatozoa per cyst. *Iheringia Ser Zool* 91:183–189.
- Curtis SK, Benner DB, Musil G. 1989. Ultrastructure of the spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorhapha: Phoridae: Phoridae). *J Morphol* 200:47–61.
- Dallai R, Afzelius BA. 1990. Microtubular diversity in insect spermatozoa: Results obtained with a new fixative. *J Struct Biol* 103:164–179.
- Dallai R, Afzelius BA. 1995. Phylogenetic significance of axonemal ultrastructure: Examples from Diptera and Trichoptera. In: Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L, editors. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*. Paris: Mem Mus Natn Hist Nat 166:301–310.
- Dallai R, Afzelius BA. 1999. Accessory microtubules in insect spermatozoa: Structure, function and phylogenetic significance. In: Gagnon C, editor. *The Male Gamete*. From Basic Sciences to Clinical Applications. Australia: Cache River Press. 516 p.
- Dallai R, Baccetti B, Mazzini M, Sabatinelli G. 1984. The spermatozoon of three species of *Phlebotomus* (Phlebotominae) and the acrosomal evolution in nematoceran dipterans. *Int J Insect Morphol Embryol* 13:1–10.
- Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S, Afzelius BA. 1993. The dipteran sperm tail: Ultrastructural characteristics and phylogenetic considerations. *Zool Scripta* 22:193–202.
- Dallai R, Carapelli A, Nardi F, Fanciulli PP, Lupetti P, Afzelius BA, Frati F. 2004. Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletidae: Zygentoma: Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in Zygentoma. *Tissue Cell* 36:233–244.
- Gomes L, Von Zuben CJ. 2004. Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. *Iheringia Sér Zool* 94:135–138.
- Heifetz I, Tram U, Wolfner, F. 2001. Male contributions to egg production: The role of accessory gland products and sperm in *Drosophila melanogaster*. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci* 268:175–180.
- Jamieson BGM. 1987. *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa*. Cambridge: Cambridge University Press. 530 p.
- Jamieson BGM, Ausio J, Justine JL. 1995. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Mem Mus Natn Hist Nat 166:565.
- Jamieson BGM, Dallai R, Afzelius BA. 1999. *Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny*. Enfield, NH: Science Publishers, Inc. 555 p.
- Kutty SN, Pape T, Wiegmann WM, Meyer R. 2010. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on de superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpines's fly. *Syst Entomol* 35:614–635.
- Moura MO, Carvalho CJB, Monteiro-Filho ELA. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:269–274.
- Name KPO, Pujol-Luz JR, Báo SN. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* 41:853–860.
- Ndiaye M, Mattei X. 1992. Particularity of acrosome formation during spermiogenesis in two mosquitoes: *Toxorhynchites brevipalpis* and *Anopheles gambiae*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 24:269–272.
- Ndiaye M, Mattei X, Thiaw OT. 1996. Spermatogenesis in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:375–384.
- Oguma Y, Kurokawa H, Kusama T. 1987. Number of primary spermatocytes in the *Drosophilla immigrans* (Sturtevant) group (Diptera: Drosophilidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 16:85–89.
- Pape T, Wolff M, Amat EC. 2004. Los califóridos, éstridos, rinfóridos y sarcófágidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* 5:201–208.
- Phillips DM. 1970. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. *J Cell Biol* 44:243–277.
- Pitnick S, Spicer GS, Markow TA. 1995. How long is a giant sperm? *Nature* 375:109.
- Rognes K. 1997. The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics* 13:27–68.
- Schränkel KR, Schwalm FE. 1974. Structures associated with the nucleus during chromatin condensation in *Coelopa frigida* (Diptera) spermiogenesis. *Cell Tissue Res* 153:44–53.
- Sinclair BJ, Borkent A, Wood DM. 2007. The male genital tract and aedeagal components of the Diptera with a discussion of their phylogenetic significance. *Zool J Linnean Soc* 150:711–742.
- Smith KGV. 1986. *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History). Ithaca, NY: London and Cornell University Press. 205 p.
- Stevens J, Wall R. 1996. Species, sub-species and hybrid populations of the blow-flies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Proc Roy Soc Lond* 263B:1335–1341.
- Tokuyasu KT, Peacock WJ, Hardy RW. 1972a. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124:479–506.
- Tokuyasu KT, Peacock WJ, Hardy RW. 1972b. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Coiling process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 127:492–525.
- Valdez JM. 2001. Ultrastructure of the testis of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Morphol Histol Fine Struct* 94:251–256.
- Virkki N. 1969. Sperm bundles and phylogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 101:13–27.
- Warner FD. 1971. Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrastruct Res* 35:210–232.
- Williamson DL. 1989. Oogenesis and spermatogenesis. In: Robinson AS, Hopper G, editors. *World Crop Pests, Vol. 3A: Fruit Flies*. Amsterdam: Elsevier.
- Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque P. 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. *Forensic Sci Int* 120:53–59.
- Wolfner, MF. 1997. Tokens of love: Functions and regulations of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem Mol Biol* 3:179–192.
- Zama U, Lino-Neto J, Dolder H. 2001. Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia* (Plebeia) *droyana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). *J Hym Res* 10:261–270.
- Zama U, Brito P, Lino-Neto J, Campos LAO, Dolder H, Báo SN. 2005. Sperm morphology of mud dauber *Sceliphron fistularium* Dahlbom (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae), as an indication of bees relation. *J Submicrosc Cytol Pathol* 37:313–321.

Anexo II



Morphological and cytochemical aspects of spermatozoa in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae)

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Microscopy Research and Technique</i> |
| Manuscript ID: | MRT-11-257 |
| Wiley - Manuscript type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | 22-Dec-2011 |
| Complete List of Authors: | Name, Khesller; UnB, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas Barros-Cordeiro, Karine; Universidade de Brasília, Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas Gama Filho, Jose; Centro Veterinário Asa Sul, Wolff, Marta; Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales Pujol-Luz, Jose; Universidade de Brasília, Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas Báo, Sonia N; Universidade de Brasília, Instituto de Biologia |
| Keywords: | Entomology, Germ Cells, Insect Sperm, Microscopy, Screwworm fly |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

Morphological and cytochemical aspects of spermatozoa in the genus***Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae)**

Name, KPO^{a,b}, Barros-Cordeiro, KB^b, Gama Filho, JB^c, Wolff, M^d, Pujol-Luz, JR^e, & Bão, SN^{b*}

^a Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^b Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

^c Centro Veterinário Asa Sul. Brasília, DF, Brazil.

^d Grupo de Entomología, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia.

^e Laboratório de Dipterologia e Entomologia Forense, Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

Short Title: Sperm Morphology of *Cochliomyia* genus

Key words: Entomology, Germ Cells, Insect Sperm, Microscopy, Screwworm fly.

Total Number of Pages: 25 (Text: 21, Table: 1, Figures: 3)

* Correspondence to: Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, CEP: 70919-970. Brazil. Tel.: +55 61 3107 2905 Fax: +55 61 3107 2904. *E-mail addresses:* knrna@ig.com.br (Name, KPO) and snbao@unb.br (Bão, SN).

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize, structurally and ultrastructurally, the spermatozoa of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Co. macellaria*. In order to visualize the ultrastructure of microtubules and identify basic proteins, techniques such as the tannic acid fixative and cytochemical method of ethanolic phosphotungstic acid (EPTA) were used. With the tannic acid fixative it was possible to observe a significant number of microtubules in the cell cytoplasm during spermiogenesis. Microtubules were observed in all regions of spermatozoa (head, “overlap” zone and tail). Nuclear chromatin possesses the electron lucent aspect in the two species here described. The EPTA technique highlighted the presence of basic proteins on the border of the nucleus and nuclear envelope in the two species analyzed, and, in the centriolar adjunct and on the border of mitochondrial derivatives in *Co. macellaria*. The axoneme is of a conventional insect type with a 9+9+2 microtubular arrangement and the spermatozoa of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* are similar to those described for other Brachycera. The spermatozoa are long and thin in these two species, about 190 μm in length, of which the head region measures approximately 26 μm in *Co. hominivorax* and 29 μm in *Co. macellaria*. A polymorphism was observed in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*. These features are consistent with the structural diversity of the dipteran spermatozoa, comprising an essential tool for understanding the complex variations found in the Diptera family.

INTRODUCTION

The subsection Calyptratae has approximately 18,000 described species, and this taxon is one of the largest and most diverse of Diptera [1]. Around the world more than 1,000 species of Calliphoridae (blow-flies) are currently known, grouped in 150 genera and 12 subfamilies [2]. In the Neotropical region there are 130 described species [3-4].

According to Kutty *et al.* [1] Calliphoridae present great ecological diversity and have a wide variety of life history strategies used by both adults and larvae. These strategies include decomposition from organic matter, parasitism and predation on vertebrates and invertebrates, causing medical problems and important losses in the livestock industry, and phytophagy in a great variety of plants.

The genus *Cochliomyia* Townsend (Diptera: Calliphoridae) is represented by endemic species in the New World and four species have been described: *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), *Co. aldrich* Del Ponte, *Co. minima* Shannon and *Co. macellaria* (Fabricius). Only the first and the last of these species can be found in Brazil [5].

Co. hominivorax, the primary screwworm fly, is considered one of the most important insect pests of livestock in the Neotropical region, whereas *Co. macellaria*, which can act as a secondary invader of wounds, is considered an agent of medical and sanitary importance, and has been reported to be a mechanical vector of human and animal diseases. These two species share morphological similarities and both may occur in the same myiasis, but at different developmental stages [6].

1
2
3 Currently, studies have demonstrated that the morphology of spermatozoa in
4 insects provides a useful tool for the reconstruction of phylogenies in various insect
5 groups, including Diptera [7- 11].
6
7
8
9

10 The objective of this study was to characterize, structurally and
11 ultrastructurally, the spermatozoa of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*, using
12 cytochemical techniques. Most studies emphasize the morphological characterization
13 of spermatozoa in Diptera brachycerans, but a few of them associate morphology
14 with chemical composition.
15
16
17
18
19
20
21

22 The present study focuses on finding the location of basic protein through the
23 use of the E-PTA cytochemistry method and observation of the distribution of
24 microtubules using a glutaraldehyde-tannic acid mixture, both applied to
25 ultrastructure. Understanding the location of these components in the sperm cell may
26 facilitate the identification of the probable functions of these constituents.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Twenty larvae of each species (3rd instar) of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* were obtained from myiasis of different breeds of domestic dogs, at Centro Veterinario Asa Sul, Brasília-DF. Thirty wild male adults of each species and thirty wild female adults of *Co. macellaria* were collected in the rural zone of Brasilia, Brazil.

The immature instars of the two species were maintained in vermiculite for pupariation until their complete development and the emergence of adult specimens. The adult specimens of *Co. macellaria* were used to start a colony, after which laboratory analysis began. The adult specimens of *Co. hominivorax* were used to start laboratory analysis. The wild flies were attracted by fish carcasses and minced beef, and collected with entomological nets and Van Someren-Rydon traps.

In the laboratory, the *Co. macellaria* flies were fed with milk, sugar, brewer's yeast (1:1:1) mixed into water, and water *ad libitum* for 1 week, and then they were provided with 100 g minced beef as a medium for egg-laying. Numerous eggs were found on the underside of the meat after 1 day and were placed twenty to a cup in tapered plastic, each containing 20 g of fresh bovine minced meat, until pupariation and complete development (adult stages).

Light Microscopy

Males were dissected and their testes were smeared on clean glass microscope slides to release the sperm within them, and fixed in a solution of 4% (wt/vol) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2. After this, the glass microscope slides with the sperm cells were dried at room temperature.

1
2
3 For measurement of total length of spermatozoa and nucleus region, these
4 preparations were stained for 15 min with 0.2 µg/ml 4, 6-diamino-2-phenylindole
5 (DAPI) in PBS, washed and mounted with a solution of anti-fade reagent – ProLong
6 Gold. They were then examined by Axiophot Zeiss® and Confocal Leica SP5®
7 microscopes equipped with epifluorescence and with 405 nm excitation filters,
8 respectively.
9
10
11
12
13
14
15
16

17 **Transmission Electron Microscopy**

18
19
20 Testes were fixed in a mixture of 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid in 0.1 M
21 phosphate buffer, at pH 7.2, followed by block-staining in 1% uranyl acetate in
22 distilled water [12]. The material was dehydrated in an ascending acetone series
23 (30%-100%) and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were examined
24 unstained, using a Jeol® 1011 transmission electron microscope operating at 80 kV.
25
26
27
28
29
30
31

32 For detection of basic proteins, the ethanolic phosphotungstic acid method (E-
33 PTA), modified from Bloom and Aghajanian [13], was applied. Testes were fixed with
34 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 4 h at 4 °C. After
35 washing in phosphate buffer and dehydrating in alcohol, the material was treated “en
36 bloc” with a solution of 2% of PTA in absolute ethanol for 24 h at 4 °C, washed in
37 absolute ethanol and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were observed
38 unstained.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Light Microscopy (LM)

The spermatozoa of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* are very long, slender and filiform, measuring approximately 190 μm in total length, including the head and tail regions, in the two species analyzed (Figs. 1A-B). Staining the sperm nucleus with DAPI reveals the head piece, which can otherwise hardly be distinguished from the flagellum. The nucleus in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* is long, measuring about 26 μm and 29 μm , respectively, when stained for DAPI and examined with epifluorescence microscopy (Figs. 1C-D).

A polymorphism was observed in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*, in relation to the length of spermatozoa, where within the same testis spermatozoa of different sizes were found. However, the results show that in *Co. hominivorax*, the variation in length of the sperm is great, with long and short sperm being produced and found within the same testis. Data concerning the length of the head and tail, total length of the sperm, the longest and shortest sperm found in each species, the mean and standard deviation are presented in Table 1.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The events of spermiogenesis in these two species are similar. The process of differentiation is characterized by acrosome and nebenkern formation, nuclear condensation, cell elongation including flagellum development and cytoplasmic sloughing.

1
2
3 Ultrastructural analysis of the spermatozoa in the two examined species has
4 demonstrated that these cells are formed by acrosomal, nuclear, “overlap” and
5 flagellar regions.
6
7
8

9
10 The technique of fixation using tannic acid allowed us to observe, in cross
11 section, a large number of microtubules distributed in all regions of the
12 spermatozoon, during the last stage of spermiogenesis (Figs. 2A-F).
13
14
15
16

17
18 In cross-sections the nuclear shape varies from circular to oval and the
19 chromatin is electron lucent when compared with the other structures of the cell. The
20 nucleus is completely encircling for microtubules and the accessory membranes are
21 present in this region (Figs. 2A-B). The beginning of implantation (Fig. 2B) and
22 complete development (Figs. 2C-D) of the axoneme could be observed in a region
23 eccentrically located at the nucleus, where the central (Fig. 2C), peripheral and
24 accessory microtubules of the axoneme are clearly visible (Figs. 2D).
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 In the of “overlap” region the diameter of the nucleus is seen to decrease and
35 the complete axoneme is visible; an increase in the size of the mitochondrial
36 derivatives, and the hallmark of this region, the emergence of the centriolar adjunct,
37 are observable. The “overlap” region is characterized by the presence of the nucleus
38 and all structures of the flagellum (axoneme, mitochondrial derivatives and centriolar
39 adjunct) (Fig. 2E). The results observed with the fixation with tannic acid in the
40 “overlap” region were: the nucleus appears electron lucent and, the microtubules of
41 the axoneme, the centriolar adjunct and the paracrystalline material of the
42 mitochondrial derivatives are electron dense. The microtubules in the cytoplasm were
43 observed with detail and are concentrated on the opposite side of the accessory
44 membranes (Figs. 2E).
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In a cross-section of the “overlap” region, the centriolar adjunct of *Co.*
4 *hominivorax* and *Co. macellaria* species is located in the region surrounded by the
5 nucleus, mitochondrial derivatives and axoneme (Figs. 2E), while in the tail region it
6 appears between the mitochondrial derivatives, in front of the axoneme (Fig. 2F). This
7 structure is electron dense when compared with the nucleus (Figs. 2E-F). The
8 centriolar adjunct is interpreted as being a support organelle, centrally located
9 between the other structures of the “overlap” zone.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 In the two species studied, the axoneme possesses a typical 9+9+2
20 arrangement with the central pair of microtubules and nine peripheral doubles and
21 nine accessory microtubules (Figs. 2D-F).
22
23
24
25
26

27 When submitted to E-PTA methodology, the concentration of basic proteins in
28 the head region of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* is observed on the periphery
29 of the nucleus, and also in the nuclear envelope (Figs. 3A-B). However, on the
30 periphery of the nucleus of *Co. hominivorax* the concentration of basic proteins is
31 greater (Fig. 3A).
32
33
34
35
36
37

38 The tail structures in *Co. hominivorax* are not positive for basic proteins (Fig.
39 3C). However, in *Co. macellaria* the border of mitochondrial derivatives and the
40 centriolar adjunct is positive for the method (Figs. 3D-F). The absence of basic
41 proteins in the paracrystalline material of the mitochondrial derivatives can be
42 observed and confirmed in longitudinal section (Fig. 3E).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

The structure of spermatozoa in *Cochliomyia hominivorax* and *Co. macellaria* is similar to the general description for insect sperm [11, 14-16]. In both studied species, the spermatozoa are very long and slender as in the majority of the Diptera. In these species, it was observed that the sperm presents significant variations in length. This variation occurs in the head and tail regions and also in the total length of the sperm, featuring a polymorphism.

Polymorphism is an example of diversification of sperm morphology, in which two or more distinct spermatozoa types are found in the mature sperm. Polymorphic sperm can include differences in morphology, total sperm length or even, different lengths of some structures and functions [17-18].

The most common polymorphism in insect spermatozoa is related to the length of the nucleus and flagellum. In the *Drosophila* group it is common to find males producing two or more morphological classes of spermatozoa within a single male ejaculate [11, 17]. Although sperm length can vary according to strains or species examined, exposure to stressful developmental environments, including relatively high temperature, has been shown to increase within-male variation in sperm length in *Scathophaga stercoraria* flies [19].

Co. hominivorax and *Co. macellaria* produce more than one length of sperm in a common testis. When analyzed in light microscopy, we observed that the spermatozoa exhibit variations in the length of head and tail. In *Co. hominivorax* the data show a wide variation in total length of sperm in the same testis, while in *Co. macellaria* the head length is greater. The polymorphism in the length of the

1
2
3 spermatozoa has also been observed in other Calliphoridae. In *Lucilia cuprina* and
4
5 *Lucilia eximia* a significant variation in sperm length was observed [20], but in
6
7 *Chrysomya megacephala* this variation was not observed [21]. This is the most
8
9 common type of polymorphism described in insects [22] and has been documented
10
11 for a wide variety of other invertebrates [23-24].
12

13
14
15 Spermogenesis in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* is similar to that
16
17 described in other dipterans and does not differ markedly from what happens in other
18
19 insect orders [11, 14, 20-21, 25-26].
20

21
22 In the spermatozoa of the two species studied, the nuclear chromatin is
23
24 electron lucent when fixed with tannic acid. When treated with E-PTA, only the
25
26 periphery of the nucleus and the nuclear envelope of *Co. hominivorax* and *Co.*
27
28 *macellaria* showed a positive reaction. This aspect was also observed in *L. cuprina*
29
30 and *L. eximia* spermatozoa [20], whereas in *C. megacephala* the nucleus was found
31
32 completely positive for the method [21].
33
34

35
36 The two accessory membranes observed near to the nucleus in spermatids of
37
38 *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* also appear in spermatids of other Calliphoridae
39
40 [20-21]. These structures can be observed parallel to the nuclear envelope,
41
42 extending along to the nucleus. With increased condensation of the nucleus at the
43
44 end of the spermogenesis, the accessory membranes tend to disappear.
45
46

47
48 The posterior region of the nucleus in studied species has a peculiar feature,
49
50 observed in longitudinal and cross-sections, which is the beginning of the axoneme,
51
52 following the other tail structures. Just below the region of the implantation of the
53
54 axoneme in the nucleus, the complete axoneme appears.
55
56

1
2
3 In the two studied species, the structures that make up the 'overlap' region
4 (nucleus, axoneme, mitochondrial derivatives and centriolar adjunct) can be
5 observed both in spermiogenesis and in mature sperm. Detailed descriptions of this
6 region can be found for *M. scalaris*, *C. megacephala* and *L. cuprina* [20-21, 27].
7
8
9

10
11
12 The tail region is marked by the complete disappearance of the nucleus and
13 the increase in size of the centriolar adjunct. It is believed that the role of this
14 structure in most insects is as a support organelle stabilizing the insertion of the
15 axoneme at the nuclear base and anchoring the mitochondrial derivatives on each
16 side of the axoneme [11, 16].
17
18
19

20
21
22 The centriolar adjunct in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* is relatively long
23 and presents a moderate electron-density, a pattern also observed in other species
24 of Brachycera [20-21, 28]. This structure was observed in the 'overlap' region (in
25 cross-section), surrounded by the nucleus and tail structures (mitochondrial
26 derivatives and axoneme) and in the tail region between the mitochondrial
27 derivatives.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38
39 The early stage of formation of the tail is associated with the accumulation of a
40 group of mitochondria that fuse to form the 'nebenkern' and later this structure
41 divides to form two mitochondrial derivatives [14, 28], which are filled with a protein
42 that presents a three-dimensional paracrystalline organization – crystallomitin [29].
43
44
45
46
47

48
49 In *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*, the pattern observed is the same as
50 that found in *C. megacephala* and *L. cuprina* [20-21], and different from that
51 described for *L. eximia* and *L. peruviana* [20].
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 According to Dallai *et al.* [30], the sperm structures of the axoneme in
4 Brachycera are relatively uniform, whereas in the suborder Nematocera there is
5 considerable diversity, which is greater than that in any other insect order. As
6 expected and found for most Brachycera studied [11, 21, 30], the axoneme in the two
7 species examined has 9+9+2 microtubules arranged parallel to each other, and in
8 fact, the profile is similar to that described for most other insects [31].
9
10
11
12
13
14
15
16

17 In the tail region of *Co. hominivorax* spermatozoon all organelles showed
18 negative for the method of ethanolic-phosphotungstic acid. In *Co. macellaria* species
19 the basic proteins were present in the centriolar adjunct and on the border of
20 mitochondrial derivatives. Together, these aspects observed in the two species of the
21 genus *Cochliomyia* point to characteristics that are distinct from those observed in
22 other Diptera described [20, 21, 32].
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONCLUSIONS

Based on the characteristics showed in this work, the morphology of spermatozoa of the two *Cochliomyia* species is similar to the majority of the Brachycera [11]. However, some distinct differences were found: the polymorphism of sperm length in *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* that indicates an existence of a large number of longer and shorter spermatozoa in each species, and the differences observed in sperm structure, such as the presence or absence of basic protein structure (E-PTA method). Thus, these characteristics are consistent data that illustrate the structural diversity of the dipteran spermatozoa, which might provide a character system that can be used in association with other tools to resolve various uncertainties about the revolutionary relationships of this insect group.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Empreendimentos Científico e Tecnológico (FINATEC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

For Peer Review

REFERENCES

- 1 Kuty SN, Pape T, Wiegmann WM and Meyer R (2010) Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpines's fly. *Sys Entomol.* **35**, 614-635.
- 2 Rognes K (1997) The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group *Cladistics* **13**, 27-68.
- 3 Carvalho CJB and De Mello-Patiu CA (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol.* **52 (3)**, 390-406.
- 4 Pape T, Wolff M and Amat EC (2004) Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia. *Biota Colombiana* **5 (2)**, 201-208.
- 5 Guimarães JH and Papavero N (1999) *Miásis in man and animals in Neotropical region.* (São Paulo. Editora Pleiade/FAPESP).
- 6 Litjens P, Lessinger AC and Lima de Azeredo-Spin AM (2001) Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med. Vet. Entomol.* **15**, 183-188.
- 7 Baccetti B (1987) Spermatozoa and phylogeny in orthopteroid insects. In: *Evolutionary Biology of Orthopteroid Insects.* Ed. Baccetti B. (Ellis Harwood Limited Chichester UK).
- 8 Carcupino M, Profili G, Kathirithamby J and Mazzini M (1995) Sperm ultrastructure of *Xenos vesparum* (Rossi) and its significance in the taxonomy and phylogeny of Strepsiptera (Insecta). *Mem Mus Natn Hist Nat.* **166**, 291-296.

- 1
2
3 **9** Dallai R and Afzelius BA (1995) Phylogenetic significance of axonemal
4 ultrastructure: examples from Diptera and Trichoptera. In: *Advances in Spermatozoal*
5 *Phylogeny and Taxonomy*, ed. Jamieson BGM, Ausio J, Justine J-L. Mem Mus Natn
6 Hist Nat. **166**, 565p.
7
8
9
10
11 **10** Jamieson BGM, Ausio J and Justine JL (1995) In: *Advances in spermatozoal*
12 *phylogeny and taxonomy* . Mem Mus Natn Hist Nat. **166**, 565 p.
13
14
15
16 **11** Jamieson BGM, Dallai R and Afzelius BA (1999) *Insects: their spermatozoa and*
17 *phylogeny* (Enfield, New Hampshire USA - Science Publishers Inc.)
18
19
20
21 **12** Afzelius BA (1988) Microtubules in the spermatids of stick insects. *J Ultrastruct*
22 *Mol Struct Res.* **98**, 94-102.
23
24
25 **13** Bloom FE and Aghajanian GK (1968) Fine structure and cytochemical analysis of
26 the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res.* **22**,
27 361-375.
28
29
30
31 **14** Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. *J Cell Biol*
32 **44**, 243-277.
33
34
35
36 **15** Baccetti B (1972) Insect Sperm Cell. *Adv Insect Physiol.* **9**, 315-397.
37
38
39 **16** Jamieson BGM (1987) *The Ultrastructure and Phylogeny of Insect Spermatozoa.*
40 (Cambridge University Press, Cambridge, pp. 205-208).
41
42
43 **17** Swallow JG and Wilkinson GS (2002) The long and short of sperm
44 polymorphisms in insects. *Biol Rev.* **77**, 153-182.
45
46
47
48 **18** Pitnick S, Hosken DJ and Birkhead TM (2009) Sperm morphological diversity. In:
49 *Sperm Biology – An Evolutionary Perspective*, ed. Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick
50 S. (Academic Press Elsevier, UK. pp. 69-149).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **19** Hellriegel B and Blackenhorn WU (2002) Environmental influences on the gametic
4 investment of yellow dung fly males. *Evol. Ecol.* **16**, 502-522.
5
6

7
8 **20** Name KPO, Barros-Cordeiro KB, Gama Filho JB, Wolff M, Pujol-Luz JR and Bao
9 SN (2011) Structure and Ultrastructure of Spermatozoa and Spermiogenesis in three
10 species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *J. Morphol.*
11 *Article in press.*
12
13
14
15
16

17
18 **21** Name KPO, Pujol-Luz JR and Bao SN (2010) Structure and ultrastructure of
19 spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* **41**, 853-
20 860.
21
22
23

24 **22** Sivinski J (1980) Sexual selection and insect sperm. *Florida Entomologist* **63**, 99-
25 111.
26
27
28

29
30 **23** Rosati F, Baccetti B and Dallai R (1970) The spermatozoon of Arthropoda. X.
31 Araneid and the lower myriapods. In: *Comparative Spermatology*, ed. B. Baccetti, pp.
32 247-254 (Academic Press, New York, USA).
33
34
35

36
37 **24** Jamieson BGM (1986) The spermatozoa of Chilopoda (Uniramia): an
38 ultrastructural review with data on the dimorphism in *Ethmostigmus rubripes* and
39 phylogenetic discussion. *J. Submicrosc. Cytol.* **18**, 543-558.
40
41
42
43

44
45 **25** Ndiaye M, Mattei X and Thiaw OT (1996) Spermatogenesis in mosquitoes
46 (Diptera: Culicidae). *J Submicrosc Cytol Pathol.* **28**, 375-384.
47
48

49 **26** Dallai R, Carapelli A, Nardi F, Fanciulli PP, Lupetti P, Afzelius BA and Frati F
50 (2004) Sperm structure and spermiogenesis in *Coletinia* sp. (Nicoletiidae:
51 Zygentoma: Insecta) with a comparative analysis of sperm structure in Zygentoma.
52 *Tissue Cell* **36**, 233-244.
53
54
55
56
57

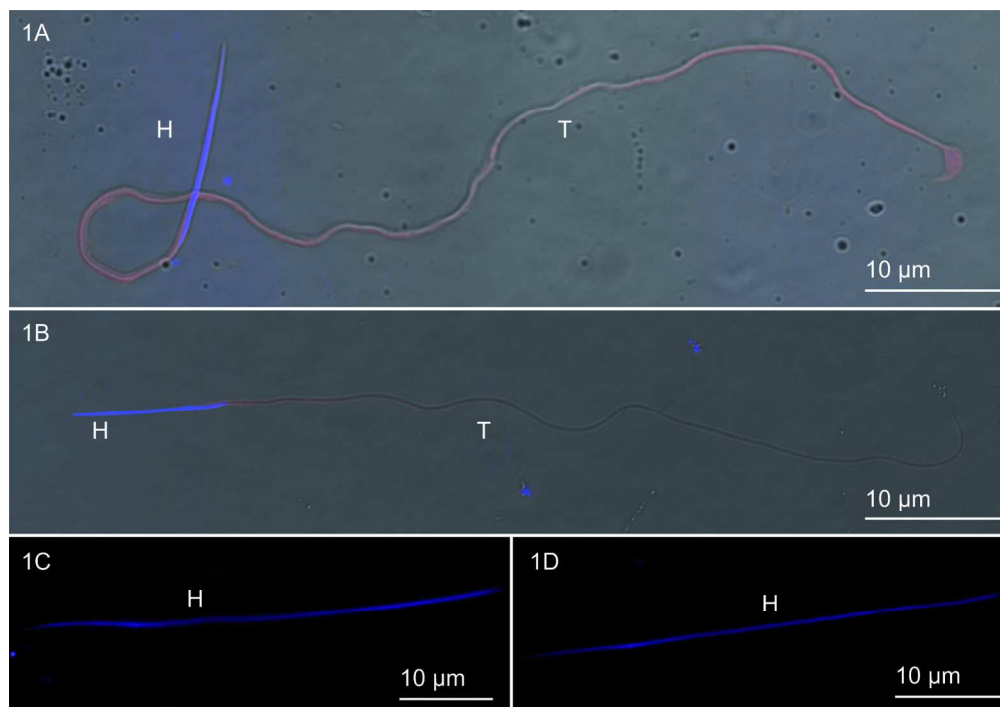
- 1
2
3 **27** Curtis SK, Benner DB and Musil G (1989) Ultrastructure of the spermatozoon of
4 *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *J*
5 *Morphol* **200**, 47-61.
6
7
8
9 **28** Warner FD (1971) Spermatid differentiation in the blowfly *Sarcophaga bullata* with
10 particular reference to flagellar morphogenesis. *J Ultrastruct Res.* **35**, 210-232.
11
12 **29** Baccetti B, Dallai R, Pallini V, Rosatti F and Afzelius BA (1977) Protein of insect
13 sperm mitochondrial crystals: crystallomitin. *J Cell Biol* **73**, 594-600.
14
15 **30** Dallai R, Bellon PL, Lanzavecchia S and Afzelius BA (1993) The dipteran sperm
16 tail: ultrastructural characteristics and phylogenetics considerations. *Zool Scripta* **22**,
17 193-202.
18
19 **31** Dallai R and Afzelius BA (1990) Microtubular diversity in insect spermatozoa:
20 results obtained with a new fixative. *J Struct Biol.* **103**, 164-179.
21
22
23 **32** Báo SN, Lins U, Farina M and De Souza W (1992) Mitochondrial derivatives of
24 *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) spermatozoon. Some new aspects evidenced by
25 cytochemistry and Image Processing. *J Struct Biol.* **109**, 46-51.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LEGENDS

Figure 1. A-D. Light micrograph of spermatozoa of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*. **(A-B).** Spermatozoa in total length of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*, respectively. Head (H) and tail (T). **(C-D).** DAPI-stained head region of the two species previously described, respectively.

Figure 2. A-F. TEM of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria* spermatids. **(A-E).** *Co. macellaria* species. **(A-D).** Cross-section of the head region. **(A).** Nucleus encircling by microtubules (arrow). **(B-D).** The implantation and emergence of the complete axoneme in the nuclear region. **(E).** In the “overlap” region accessory membranes and microtubules were observed (arrow). This region is marked by the emergence of the centriolar adjunct. The paracrystalline material is observed (asterisk). **(F).** Tail region in *Co. hominivorax* species. Presence of cytoplasmic microtubules and absence of accessory membranes. Axoneme with 9+9+2 microtubular arrangement. Accessory membranes (Ma), axoneme (Ax), centriolar adjunct (Ca), nucleus (n) and mitochondrial derivatives (Md).

1
2
3 **Figure 3. A-F.** Cross-sections of testis of *Co. hominivorax* and *Co. macellaria*,
4 submitted to the E-PTA method. **(A and C).** In the former species, only the periphery
5 of the nucleus and a nuclear envelope (arrowhead), are positive for the method. **(B,**
6
7
8
9 **D-F).** In the latter species, the periphery of the nucleus and the nuclear envelope
10 (arrowhead) are positive. In the tail structures, only the border region of the
11 mitochondrial derivatives (arrow) and the centriolar adjunct are positive. The
12 paracrystalline structure (asterisk) is negative for the method. Axoneme (Ax),
13 centriolar adjunct (Ca), nucleus (n), mitochondrial derivatives (Md).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

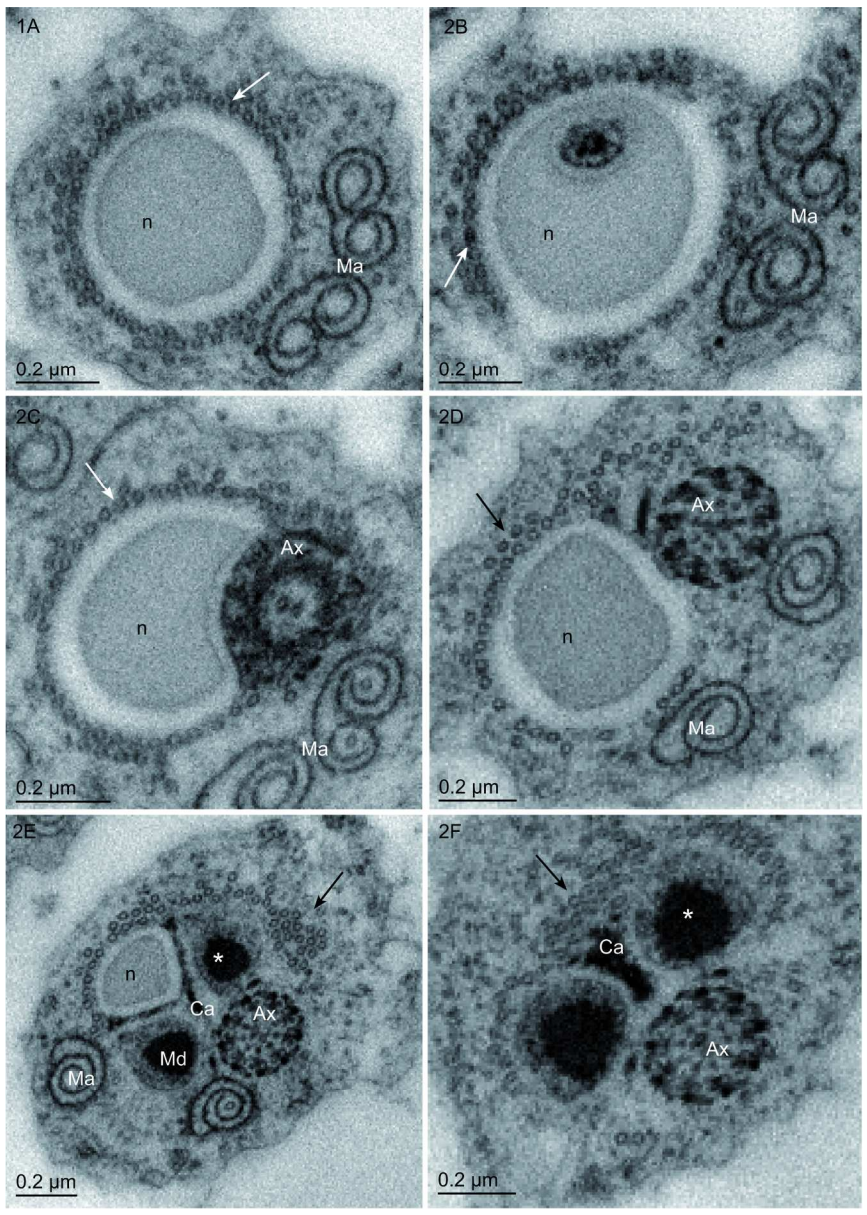


150x104mm (300 x 300 DPI)

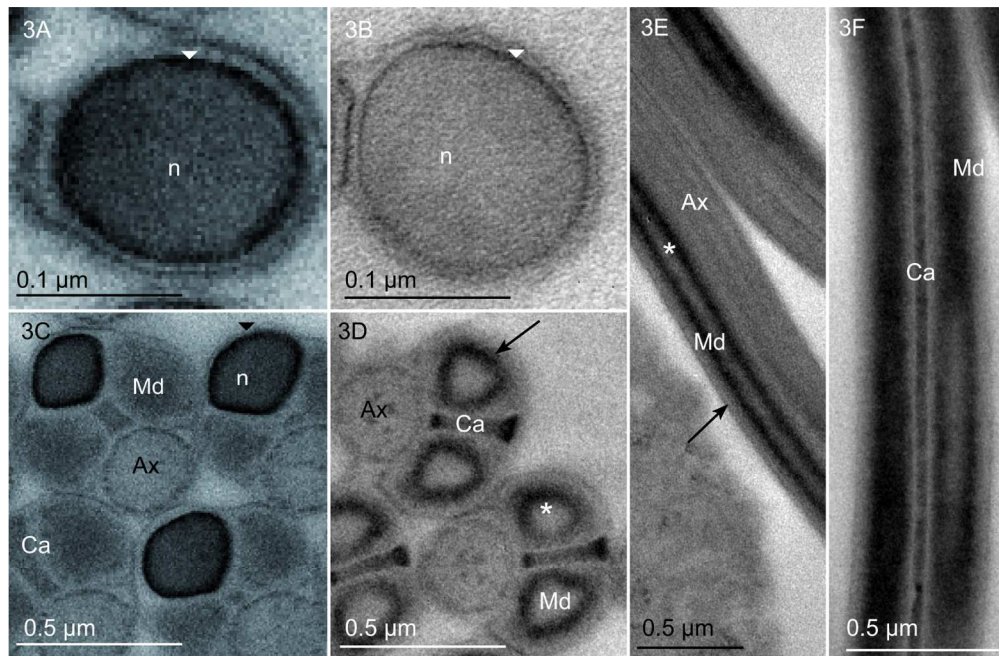
Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



153x215mm (300 x 300 DPI)



150x98mm (300 x 300 DPI)

Table 1. Dimensions (mean and standard deviation, SD) of spermatozoa taken from light microscopy. *n*, number. Range given for total length.

| Species | Head | Tail | Total length |
|------------------------|--|--|---|
| <i>Co. hominivorax</i> | 26.86 μm (<i>n</i> = 50, SD = 5.05) | 167.07 μm (<i>n</i> = 50, SD = 44.24) | 190.08 μm (108.03 – 311.97 μm) (<i>n</i> = 50, SD = 44.74) |
| <i>Co. macellaria</i> | 29.05 μm (<i>n</i> = 50, SD = 3.37) | 162.08 μm (<i>n</i> = 50, SD = 15.71) | 190.09 μm (144.23 – 227.07 μm) (<i>n</i> = 50, SD = 14.92) |