



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de São José do Rio Preto

Fernanda Fernandez Madeira

**Existe Atividade Transcricional Durante o Fenômeno de Persistência  
Nucleolar na Meiose dos Triatomíneos?**

**São José do Rio Preto**  
**2017**

Fernanda Fernandez Madeira

**Existe Atividade Transcricional Durante o Fenômeno de Persistência  
Nucleolar na Meiose dos Triatomíneos?**

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

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2015/14762-5.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior.

**São José do Rio Preto  
2017**

Madeira, Fernanda Fernandez.

Existe atividade transcricional durante o fenômeno de persistência nucleolar na meiose dos triatomíneos? / Fernanda Fernandez Madeira. -- São José do Rio Preto, 2017

92 f. : il., tabs.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

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

1. Biologia molecular. 2. Citogenética animal. 3. Espermatogênese em animais. 4. Triatoma. 5. Meiose. 6. Nucléolo. 7. Citoquímica.  
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.23

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

Fernanda Fernandez Madeira

**Existe Atividade Transcricional Durante o Fenômeno de Persistência  
Nucleolar na Meiose dos Triatomíneos?**

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

Financiadora: FAPESP – Processo nº 2015/14762-5.

Comissão Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Tercília Vilela Azeredo Oliveira  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alba Regina de Abreu Lima  
FAMERP – Faculdade de Medicina de Rio Preto

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvana Gisele Pegorin de Campos  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
02 de março de 2017

Local de Realização

---

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e no Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE/UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsas de estudos financiadas pela CAPES – 03/2015 a 12/15 e FAPESP – 01/16 a 02/17 (processo nº 2015/14762-5).

Dedicatória

---

Dedico este trabalho aos meus pais, Sheila e Francisco, e à minha avó Nadyr, exemplos de vida e de luta. Aos meus pais que, mesmo com três filhos e em dias cada vez mais difíceis, nunca deixaram de sacrificar nada em prol de uma melhor educação para sua família. E à minha avó, que sempre me apoiou em cada decisão e sempre teve orgulho da sua “primeira neta a entrar em uma universidade estadual”. Cada vitória que eu conquisto na vida é graças a vocês. Muito obrigada por tudo!



Agradecimientos

---

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas na minha trajetória.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo acolhimento, conhecimentos compartilhados e oportunidade de crescer em minha vida acadêmica. Agradeço imensamente pela confiança e por permitir a realização desse trabalho. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior, por todo o auxílio, pelas sugestões e por toda contribuição fornecida para que o presente trabalho fosse concluído. Agradeço também à sua aluna Nayara, amiga do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, sempre disposta a ajudar nas etapas de imunocitoquímica, que infelizmente acabaram não fazendo parte da versão final deste trabalho, mas que com certeza ainda serão finalizadas.

À banca examinadora, por aceitarem gentilmente o convite para participar desta banca, contribuindo grandemente em minha formação. Muito obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular: Amanda Ravazi, Ana Beatriz Bortolozo, Ana Letícia Guerra, Giovana Nunes, Kaio Alevi, Kelly Borsatto e Yago Reis. Obrigada pela convivência e apoio de toda natureza. Especialmente, agradeço imensamente à Ana Letícia, pelas conversas animadas, pelos “bafos”, risadas e apoio vindo de todas as formas possíveis, tanto na vida profissional quanto na pessoal; à Ana Beatriz, por sempre me apoiar nas “gordices” e “laaaanches” dessa vida e principalmente pelas risadas; à Amanda, pela paciência, conselhos, pelo auxílio muitas vezes prestado e por sempre estar disposta a me ajudar em tudo; mas principalmente, tenho muito que agradecer ao Kaio, por primeiramente me acolher ao laboratório, por toda a ajuda (que não foi pouca, nem de longe) durante a realização de todas as etapas que geraram esse trabalho e por estar sempre disposto a compartilhar um pouco do seu enorme conhecimento com todos do laboratório. Sem vocês os desafios desse trabalho seriam muito mais difíceis de resolver. Muito obrigada!

À instituição IBILCE/UNESP pelo espaço físico, estrutura e todo apoio que proporciona o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

Aos meus pais, Sheila e Francisco, por sempre me apoiarem em todas as decisões, especialmente quando deixei de seguir o sonho de fazer o Curso de Medicina para tentar algo que talvez não dê tanto futuro, mas que nunca deixou de me fazer feliz - a Biologia.

Aos meus irmãos gêmeos, Henrique e Heitor, pelos momentos de distração e pelo apoio vindo de todas as formas possíveis. Espero ser um exemplo na futura vida acadêmica de vocês.

Ao meu avô, Antônio, pelo apoio de forma discreta, mas também por sempre acreditar e incentivar os meus sonhos. Sinto sua falta todos os dias. Amo você!

À minha avó, Nadyr, a última restante dos avós, mas a principal apoiadora do meu sucesso e das minhas escolhas. Amo você!

Aos meus maravilhosos amigos de faculdade, Denise, Daniele, Jacqueline e Natan, sempre juntos desde o primeiro ano e sempre unidos (e desunidos) em grupos de seminários e trabalhos. Mesmo que cada um acabou seguindo seu próprio caminho, sem o apoio de vocês, nada disso seria possível. Espero tê-los sempre na minha vida!

Às minhas amigas de longa data Aline, Amanda e Ariane, e às amigas mais recentes Daiane, Nathália e Juliana, que sempre são capazes de extrair um sorriso meu nos momentos mais difíceis e que sempre acreditaram no meu potencial e sucesso acadêmico. Sou grata a vocês de todas as formas possíveis. Especialmente, agradeço à Daiane, por ter se tornado em tão pouco tempo alguém tão especial e essencial na minha vida. Agradeço pelos conselhos, pela convivência diária, por todos os “puxões de orelha”, enfim – por tudo. Muito obrigada!

A todos os amigos da DMB boargame club: Alexandre, Allan, André, Bianca, Daiane, Diego, Fernanda, Henrique, João, Khauan, Marcelo, Maria Stella, Mascote, Michel, Nathália, Luís, Rabelo, Stefano e Zé. Obrigada por fazerem meus finais de semana (e principalmente domingos) muito mais prazerosos, por me distraírem dos problemas semanais e pelas infinitas risadas. Adoro vocês!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse momento.

Epígrafe

---

## CIENTIRINHAS #56

MUITO ANTES DE APRENDER SOBRE CHARLES DARWIN E A TEORIA DA EVOLUÇÃO NAS AULAS DE BIOLOGIA...



AS AULAS DE EDUCAÇÃO FÍSICA JÁ TINHAM ME ENSINADO NA PRÁTICA SOBRE A "SELEÇÃO DOS MAIS ÁPTOS."



ENTÃO, UM DIA, EU LI SOBRE A ESPECIALIZAÇÃO DOS BICOS DOS TENTILHÕES...



E PERCEBI QUE TODO MUNDO TEM APTIDÃO PARA FAZER MUITO BEM ALGUMA COISA!



E VOCÊ? JÁ DESCOBRIU PRA QUE SERVE SEU "BICO"?

[f/QUADRINHORAMA](#) + [f/DRAGUESDEGARAGEM](#)

*"You better work."*

RuPaul Andre Charles

Resumo

---

## RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos de grande importância para a saúde pública, uma vez que são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Além da importância epidemiológica, esses insetos se destacam em estudos celulares, pois apresentam algumas peculiaridades, como cromossomos holocêntricos, meiose invertida para os cromossomos sexuais e persistência nucleolar durante a meiose. O fenômeno de persistência nucleolar é definido pela presença do nucléolo ou corpúsculos nucleolares durante todas as fases da meiose. Esse fenômeno foi descrito, até o momento, para 24 espécies de triatomíneos, dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. No entanto, somente a presença dessa estrutura nuclear em todas as fases da meiose não garante a sua atividade transcricional. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo descrever a nucleologênese em novas espécies de, pelo menos, sete novos gêneros (*Cavernicola*, *Psammolestes*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Meccus*, *Mepraia*, *Nesotriatoma*), com o intuito de analisar se a persistência nucleolar é uma sinapomorfia da subfamília Triatominae. Além disso, esse trabalho também teve como finalidade avaliar a atividade nucleolar durante a meiose das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius montenegrensis* e *Panstrongylus megistus*, por meio da técnica citoquímica *Acridine Orange*, com o objetivo de caracterizar, com base na presença de RNA, se existe atividade transcricional do material nucleolar persistente. Todas as 59 espécies analisadas, distribuídas em sete gêneros, apresentaram persistência nucleolar durante a meiose, corroborando, portanto, que esse fenômeno é uma sinapomorfia da subfamília Triatominae. Por meio do fluorocromo *Acridine Orange*, foi verificado que o nucléolo persistente apresenta-se transcionalmente ativo. Dessa forma, evidencia-se, pela primeira vez, que o nucléolo está presente na espermatogênese de todos os triatomíneos e que esse material apresenta-se transcionalmente ativo, suportando a relação entre a persistência nucleolar durante a meiose desses insetos e a formação da organela corpo cromatóide.

**Palavras chave:** Nucléolo, Ciclo nucleolar, Triatomíneos, Citoquímica, Corpo cromatóide.

Abstract

---



## ABSTRACT

*Triatomines are hematophagous insects of great importance for public health, since they are considered as the main form of transmission of the protozoan Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Besides the epidemiological importance, these insects stand out in cellular studies, as they present some peculiarities, such as holocentric chromosomes, inverted meiosis for sex chromosomes and nucleolar persistence during meiosis. The phenomenon of nucleolar persistence is defined by the presence of the nucleolus or nucleolar corpuscles during all phases of meiosis. So far, this phenomenon has been described for 24 triatomine species of the genus Triatoma, Rhodnius and Panstrongylus. However, only the presence of this nuclear structure in all phases of meiosis does not guarantee its transcriptional activity. So, the objective of the present study was to describe the nucleologenesis in new species of at least seven new genera (Cavernicola, Psammolestes, Dipetalogaster, Eratyrys, Meccus, Mepraia, Nesotriatoma), in order to analyze if nucleolar persistence is a synapomorphy of the subfamily Triatominae. Besides that, this work had the purpose to evaluate the nucleolar activity during the meiosis of the species Triatoma infestans, Rhodnius montenegrensis and Panstrongylus megistus, by means of the cytochemical technique Acridine Orange, with the objective of characterizing, based on the presence of RNA, if there is transcriptional activity in the persistent nucleolar material. All 59 species analyzed, distributed in seven genera, presented nucleolar persistence during meiosis, thus corroborating that this phenomenon is a synapomorphy of the subfamily Triatominae. By means of the fluorochrome Acridine Orange, the persistent nucleolus has been found to be transcriptionally active. Thus, it was evident, for the first time, that the nucleolus is present in the spermatogenesis of all triatomines and that this material is transcriptionally active, supporting the relationship between nucleolar persistence during the meiosis of these insects and the formation of the organelle chromatoid body.*

**Keywords:** nucleolus, nucleolar cycle, triatomine, cytochemistry, chromatoid body.

Sumário

---

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. A doença de Chagas .....	18
1.2. Subfamília Triatominae .....	20
1.3. A persistência nucleolar.....	21
1.4. O nucléolo .....	23
1.5. As proteínas nucleolares .....	24
1.6. O corpo cromatóide .....	25
1.7. Principais espécies analisadas .....	27
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1. Obtenção, procedência e escolha das espécies .....	33
3.2. Órgão analisado .....	35
3.3. Processamento do material biológico .....	35
3.4. Fixação dos túbulos seminíferos .....	36
3.5. Preparo usual das lâminas.....	37
3.6. Técnicas citogenéticas convencional e molecular .....	37
3.6.1. Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980) .....	37
3.6.2. Fluorocromo <i>Acridine Orange</i> (VIDAL, 1987) .....	37
3.7. Forma de análise dos resultados .....	38
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1. Artigo I - Nucleolar-persistence phenomenon during spermatogenesis in genus <i>Meccus</i> (Hemiptera, Triatominae) .....	40
4.2. Artigo II - Nucleolar Persistence: Peculiar Characteristic of Spermatogenesis of the Vectors of Chagas Disease (Hemiptera, Triatominae) .....	49
4.3. Artigo III - First Evidences of transcriptional activity during the nucleolar persistence phenomenon in triatominaes (Hemiptera, Triatominae).....	57
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>75</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>89</b>

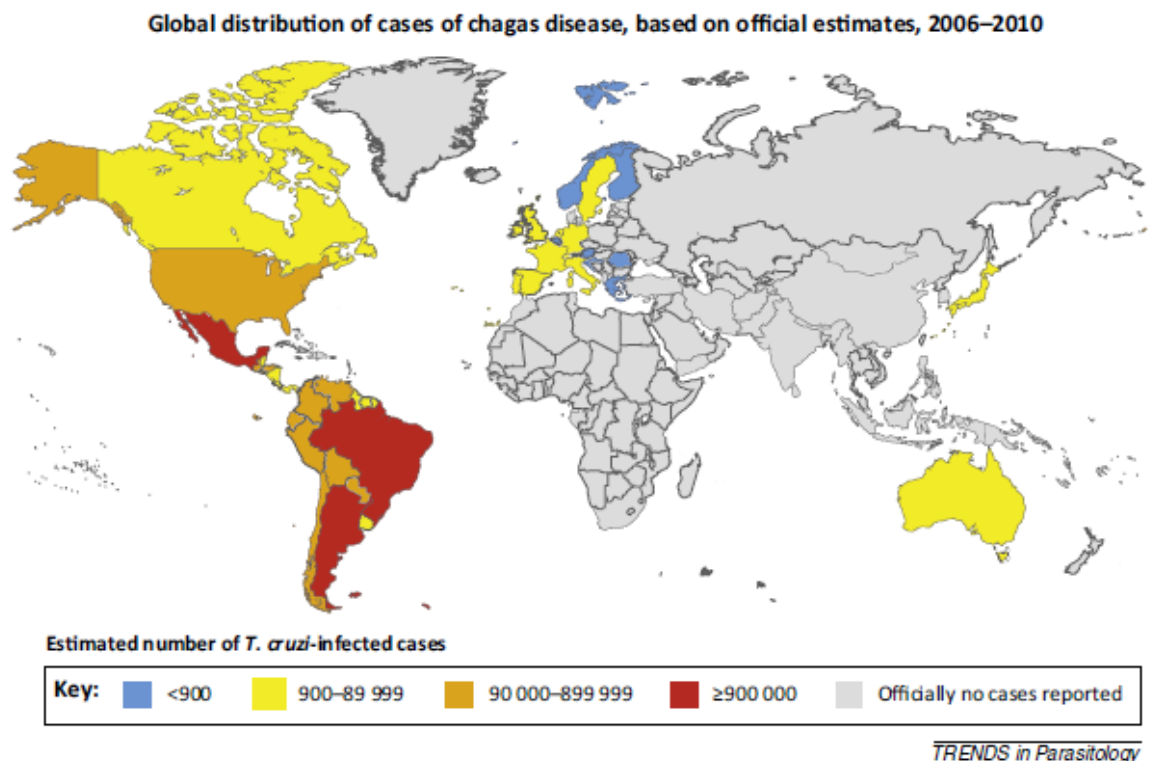


## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Chagas

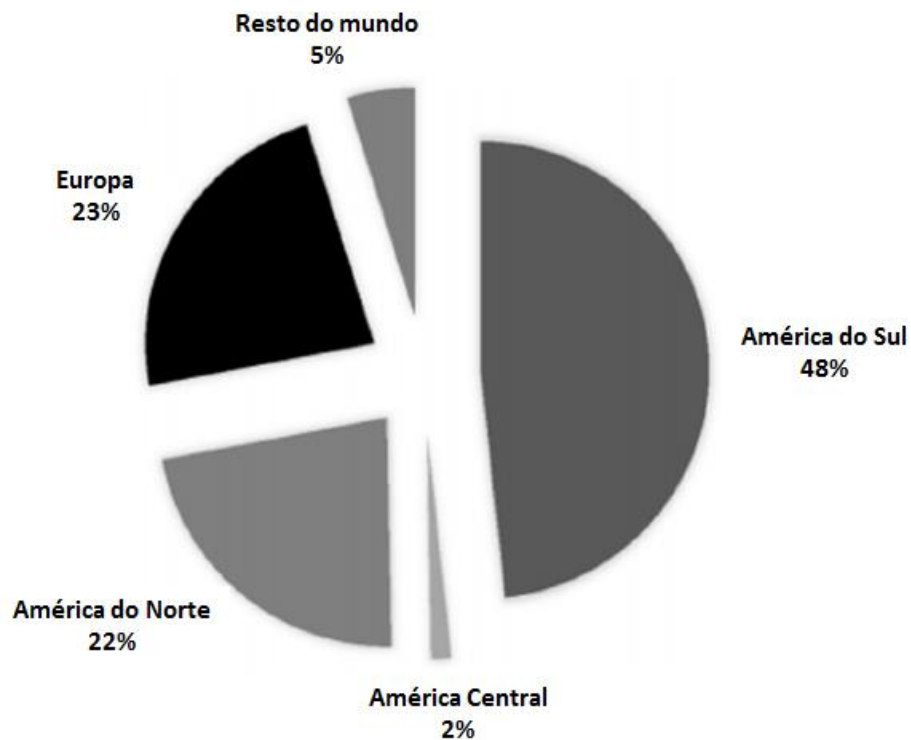
A doença de Chagas é uma doença parasitária que atinge cerca de seis a sete milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria dos casos na América Latina (WHO, 2016). Essa doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), e transmitida, principalmente, pelos triatomíneos (CHAGAS, 1909), conhecidos como “vinchucas”, em espanhol ou “barbeiros”, em português.

A doença de Chagas é considerada atualmente endêmica para a América Latina, embora seja cada vez mais encontrada em outras partes do mundo, incluindo países anteriormente considerados livres da mesma, como Japão e Austrália (Figura 1), sendo o aumento global de migrações um dos principais motivos. A transmissão da doença de Chagas para essas áreas não endêmicas pode ser problemática, uma vez que a presença de vetores nativos pode auxiliar a transmissão da infecção (PEREZ et al., 2015). Na América Latina, a doença de Chagas apresenta o quarto maior impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias, ficando atrás apenas das doenças respiratórias, diarreias e da AIDS (SCHMUNIS, 1999).



**Figura 1.** Distribuição global dos casos da Doença de Chagas (PEREZ et al., 2015).

Os países das Américas são responsáveis pelo maior número de publicações de artigos científicos sobre a doença de Chagas (Figura 2), o que não é surpresa, visto que a doença é considerada endêmica para 21 países da região. Desde 1991, existem iniciativas da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) focadas na eliminação ou redução de doenças negligenciadas, implementando políticas promotoras de pesquisa e desenvolvimento científico, com o suporte dos Ministérios da Saúde da Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (BERMUDEZ et al., 2016).



**Figura 2.** Distribuição de publicações sobre a doença de Chagas por região (Adaptada de BERMUDEZ et al., 2016).

Na atualidade, já foram descritas 151 espécies de triatomíneos, sendo que no Brasil existem, aproximadamente, 65 espécies distribuídas em 26 Estados (JURBERG et al., 2013; GARDIM et al., 2014) que, em consequência de ações antrópicas, como desmatamento e queimadas, estão migrando para o ambiente domiciliar (intra e peridomicílio), em busca de abrigo e alimento - processo conhecido como domiciliação (DIAS; SCHOFIELD, 1998). Em relação aos padrões de diversidade, 42 das 65 espécies registradas (64,6%) ocorrem exclusivamente no Brasil, sendo a Bahia (23) e o Mato Grosso (20) os estados com maior riqueza de espécies (GALVÃO, 2015).

Duas áreas geográficas são reconhecidas, de acordo com padrões de transmissão: a região originalmente de risco para a transmissão vetorial, onde ações de vigilância ambiental, entomológica e epidemiológica devem ser concentradas, visando à continuidade da interrupção da transmissão da doença pelo *T. infestans* e por outros vetores passíveis do processo de domiciliação; e a região da Amazônia Legal, onde a doença de Chagas até certo tempo não era reconhecida como problema de saúde pública, sendo as ações de vigilância estruturadas e executadas a partir do reconhecimento das áreas preferenciais das diferentes espécies de vetores prevalentes, e a partir da investigação de situações em que há evidências ou suspeita de domiciliação de alguns vetores (FIOCRUZ, 2013).

Uma vez que ainda não existe uma vacina para a cura efetiva da doença e o tratamento com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) é eficaz apenas na fase aguda da doença (que, na maioria dos casos, é assintomática), a redução ou interrupção da transmissão vetorial é ainda a principal forma de minimizar o número de hospedeiros infectados e diminuir a incidência da doença de Chagas na população (DIAS et al., 2002; WHO, 2016). Além disso, a existência de programas educacionais e de erradicação tem contribuído substancialmente para a alteração do quadro epidemiológico da doença (IAMAT, 2016).

## 1.2. Subfamília Triatominae

Os triatomíneos, taxonomicamente, pertencem à Ordem Hemiptera, Subordem Heteroptera, Família Reduviidae e Subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). O número de espécies e gêneros de Triatominae tem mudado constantemente em função de revisões e dos novos enfoques e ferramentas com os quais os estudos são realizados. Atualmente, existem 151 espécies descritas na subfamília Triatominae (sendo 149 espécies válidas e duas espécies fósseis), compreendidas em 18 gêneros e cinco tribos, classificados principalmente em relação à sua morfologia externa (GALVÃO, 2014; ALEVI et al., 2016b; MENDONÇA et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Além da classificação taxonômica clássica, os triatomíneos também são agrupados em complexos e subcomplexos de acordo com sua morfologia e distribuição geográfica (LENT; WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009) e, mais recentemente, a partir da filogenia molecular (JUSTI et al., 2014, 2016).

Esses insetos hematófagos são de grande importância epidemiológica, uma vez que são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *T. cruzi*, agente

etiológico da doença de Chagas (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009). Nas duas últimas décadas, os triatomíneos se tornaram importantes organismos modelo para estudos neuroetológicos, servindo como base para estudos envolvendo mecanismos de procura do hospedeiro, reconhecimento de abrigo, ritmos circadianos e preferência de microclima, comunicação por ferormônios, formas de aprendizagem, dentre outros tópicos (LATORRE-ESTIVALIS et al., 2013).

Além disso, esses vetores são importantes modelos biológicos para estudos celulares, pois apresentam algumas peculiaridades quando comparados aos outros eucariotos, como cromossomos holocêntricos com cinetócoro difuso, meiose invertida para os cromossomos sexuais e o fenômeno de persistência nucleolar durante a meiose (BARTH, 1956; UESHIMA, 1966; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

### **1.3. A persistência nucleolar**

O fenômeno de persistência nucleolar é caracterizado pela presença do nucléolo ou corpúsculos nucleolares durante todas as fases da meiose (ALEVI et al., 2014a). Esse comportamento nucleolar é incomum quando comparado aos outros eucariotos, uma vez que o nucléolo fragmenta-se no final da prófase e só é reorganizado no final da anáfase/começo da telófase (GONZÁEZ-GARCIA et al., 1995). Dessa forma, durante as metáfases I e II não é comum observar material nucleolar disperso no citoplasma, diferente do que foi descrito para os triatomíneos (ALEVI et al., 2014a).

O fenômeno de persistência nucleolar para a subfamília Triatominae foi descrito pela primeira vez por Tartarotti e Azeredo-Oliveira para as espécies *Panstrongylus megistus* e *P. herreri*, em 1999. Nesse estudo, as pesquisadoras observaram a persistência de corpúsculos nucleolares em fases avançadas da meiose (anáfase e telófase). Atualmente 24 espécies de triatomíneos, de três gêneros, tiveram a nucleologênese descrita e apresentaram esse fenômeno durante a meiose (Tabela 1).



**Tabela 1.** Espécies de triatomíneos com a nucleologênese descrita que apresentam o fenômeno de persistência nucleolar.

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>	<b>Autores</b>
<i>Triatoma</i>	<i>Triatoma infestans</i>	MORIELLE e AZEREDO-OLIVEIRA, 2007
	<i>Triatoma klugi</i>	COSTA et al., 2008
	<i>Triatoma lenti</i>	ALEVI et al., 2013b
	<i>Triatoma melanocephala</i>	ALEVI et al., 2013b
	<i>Triatoma melanosoma</i>	BARDELLA et al. 2008
	<i>Triatoma platensis</i>	SEVERI-AGUIAR e AZEREDO-OLIVEIRA, 2005
	<i>Triatoma protracta</i>	SEVERI-AGUIAR e AZEREDO-OLIVEIRA, 2005
	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	SEVERI-AGUIAR e AZEREDO-OLIVEIRA, 2005
	<i>Triatoma vanda</i>	PEREIRA et al., 2015
	<i>Triatoma vitticeps</i>	SEVERI-AGUIAR et al., 2006
	<i>Triatoma williami</i>	PEREIRA et al., 2015
	<i>Triatoma wygodzinskyi</i>	IMPERADOR et al., 2015
<i>Panstrongylus</i>	<i>Panstrongylus herreri</i> (= <i>P. lignarius</i> )	TARTAROTTI e AZEREDO-OLIVEIRA, 1999
	<i>Panstrongylus megistus</i>	TARTAROTTI e AZEREDO-OLIVEIRA, 1999
<i>Rhodnius</i>	<i>Rhodnius colombiensis</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius domesticus</i>	MORIELLE e AZEREDO-OLIVEIRA, 2004
	<i>Rhodnius montenegrensis</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius nasustus</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius neglectus</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius neivai</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius pallescens</i>	MORIELLE e AZEREDO-OLIVEIRA, 2007
	<i>Rhodnius pictipes</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius prolixus</i>	ALEVI et al., 2014a
	<i>Rhodnius robustus</i>	ALEVI et al., 2014a

Os estudos encontrados na literatura foram realizados com a técnica citogenética de impregnação por íons prata e são focados, principalmente, no comportamento nucleolar durante a meiose, uma vez que a prata tem afinidade pelas proteínas nucleolares C23 (nucleolina) e B23 (numatrina) (HOWEL; BLACK, 1980). Essa técnica é conhecida há quase meio século, sendo usada para marcar as regiões nucleolares, ou seja, o Centro Fibrilar (CF) e

as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) nos cromossomos que carregam os locos gênicos que codificam RNA ribossômico (GOODPASTURE; BLOOM, 1975).

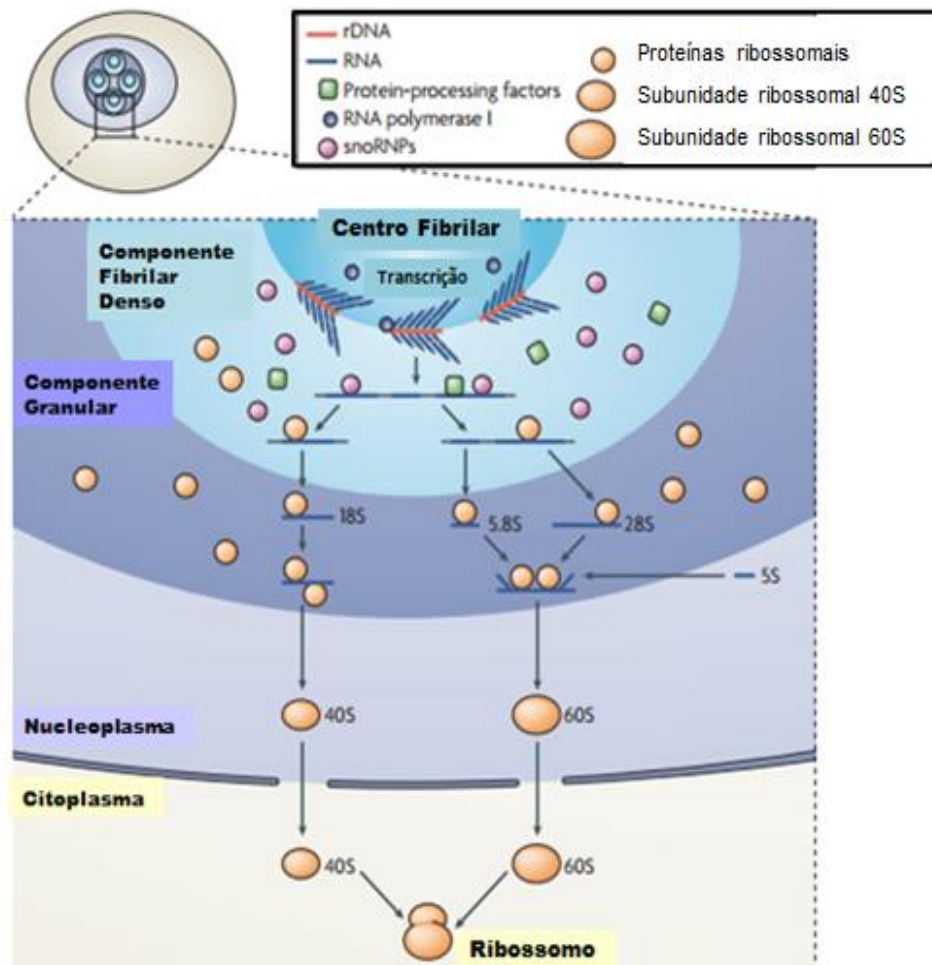
Alevi et al. (2014a) propuseram que esse fenômeno possa ser uma sinapomorfia da subfamília Triatominae, no entanto os autores sugerem que novas espécies e, principalmente, novos gêneros devam ser estudados para confirmar essa hipótese.

#### **1.4. O nucléolo**

O nucléolo é uma estrutura nuclear comum a todas as células eucariotas, responsável pela biogênese ribossomal, caracterizada por uma série de eventos que envolvem a transcrição de genes de RNAr, o processamento de RNAs pré-ribossomais e a união de partículas pré-ribossomais (SCHEER et al., 1997). Quando observado sob microscopia eletrônica de transmissão, geralmente apresenta três domínios: os centros fibrilares (CFs), o componente fibrilar denso (CFD) e os componentes granulares (CGs) (ZATSEPINA et al., 1997). Os CFs são tradicionalmente considerados como sítios de armazenamento de genes ribossômicos não-transcritos; o CFD é o sítio de transcrição desses genes; e os CGs são sítios de maturação e armazenagem das subunidades ribossômicas. A localização dos sítios de transcrição ainda é controversa, sendo que os autores divergem entre os CFs, no limite entre CFs e CFD ou somente no CFD (FISCHER et al., 1991; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) (Figura 3).

O nucléolo é um compartimento nuclear altamente dinâmico, envolvido em múltiplas funções e capacitado a responder prontamente às variações das necessidades metabólicas da célula (MALATESTA et al., 2011). Em células com um alto grau de produção de ribossomos, os nucléolos são grandes e complexos; em células com baixa atividade, são pequenos e possuem uma estrutura mais simples (CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

Os ciclos nucleolares mitóticos e meióticos tem sido extensivamente estudados, sendo bem estabelecido que a reorganização nucleolar é crucial para a reativação da transcrição e tradução das células-filhas (LEFÈVRE, 2008). Além disso, o ciclo nucleolar durante a gametogênese também é importante para a eliminação de danos celulares induzidos pela idade e prolongamento do tempo de vida em leveduras (ÜNAL et al., 2011).



**Figura 3. Biogênese Ribossomal.** A transcrição do DNAr pela RNA polimerase I pode ocorrer tanto nos centros fibrilares (CFs) como no limite entre o CF e o componente fibrilar denso (CFD). Os transcritos de RNA pré-ribossomal sofrem *splicing* e são modificados por pequenas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) no CFD. A maturação final das ribonucleoproteínas pré-ribossomais e sua união com as proteínas ribossomais ocorre em sua maioria na região do componente granular (CG). No CG, ocorre a união entre os RNAr 5.8S e 28S com o transcrito 5S para a formação da subunidade 60S, enquanto o RNAr 18S sozinho se une com a subunidade 40S. As subunidades ribossomais 40S e 60S são exportadas para o citoplasma, onde se ligam ao RNAm para a formação dos ribossomos funcionais (Adaptada de BOISVERT et al., 2007).

### 1.5. As proteínas nucleolares

Uma proteína nucléolo-específica pode ser definida como uma proteína especificamente localizada no nucléolo e envolvida na biogênese ribossomal (HERNANDEZ-

VERDUN, 1991). A função de algumas dessas proteínas são parcialmente desconhecidas. Em alguns casos, a localização diferencial dentro do nucléolo pode ser estabelecida, permitindo uma correlação entre os componentes nucleolares.

A nucleolina (C23) e a numatrina (B23) são proteínas nucleolares Ag-NOR positivas, ou seja, possuem a habilidade de reduzir a prata em condições ácidas, tornando-se coradas por ela. A nucleolina é uma proteína que existe em todos os eucariotos e encontra-se em altas concentrações em nucléolos com biogênese ribossomal ativa. Possui papel na transcrição de DNAr, processamento de RNAr e regulação da velocidade de produção de pré-ribossomos. Localiza-se preferencialmente no CFD, mas certa quantidade é encontrada no CF e CG. A numatrina, também denominada No38, encontra-se amplamente distribuída nos eucariotos superiores. Essa proteína é responsável pelos últimos estágios da organização de pré-ribossomos, estando envolvida no transporte de pré-ribossomos ao citoplasma. Dentro do nucléolo, localiza-se no CG, mas também em frações coradas pela prata que estão presentes nos CFs e no CFD (HERNANDEZ-VERDUN, 1991; CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013).

A proteína nucleolar fibrilarina foi descrita pela primeira vez no protozoário *Physarum polycephalum*, sendo conservada desde as leveduras (denominada NOP1) até os humanos (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). A fibrilarina é de extrema importância para avaliar se o nucléolo está ativo ou inativo, pois o processamento de pré-RNAr, modificação de pré-RNAr e montagem dos ribossomos são dependentes dessa proteína (TOLLERVEY et al., 1993). Essa proteína, localizada no componente fibrilar denso do nucléolo, encontra-se associada com os RNA pequenos nucleares U3, U8 e U13 (NICOL et al., 2000). Além disso, a fibrilarina desempenha um papel essencial para o desenvolvimento precoce embrionário (NEWTON et al., 2003).

## **1.6. O corpo cromatóide**

Toda célula germinativa animal possui um conjunto de material citoplasmático conhecido como “nuance”. Em células germinativas masculinas, esse material é mais comumente referido como corpo cromatóide (PARVINEM, 2005). O corpo cromatóide (CB) é uma organela citoplasmática específica de células reprodutivas (YOKOTA, 2008). Diversos autores sugerem o papel do CB como um coordenador subcelular de diferentes vias de processamento do RNA, centralizando o controle pós-transcricional do RNAm no citoplasma de células haploides germinativas (PARVINEM, 2005; KOTAJA et al., 2006; KOTAJA;

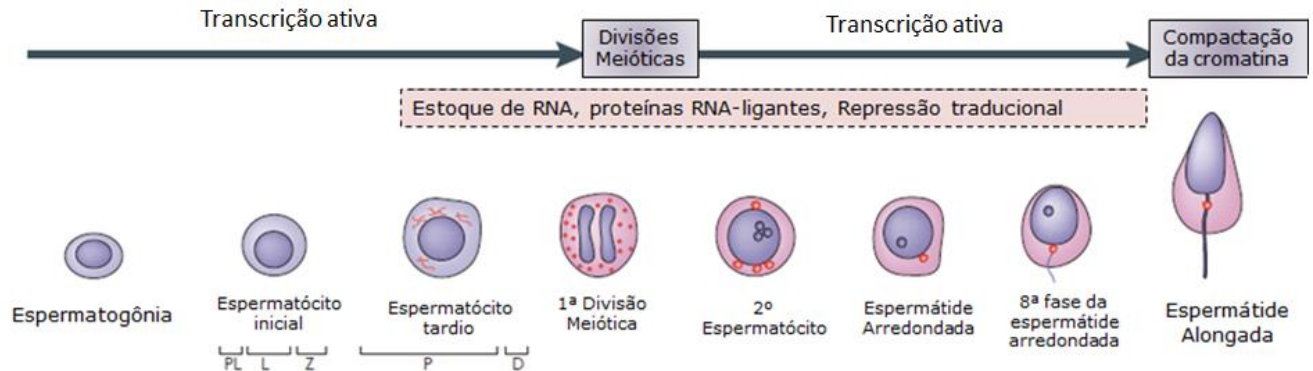
SASSONE-CORSI, 2007) (Figura 4). Alguns dos componentes moleculares que formam o CB, como DNase, RNase, AcPs, ubiquitina e HSP70, tem sido implicados na função dessa estrutura como sítio de degradação, onde proteínas, DNA e RNAs que não são mais necessários para o processo de espermatogênese são degradados (HARAGUCHI et al., 2005).

Em machos, acredita-se que essa organela tenha um papel fundamental na espermiogênese, atuando na comunicação celular entre espermátides e auxiliando na formação do acrossomo (ALEVI et al., 2013). A localização dessa organela se dá em uma posição estratégica próxima ao envoltório nuclear, corroborando a hipótese da participação dessa estrutura no controle do processo espermatogênico, por meio de mecanismos pós-transcricionais (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007; NAGAMORI; SASSONE-CORSI, 2008). Em 1907, essa organela foi descrita pela primeira vez na classe Insecta (SCHAFER, 1907).

Até o momento, essa organela já foi relatada para os gêneros *Triatoma* (SILISTINO-SOUZA et al., 2012; BORGUETI et al., 2015) e *Rhodnius* (ALEVI et al., 2016a), sendo encontrada nas espermátides das espécies estudadas. Porém, a sua origem ainda permanece incerta. Alguns autores suportam a hipótese da sua origem a partir de um produto nuclear que atravessou o complexo de poros para o citoplasma (PARVINEN; PARVINEN, 1979; PARVINEN et al., 1997). Já outros acreditam que seu surgimento se deu pelo acúmulo de material do citoplasma inter-mitocondrial das espermátides (FAWCETT et al., 1970) ou, ainda, a partir de produtos mitocondriais liberados no citoplasma celular (REUNOV et al., 2000). Atualmente, existe o suporte da teoria de que o CB trata-se de uma estrutura derivada da fragmentação e migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma (COMINGS; OKADA, 1972; PERUQUETTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 2009; PERUQUETTI et al., 2008, 2010).

Silistino-Souza et al. (2012) corroboraram essa teoria recente de derivação nucleolar ao identificar, pela primeira vez, a proteína fibrilarina como um dos componentes do CB em células espermatogênicas de triatomíneos. Os autores propõem que a presença da fibrilarina seja derivada da fragmentação nucleolar e migração de algumas de suas proteínas para o citoplasma das células germinativas masculinas desses indivíduos. Borgueti e colaboradores (2015) relataram a presença dessa proteína nos nucléolos de espermatogônias, sugerindo que a formação do CB inicia-se ainda durante a espermatocitogênese. Além disso, os autores corroboraram a hipótese de inativação nucleolar durante a espermiogênese dos triatomíneos (ALEVI et al., 2014b), pois durante essa fase da meiose não foi possível observar marcação pela fibrilarina no nucléolo das espermátides, apenas no CB. Assim, espera-se que a formação

do corpo cromatóide esteja envolvida com a atividade transcricional do nucléolo persistente durante a fase de espermatogênese.



**Figura 4. Representação esquemática da atividade transcricional e surgimento do corpo cromatóide durante a espermatogênese em ratos.** A regulação transcricional positiva durante a espermatogênese encontra-se associada com o crescimento mitótico das espermatogônias, início da meiose e a entrada na maturação celular pós-meiótica. Após a meiose, a transcrição permanece ativa até o silenciamento do genoma haploide das células masculinas germinativas devido à substituição de histonas por protaminas. Devido a essa significativa inibição da transcrição em estágios tardios da maturação celular, a estocagem de RNAm e regulação traducional por proteínas RNA-ligantes possuem um importante papel no controle da síntese de várias proteínas das espermátides e espermatozoides. O material que irá originar a organela corpo cromatóide aparece pela primeira vez durante o paquíteno tardio dos espermatócitos, anterior à primeira divisão meiótica, na forma de estruturas fibrosas intermitocondriais (em vermelho), que se dispersam ao longo da meiose. O CB é condensado até a sua forma final imediatamente após a meiose, permanecendo como uma estrutura distinta no citoplasma de espermátides arredondadas. Este diminui o seu tamanho e, posteriormente, desaparece nas espermátides em alongação. D: diplóteno; L: leptóteno; P: paquíteno; PL: pré-leptóteno; Z: zigóteno (Adaptada de KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007).

### 1.7. Principais espécies analisadas

A espécie *Triatoma infestans* (Klug, 1834), de cariótipo  $2n = 22$  (20A + XY) em machos, é considerada quase exclusivamente domiciliar, com populações silvestres arborícolas e rupestres encontradas na Bolívia. Possui uma alta importância vetorial, sendo considerado o principal vetor do *T. cruzi* para os humanos no Brasil. Em 1975, o Ministério

da Saúde do Brasil lançou um intenso programa de controle da doença de Chagas, direcionado primariamente a essa espécie. Como resultado, em 2006, a Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul, da OMS, certificou formalmente que a transmissão pelo vetor foi oficialmente erradicada (FERREIRA; SILVA, 2006; GONÇALVES et al., 2012). Assim, sua distribuição atual compreende raros focos residuais no Rio Grande do Sul e na Bahia, em virtude do sucesso dos programas de controle. Fora do Brasil, tem ampla distribuição na América Latina, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai (GALVÃO, 2015).

Com sua distribuição voltada para a região de Rondônia, *Rhodnius montenegrensis* (ROSA et al., 2012), de cariótipo  $2n = 22$  ( $20A + XY$ ) em machos, é uma espécie que tem como habitat as palmeiras da espécie *Orbignya phalerata*, popularmente conhecida como babaçu. O epíteto *montenegrensis* é uma referência ao município de Montenegro, Estado de Rondônia, onde os espécimes foram coletados (GALVÃO, 2015).

*Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), de cariótipo  $2n = 21$  ( $18A + X_1X_2Y$ ) em machos, foi à espécie na qual Carlos Chagas encontrou o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Seu habitat inclui diversas palmeiras, refúgios de roedores, edentados, marsupiais e morcegos, ninhos de aves, ocos de árvores, galinheiros, domicílios e diversas estruturas peridomiciliares. Sua ampla distribuição no Brasil inclui diferentes estados como Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará (registro histórico), Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe e Tocantins. Fora do Brasil, a espécie é encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai.



**Figura 5.** Exemplos das espécies *Triatoma infestans* (A), *Rhodnius montenegrensis* (B) e *Panstrongylus megistus* (C), e suas respectivas distribuições no Brasil (Adaptado de JURBERG et al., 2014).

Dessa forma, descrever a nucleologênese de novas espécies e novos gêneros e, principalmente, avaliar se o material nucleolar que persiste nesses insetos, durante a meiose, apresenta atividade transcricional é de extrema importância para auxiliar na compreensão dos fenômenos reprodutivos desses vetores, uma vez que este possa estar associado com a formação da organela corpo cromatóide, descrita recentemente para os triatomíneos.

O controle das populações de vetores é considerado como a principal forma de minimizar a incidência de novos casos chagásicos, sendo os estudos relacionados com os triatomíneos de extrema importância para a saúde pública, uma vez que podem gerar subsídios para auxiliar os programas de controle de vetores na profilaxia da doença de Chagas.



## Objetivos

---

## II. OBJETIVOS

a) Descrever a nucleologênese de diferentes espécies incluídas em sete gêneros (*Cavernicola*, *Psammolestes*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Meccus*, *Mepraia* e *Nesotriatoma*), por meio de impregnação por íons prata, com o intuito de analisar se a persistência nucleolar é uma sinapomorfia da subfamília Triatominae.

b) Analisar a atividade nucleolar durante a meiose das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius montenegrensis* e *Panstrongylus megistus* por meio do Fluorocromo *Acridine Orange*, a fim de caracterizar, pela presença de RNA, se o material nucleolar que persiste durante a meiose apresenta atividade transcricional.



### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção, procedência e escolha das espécies

Pelo menos dez exemplares machos adultos de cada espécie foram cedidos pelo “Insetário de Triatominae”, instalado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara, São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. João Aristeu Rosa; pelo Insetário do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, instalado na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, coordenado pelo Dr. José Jurberg; e pelo Insetário do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, instalado no CPqRR/FIOCRUZ, Minas Gerais, coordenado pela Dra. Liléia Diotaiuti, sendo todos os coordenadores também colaboradores do presente projeto.

Para verificar o fenômeno de persistência nucleolar foram analisadas 59 espécies, distribuídas em dez gêneros, sendo que sete gêneros e 36 espécies nunca haviam sido descritas na literatura anteriormente (Tabela 2).

As espécies analisadas pela coloração com o fluorocromo *Acridine Orange* (*T. infestans*, *R. montenegrensis* e *P. megistus*) foram escolhidas de acordo com os resultados iniciais, que demonstraram que todas as espécies apresentam o mesmo padrão de comportamento nucleolar durante a espermatogênese. Além disso, os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são considerados epidemiologicamente os mais importantes da subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

**Tabela 2.** Gêneros e respectivas espécies de triatomíneos nos quais o fenômeno de persistência nucleolar foi analisado e descrito no presente estudo.

Gêneros	Espécies
<i>Cavernicola</i>	<i>Cavernicola pilosa</i>
<i>Dipetalogaster</i>	<i>Dipetalogaster maxima</i>
<i>Eratyrus</i>	<i>Eratyrus cuspidatus</i>
<i>Meccus</i>	<i>Meccus pallidipennis</i>
	<i>Meccus longipennis</i>
<i>Mepraia</i>	<i>Mepraia spinolai</i>
<i>Nesotriatoma</i>	<i>Nesotriatoma bruneri</i>
<i>Triatoma</i>	<i>Triatoma arthurneivai</i>
	<i>Triatoma baratai</i>
	<i>Triatoma brasiliensis</i>
	<i>Triatoma brasiliensis macromelasoma</i>
	<i>Triatoma carcavalloii</i>
	<i>Triatoma circummaculata</i>

	<i>Triatoma costalimai</i>
	<i>Triatoma delpontei</i>
	<i>Triatoma dimidiata</i>
	<i>Triatoma garciabesi</i>
	<i>Triatoma guasayana</i>
	<i>Triatoma guazu</i>
	<i>Triatoma infestans*</i>
	<i>Triatoma juazeirensis</i>
	<i>Triatoma jurbergi</i>
	<i>Triatoma klugi*</i>
	<i>Triatoma lectularia</i>
	<i>Triatoma lenti*</i>
	<i>Triatoma maculata</i>
	<i>Triatoma matogrossensis</i>
	<i>Triatoma melanica</i>
	<i>Triatoma melanocephala*</i>
	<i>Triatoma melanosoma*</i>
	<i>Triatoma petrochiae</i>
	<i>Triatoma platensis*</i>
	<i>Triatoma protracta*</i>
	<i>Triatoma pseudomaculata</i>
	<i>Triatoma pintodiasi</i>
	<i>Triatoma rubrovaria</i>
	<i>Triatoma sherlocki</i>
	<i>Triatoma sórdida</i>
	<i>Triatoma tibiamaculata*</i>
	<i>Triatoma vandae*</i>
	<i>Triatoma vitticeps*</i>
	<i>Triatoma williami*</i>
	<i>Triatoma wygodzinskyi*</i>
<i>Panstrongylus</i>	<i>Panstrongylus lignarius*</i>
	<i>Panstrongylus megistus*</i>
<i>Psammolestes</i>	<i>Psammolestes tertius</i>
<i>Rhodnius</i>	<i>Rhodnius brethesi</i>
	<i>Rhodnius colombiensis*</i>
	<i>Rhodnius domesticus*</i>
	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>
	<i>Rhodnius milesi</i>
	<i>Rhodnius montenegrensis*</i>
	<i>Rhodnius nasustus*</i>
	<i>Rhodnius neglectus*</i>
	<i>Rhodnius neivai*</i>
	<i>Rhodnius pallescens*</i>
	<i>Rhodnius pictipes*</i>
	<i>Rhodnius prolixus*</i>
	<i>Rhodnius robustus*</i>
	<i>Rhodnius stali</i>

\*Espécies com a nucleologênese já descrita na literatura

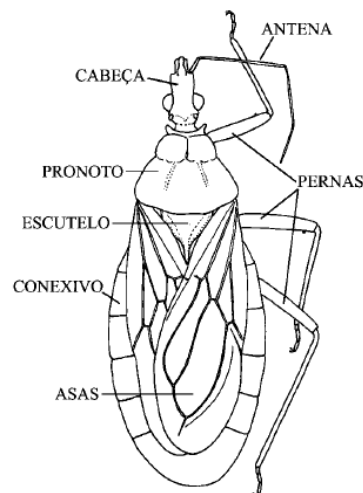
### 3.2. Órgão analisado

Foram analisados os túbulos seminíferos de pelo menos dez machos de cada espécie de triatomíneo. Foram escolhidos para estudo os testículos de machos adultos, pois a espermatogênese dos indivíduos da ordem Hemiptera continua na fase adulta, onde se podem observar os diferentes estágios da espermatogênese (espermatocitogênese, meiose e espermiogênese).

Os triatomíneos apresentam um número fixo de sete túbulos seminíferos, de diferente composição de acordo com o gênero. Machos do gênero *Rhodnius* apresentam cinco túbulos curtos e dois longos; os do gênero *Triatoma* possuem três curtos, dois médios e dois longos; e em *Panstrongylus* os sete túbulos possuem tamanho uniforme (SCHREIBER et al., 1968).

### 3.3. Processamento do material biológico

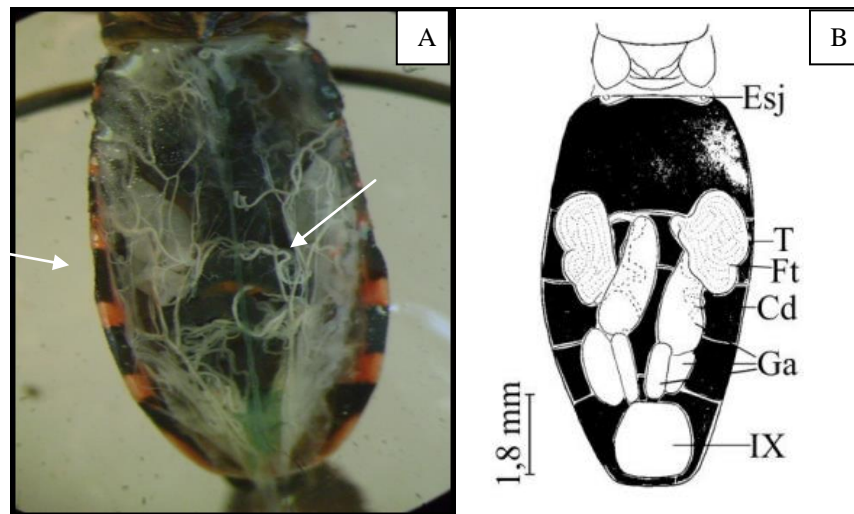
Inicialmente os insetos foram adormecidos em congelador e, posteriormente, fixados com alfinetes pela região posterior do cefalotórax (escutelo), em uma placa de Petri contendo parafina sólida. Para facilitar o acesso aos testículos, as asas e os membros locomotores foram retirados com o auxílio de uma pinça. Sob o microscópio estereoscópico, as laterais do abdome e os conexivos foram cortados com uma tesoura pontiaguda. A região antero-dorsal do exoesqueleto abdominal foi parcialmente retirada, expondo o interior da região abdominal. A fim de prosseguir com a retirada dos testículos, gotejou-se solução fisiológica (Demerec) sob o abdome exposto, sendo então retirado o par de testículos, localizados na porção anterior do hemocelo (Figura 6).



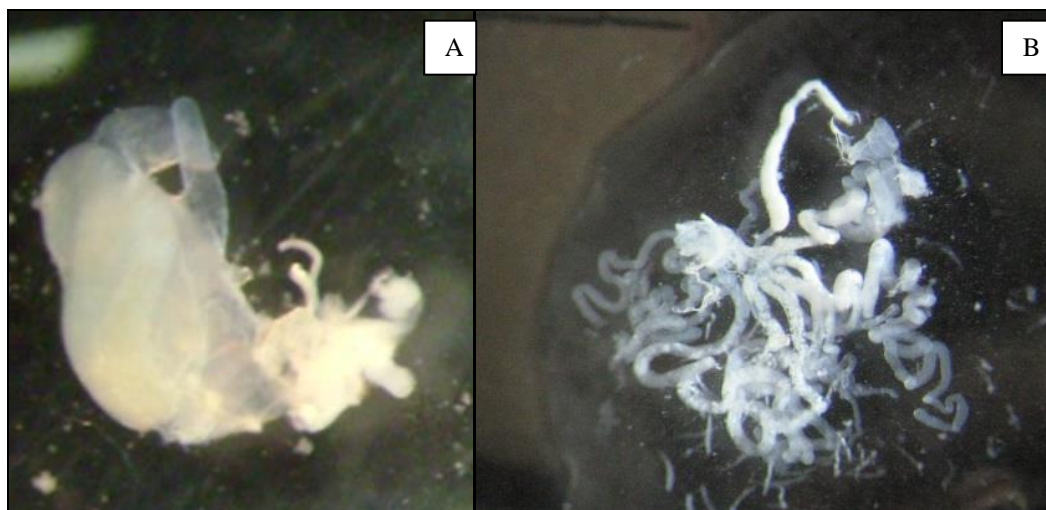
**Figura 6.** Vista dorsal de um triatomíneo (JURBERG et al., 2014).

### 3.4. Fixação dos túbulos seminíferos

Após a dissecação, os testículos (Figura 7) foram transportados para a solução fisiológica (Demerec), onde foi realizada a limpeza e individualização dos túbulos seminíferos (Figura 8). Posteriormente, cada testículo foi colocado em um recipiente de vidro contendo três partes de metanol para uma de ácido acético (3:1), e conservado no freezer à -20°C.



**Figura 7.** Abdome de um triatomíneo exposto (A) para a retirada dos testículos (setas). Esquema de um abdome de *Mepraia spinolai* dissecado (B) (Esl, espiráculo; T, testículo; Ft, folículos testiculares; Cd, canal deferente; Ga, glândula acessória; IX, pigóforo ou 9º segmento abdominal) (JURBERG et al., 2014).



**Figura 8.** Testículo retirado do abdome (A) e túbulos seminíferos individualizados (B).

### 3.5. Preparo usual das lâminas

Os túbulos seminíferos foram retirados da solução fixadora e colocados em uma lâmina limpa, onde foram realizados dois banhos de água destilada, por cinco minutos cada. Posteriormente, é acrescentada uma gota de ácido acético 45%, durante 10 minutos. Após esse período, o túbulo seminífero é dilacerado e, sobre esse material, é colocada uma lamínula para a realização do esmagamento celular. A remoção da lamínula ocorreu em nitrogênio líquido, com o auxílio de um estilete.

### 3.6. Técnicas citogenéticas convencional e molecular

#### 3.6.1. Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980)

**Princípio da técnica:** A técnica impregnação por íons prata é um dos métodos clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), nos cromossomos metafásicos, e das áreas nucleolares, nos núcleos interfásicos. A prata tem afinidade às proteínas associadas ao RNAr transcrito nos sítios de DNAr, tanto naqueles transcricionalmente ativos quanto naquelas que já transcreveram, sendo as proteínas B23 (numatrina) e C23 (nucleolina) as principais proteínas nucleolares a se impregnar. Enquanto a C23 indica a presença da cromatina descondensada ligada à RON, a B23 indica a localização dos precursores ribossomais (OCHS; BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999). Diante disso, a aplicação da técnica de impregnação por íons prata permite o estudo da nucleologênese nos eucariotos.

#### 3.6.2. Fluorocromo Acridine Orange (VIDAL, 1987)

**Princípio da técnica:** O fluorocromo Acridine Orange ou Alaranjado de Acridina é um corante metacromático, o qual fornece emissões fluorescentes de diferentes cores para DNA e RNA. Ao se ligar eletrostaticamente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA fita simples), esse fluorocromo produz uma coloração vermelha, mas quando intercalado com a dupla-hélice do DNA, gera uma coloração verde/amarela fluorescente quando excitado por luz azul.



### 3.7. Forma de análise dos resultados

Os materiais submetidos à técnica de impregnação por íons prata foram analisados ao microscópio de luz *Jenaval* (Zeiss), acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de imagens *Axio Vision LE 4.8* (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH), com aumento de 1000 vezes. Os materiais submetidos à técnica citogenética molecular de *Acridine Orange* foram analisados em microscopia confocal a laser (ZEISS LSM 710, 2010), no Centro de Microscopia e Microanálise (UNESP/IBILCE, Câmpus de São José do Rio Preto/SP), sob a supervisão da Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior.



## IV. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de três artigos.

### 4.1. Artigo I (Publicado na revista **Genetics and Molecular Research**)

MADEIRA, F. F.; LIMA, A. C. C.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA. M. T. V.; ALEVI, K. C. C. Nucleolar persistence phenomenon during spermatogenesis in genus *Meccus* (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 01, 2016.

#### **Nucleolar persistence phenomenon during spermatogenesis in genus *Meccus* (Hemiptera, Triatominae)**

Fernanda Fernandez Madeira, Anna Claudia Campaner Lima, João Aristeu Rosa, Maria Tercília Vilela Azeredo Oliveira and Kaio Cesar Chaboli Alevi

#### **ABSTRACT**

The Triatominae subfamily consists of 150 species in 18 genera, grouped into six tribes. In cytogenetics, triatomines are important biological models because they have holocentric chromosomes and nucleolar persistence in meiosis. The phenomenon of nucleolar persistence has been described for 23 species of triatomine in three genera: *Triatoma*, *Rhodnius*, and *Panstrongylus*. However, new species and genera should be analyzed to assess whether nucleolar persistence is a peculiarity of Triatominae. Thus, this study aimed to analyze nucleolar behavior during spermatogenesis of *Meccus pallidipennis* and *M. longipennis*, focusing on the nucleolar persistence phenomenon. Through the analysis of spermatogenesis, more specifically of meiotic metaphase, we observed the phenomenon of nucleolar persistence in *M. pallidipennis* and *M. longipennis*, represented by remnants of nucleolar material in metaphase. Thus, although nucleologeneses of new species, and, especially, new genera, should be analyzed, this study confirms for the first time the phenomenon of nucleolar persistence in the genus *Meccus*. Therefore, we emphasize the importance of new studies in this area in order to assess whether this phenomenon is truly a synapomorphy of these hematophagous insects.

## INTRODUCTION

The triatomines (Hemiptera: Reduviidae) are included in the subfamily Triatominae (Lent and Wygodzinsky, 1979). To date, 150 species in 18 genera have been described (Alevi et al., 2015a). The importance of the triatomines in parasitology is due to these insects being transmitters of the etiologic agent of Chagas disease, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1996), a flagellate parasite that infects many mammals, including humans (Dias et al., 2002).

In cytogenetics, triatomines are important biological models because they have holocentric chromosomes, which have diffuse kinetochores. Furthermore, these insects also undergo an unusual form of meiosis in which the segregation of sex chromosomes is post-reductional (Barth, 1956; Ueshima, 1966). In addition, these insects have nucleolar persistence during spermatogenesis (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999). Chromosome data are being applied in the taxonomy of these vectors (Alevi et al., 2013a, 2013b, 2013c, 2014a, 2014b, 2015b, 2015c).

Nucleolar persistence is defined by the presence of the nucleolus or nucleolar corpuscles during meiotic metaphase. This phenomenon has been described for 23 species of triatomine within the genera *Triatoma* (Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira 2005; Severi-Aguiar et al., 2006; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2007; Bardella et al., 2008; Costa et al. 2008; Alevi et al. 2013d; Borguetti et al., 2015; Pereira et al., 2015), *Rhodnius* (Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2007; Alevi et al., 2014c), and *Panstrongylus* (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999). However, new species and genera should be analyzed to assess whether nucleolar persistence is really a peculiarity of the Triatominae subfamily.

The genus *Meccus* was proposed for *Conorhinus phyllosoma*. By means of the cladodios, the rostrum, and the insertion of antennae, *Meccus* was considered synonymous with *Triatoma* (Pinto, 1927). After conducting laboratory studies, Mazzotti and Osorio (1942) proposed that three species of *Triatoma* should be considered as subspecies of *T. phyllosoma*. On the basis of unequal size in respect to *Triatoma* species, Carcavallo et al. (2000) proposed revalidation of the genus *Meccus*. The proposed revalidation of the genus was confirmed by Hypsa et al. (2002) based on molecular systematics. Currently the genus consists of six species, *M. phyllosomus*, *M. pallidipennis*, *M. picturatus*, *M. longipennis*, *M. mazzotti*, and *M. bassolsae* (Galvão et al., 2003).

*Meccus longipennis* is considered the main species of the *Meccus* complex and is responsible for the transmission of *T. cruzi* in West Mexico (Lozano-Kasten et al., 2008). This

species is founded in both domestic and wild ecotopes (WHO, 2002; Martínez-Ibarra et al., 2003) and presents a high capacity to colonize human dwellings (Espinoza-Gómez et al., 2002). *Meccus pallidipennis* is also considered to be an important vector of Chagas disease, since it is responsible for 74% of the vectorial transmission to humans in Mexico (Ibarra-Cerdeña et al., 2009). Its distribution has been associated with different degrees of invasion in human dwellings (Ramsey et al., 2003; Martínez-Ibarra et al., 2011).

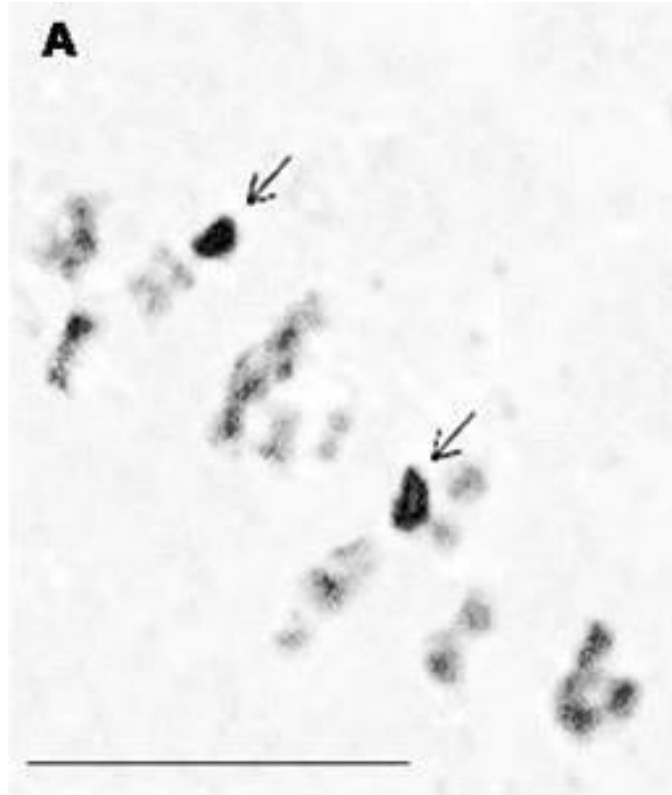
Thus, in order to evaluate whether nucleolar persistence is a peculiarity of the Triatominae subfamily, the aims of present study were to analyze nucleolar behavior during spermatogenesis of *M. pallidipennis* and *M. longipennis*, focusing on the phenomenon of nucleolar persistence.

## **MATERIAL and METHODS**

Seminiferous tubules of five adult males of *M. pallidipennis* and *M. longipennis* (from the "Triatominae Insectarium" installed in Araraquara city, Sao Paulo, Brazil), after being shredded, squashed, and fixed on a cover slip in liquid nitrogen, were stained by silver ion impregnation (Howell and Black, 1980). The biological material was analyzed with a Jenaval light microscope coupled to a digital camera and an image analyzer Axio Vision LE 4.8 (Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H). The images were magnified by a factor of 1000X.

## **RESULTS**

Through the analysis of spermatogenesis, more specifically, of the meiotic metaphase, we observed nucleolar persistence in *M. pallidipennis* (Figure 1) and *M. longipennis*, which was represented by remnants of nucleolar material in metaphase (Figure 1, arrow).



**Figure 1.** Metaphase I of *Meccus pallidipennis*. Note the nucleolar persistence (arrow). Bar: 10  $\mu$ m.

## DISCUSSION

Spermatogenesis consists of three different phases: spermatocytogenesis, which is a phase of proliferation; meiosis, which is the multiplication phase; and spermiogenesis, which is the differentiation phase (Johnson et al., 1997). Both species of *Meccus* analyzed (*M. pallidipennis* and *M. longipennis*) presented the phenomenon of nucleolar persistence during meiosis. It is believed that the persistence of the nucleolus or nucleolar remnants during meiosis in triatomines is an important transcription factor that accumulates mRNA in the cytoplasm or in the formation of a chromatoid body (CB) (Borgueti et al., 2015).

Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira (2005) and Alevi et al. (2014d) showed that the nucleolus, although present during spermiogenesis in insects, is inactivated by epigenetic factors. Recently, Silistino-Souza et al. (2012) and Borgueti et al. (2015) described the cytoplasmic organelle CB in the triatomines. Thus, although further studies should be conducted, we believe that the entire mRNA transcript is stored in the CB during nucleolar persistence in meiosis, and that this organelle is responsible for the differentiation of spermatids to sperm cells (Alevi et al., 2014d; Borgueti et al., 2015).

Thus, although nucleologenesis of new species, and, especially, new genera, should be analyzed, this study confirms for the first time the phenomenon of nucleolar persistence in the genus *Meccus*. Therefore, we emphasize the importance of new studies in this area in order to assess whether this phenomenon is truly a synapomorphy of these hematophagous insects.

## REFERENCES

Alevi KCC, Borsatto KC, Moreira FFF, Jurberg J, et al. (2015c). Karyosystematics of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*. 3994: 433-438.

Alevi KCC, Castro NFC, Lima ACC, Ravazi A, et al. (2014c). Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). *Cell Biol. Int.* 38: 977-980

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Guerra AL, et al. (2013b). Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira and Barata (2002). *Infect. Gen. Evol.* 13: 301-303.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013a). Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). *Inv. Rep. Dev.* 58: 9-12.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013c). Spermatogenesis in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera: Triatominae). *Genet. Mol. Res.* 12: 4944-4947.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013d). Análise das Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 34: 417-421.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2014d). Is there post-meiotic transcriptional activity during hemipteran spermiogenesis? *Inv. Rep. Dev.* 58: 9-12.

Alevi KCC, Moreira FFF, Jurberg J and Azeredo-Oliveira MTV (2015a). Description of diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.*, in press.

Alevi KCC, Oliveira J, Moreira FFF, Jurberg J, et al. (2015b). Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the Matogrossensis and Rubrovaria subcomplexes. *Inf. Genet. Evol.* 33: 158-162.

Alevi KCC, Pereira NP, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MTV (2014a). Distribution of constitutive heterochromatin in *Triatoma melanocephala* (Hemiptera, Triatominae) *Gen. Mol. Res.* 13: 7899-7903.

Alevi KCC, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MT (2014b). Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 3838: 583-589.

Bardella VB, Azeredo-Oliveira MTV and Tartarotti E (2008). Cytogenetics analysis in spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). *Gen. Mol. Res.* 7: 326-335.

Barth R (1956). Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). VI parte: Estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 54: 599-616.

Borgueti AO, Alevi KCC, Silistino-Souza R, Rosa JA, et al. (2015). Immunofluorescence and ultrastructural analysis of the chromatoid body during spermatogenesis of *Triatoma platensis* and *T. rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae). *Micron* 74: 44-46.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, et al. (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entom. Vect.* 7: 1-99.

Costa LC, Azeredo-Oliveira MTV and Tartarotti E (2008). Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). *Genet. Mol. Biol.* 31: 438-444.



Dias JCP (2002). Controle da doença de Chagas no Brasil: El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América, In: Silveira AC editor., Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, 145-250.

Espinoza-Gómez F, Maldonado-Rodríguez A, Coll-Cárdenas R, Hernández-Suárez CM, et al. (2002). Presence of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and risk of transmisión of Chagas disease in Colima, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 25-30.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS and Jurberg J (2003). A checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 202: 1-36.

Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-15.

Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, et al. (2002). Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23: 447-457.

Ibarra-Cerdeña CN, Sánchez-Cordero V, Townsend-Peterson A and Ramsey JM (2009). Ecology of North American Triatominae. *Acta Trop.* 110: 178-186.

Johnson L, Blanchard TL, Varner DD and Scrutchfield WL (1997). Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* 48: 1199-1216.

Lent H and Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bul. Am. Mus. Nat. Hist.* 163:123-520.

Lozano-Kasten F, Magallon-Gastelum E, Soto-Gutierrez M, Kasten-Monges M, et al. (2008). Epidemiologic knowledge and current situation of Chagas disease in the state of Jalisco, Mexico. *Salud Publica Mex.* 50: 508-515.

Martínez-Ibarra JA, Bárcenas-Ortega NM, Noguera-Torres B, Ramírez-Vallejo P, et al. (2000). Genetic variability among populations of *Triatoma longipennis*, vector of Chagas disease in Western Mexico. *South-west Entomol.* 28: 145-151.

Martínez-Ibarra JA, Grant-Guillén Y and Martínez-Grant DM (2003). Feeding, defecation and development times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 899-903.

Martínez-Ibarra JA, Valencia-Navarro I, León-Saucedo S, Ibáñez-Cervantes G, et al. (2011). Distribution and infection by *Trypanosoma cruzi* of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the state of Michoacan, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106: 445- 450.

Mazzotti L and Osório MT (1942). Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. *Rev. Mex. Med.* 412: 215-222.

Morielle A and Azeredo-Oliveira MTV (2004). Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia* 57: 31-37.

Morielle-Souza A and Azeredo-Oliveira MTV (2007). Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Gen. Mol. Res.* 6: 713-720.

Pereira NP, Alevi KCC, Mendonça PP and Azeredo-Oliveira MTV (2015). Spermatogenesis and nucleolar behavior in *Triatoma vanda* and *Triatoma williamsi* (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.* 14: 12145-12151.

Pinto C (1927). Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduvidioidea). *Bol. Biol.* 8: 103-114.

Ramsey JM, Ordóñez R, Tello-López A, Pohls JL, et al. (2003). Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. In: Iniciativa para la vigilancia y el

control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana (Ramsey JM, López AT and Pohls JL Eds.). Cuernavaca, México, Instituto Nacional de Salud Pública, 85-103.

Severi-Aguiar GDC and Azeredo-Oliveira MT (2005). Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. *Caryologia*. 58: 293-299.

Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC and Azeredo-Oliveira MTV (2006). Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141-151.

Silistino-Souza R, Peruquetti RL, Taboga SR and Vilela Azeredo-Oliveira MT (2012). Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Micron*. 43: 954-960.

Tartarotti E and Azeredo-Oliveira MTV (1999). Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia*. 52: 177-184.

Tavares MG and Azeredo-Oliveira MTV (1996). Aspectos biológicos e médico sanitários dos triatomíneos. *HB Cient*. 3: 137-144.

Ueshima N (1966). Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.

WHO - World Health Organization (2002). Control of Chagas' disease, Second Report of a WHO Expert Committee, 107.

**4.2. Artigo II** (Publicado na revista **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**)

MADEIRA, F. F.; BORSATTO, K. C.; LIMA, A. C. C.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K.C.C. Nucleolar Persistence: Peculiar Characteristic of Spermatogenesis of the Vectors of Chagas Disease (Hemiptera, Triatominae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1118-1120, 2016.

**Nucleolar persistence: peculiar characteristic of spermatogenesis of the vectors of Chagas disease (Hemiptera, Triatomine)**

Fernanda Fernandez Madeira, Kelly Cristine Borsatto, Anna Claudia Campaner Lima, Amanda Ravazi, Jader de Oliveira, João Aristeu da Rosa, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira and Kaio Cesar Chaboli Alevi

**Abstract**

All species of triatomines are considered potential vectors of Chagas disease and the reproductive biology of these bugs has been studied by different approaches. In 1999, nucleolar persistence during meiosis was observed in the subfamily for the first time. Recently, it has been observed that all species within the genus *Rhodnius* exhibit the same phenomenon, suggesting that it may be a synapomorphy of the triatomines. Thus, this article aims to analyze the nucleolar behavior during spermatogenesis of 59 triatomine species. All analyzed species exhibited nucleolar persistence during meiosis. Recently, it has been suggested that nucleolar persistence may be fundamental for the spermatogenesis of these vectors, since it is related to the formation of the chromatoid body. Therefore, we emphasize that this phenomenon is a peculiarity of the Triatominae subfamily and that further studies are required to analyze whether the nucleolar material that persists is active.

**Key Words:** nucleolus; meiosis, Triatominae subfamily

## Short Report

The Triatominae subfamily is composed of 150 species (148 living species and two fossils), grouped into 18 genera and five or six tribes. All triatomine species are considered potential vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease.<sup>1</sup>

Chagas disease is a neglected disease that has no cure. The main way to minimize the incidence of this disease in human populations is through vector control.<sup>1</sup> It is estimated that more than 5 million people are infected by *T. cruzi*, the parasite that causes Chagas disease, and that 70 million still live at risk, which places this illness among the most serious parasitic diseases in the world.<sup>1</sup> Thus, improving the knowledge on several fields on triatomine vector potentiality (such as ecology<sup>2</sup> and biology<sup>3</sup>) may provide important information for control measures.

The reproductive biology of these bugs has been studied by different approaches, such as cytogenetic,<sup>4</sup> structural,<sup>5</sup> and ultrastructural<sup>6</sup> analysis. Furthermore, the spermatogenesis of the triatomines is characterized as cystic,<sup>5,6</sup> and it has been suggested that, during imaginal molt (transition from the fifth instar nymph to adult), the cell division is disrupted, aiming to reduce energy costs, and the differentiation into sperm is stimulated to ensure the paternity of the adult male.<sup>7</sup>

In 1999, Tartarotti and Azeredo-Oliveira,<sup>8</sup> while studying the spermatogenesis of *Panstrongylus megistus* and *Panstrongylus herreri* (= *Panstrongylus lignarius*), noted that these triatomines exhibited a different nucleolar behavior than the one described for other eukaryotes: the nucleolus persisted during all stages of meiosis. The authors characterized this phenomenon as nucleolar persistence.

Recently, Alevi and others<sup>9</sup> have observed that all species within the genus *Rhodnius* feature nucleolar persistence during meiosis as well, and they suggested that analyses of the

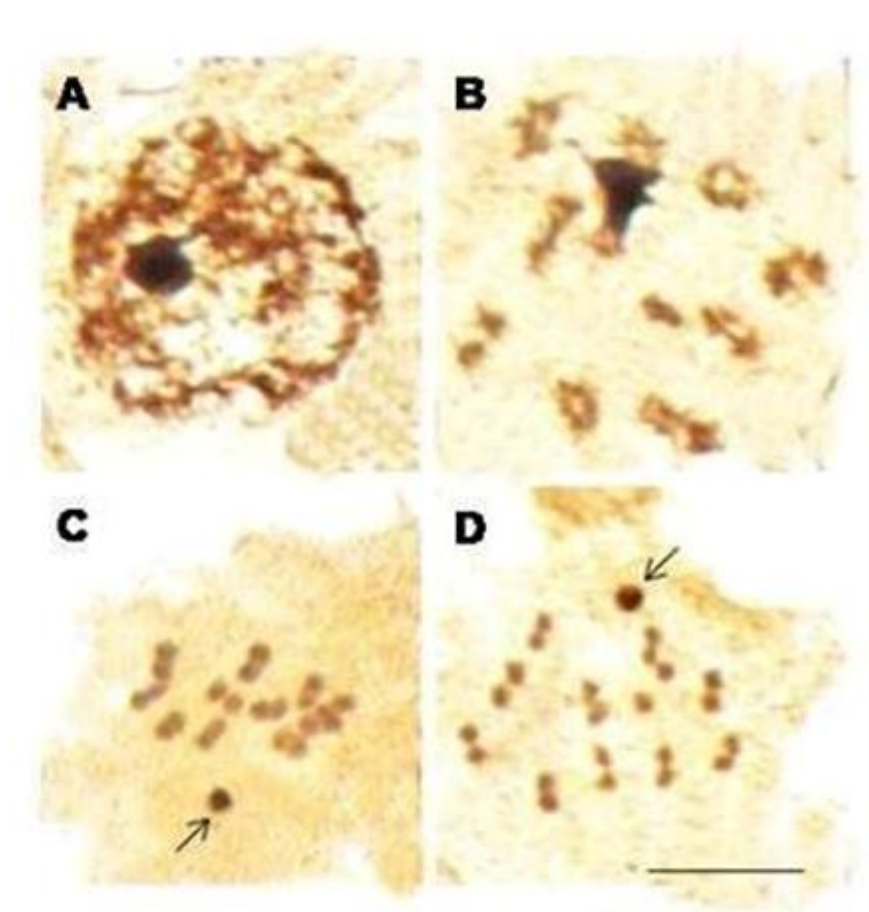
nucleolar behavior should be carried out in a large range of species of triatomines to examine whether that characteristic is a synapomorphy of the Triatominae subfamily.

Thus, this article aims to analyze the nucleolar behavior during spermatogenesis of 59 triatomine species to determine whether nucleolar persistence occurs in all bugs of the Triatominae subfamily.

We analyzed at least two adult male specimens of each species (*Cavernicola pilosa*, *Psammolestes tertius*, *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius colombiensis*, *Rhodnius domesticus*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Rhodnius milesi*, *Rhodnius montenegrensis*, *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius neivai*, *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius stali*, *Dipetalogaster maxima*, *Eratyrus cuspidatus*, *Meccus pallidipennis*, *Meccus longipennis*, *Mepraia spinolai*, *Nesotriatoma bruneri* (= *Nesotriatoma flavida*), *Panstrongylus lignarius*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma arthurneivai*, *Triatoma baratai*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma brasiliensis macromelasoma*, *Triatoma carcavalloi*, *Triatoma circummaculata*, *Triatoma costalimai*, *Triatoma delpontei*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma garciabesi*, *Triatoma guasayana*, *Triatoma guazu*, *Triatoma infestans*, *Triatoma juazeirensis*, *Triatoma jurbergi*, *Triatoma klugi*, *Triatoma lectularia*, *Triatoma lenti*, *Triatoma maculata*, *Triatoma matogrossensis*, *Triatoma melanica*, *Triatoma melanocephala*, *Triatoma petrochiae*, *Triatoma platensis*, *Triatoma protracta*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma pintodiasi*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma sherlocki*, *Triatoma sordida*, *Triatoma tibiamaculata*, *Triatoma vanda*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma williami*, *Triatoma wygodzinskyi*) that were provided by the “Insetário de Triatominae,” from Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil, and by the “Insetário do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos,” from Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. The bugs

were dissected, the testicles were removed, the slides were mounted through cell squashing, and stained through silver impregnation.<sup>10</sup>

The analysis of the nucleolar behavior during the meiosis of these bugs has highlighted that all species feature the nucleolar persistence phenomenon. Therefore, as the observed results were the same for all triatomines, we represent the nucleologenesis (Figure 1A–D) and the nucleolar persistence phenomenon (Figure 1C and D, arrow) with *D. maxima*. Our results are in agreement with the initial works carried out for the *Triatoma*,<sup>11–17</sup> *Meccus*,<sup>18</sup> *Rhodnius*,<sup>9,19</sup> and *Panstrongylus*<sup>9</sup> genera, which likewise have exhibited this phenomenon during spermatogenesis of these vectors.



**Figure 1:** Nucleologenesis of *Dipetalogaster maxima*. Note the nucleolar persistence phenomenon (arrow). Bar: 10  $\mu$ m.

Recently, it has been suggested that the nucleolar persistence can be essential for the spermiogenesis of these vectors, since during this differentiation stage, the nucleolus—although present - is inactive by epigenetic factors, and the chromatoid body (CB) is an essential organelle to supply all the transcriptional activity required for spermiogenesis.<sup>20</sup> Thus, it has been suggested that the nucleolus that persists during meiosis can be a structure responsible for forming the CB, because if it is active, all the transcribed RNA is directed to the formation of the CB.<sup>17</sup>

Therefore, we describe the nucleolar persistence as a synapomorphy of the triatomines and suggest that further analysis should be conducted to assess whether the persistent nucleolus is really active, thus clarifying the importance of the persistence of the nucleolus for spermatogenesis of these vectors of Chagas disease.

### **Acknowledgments**

The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process numbers 2013/19764-0 and 2015/14762-5 - FAPESP, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

### **References**

1. World Health Organization, 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Wkly Epidemiol Rec* 90: 33–44.
2. Almeida CE, Duarte R, Guerra do Nascimento R, Pacheco RS, Costa J, 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1127–1131.



3. Almeida CE, Folly-Ramos E, Agapito-Souza R, Magno-Esperança G, Pacheco RS, Costa J, 2005. *Triatoma rubrovaria* (Blanchart, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 231–235.
4. Alevi KCC, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2014. Spermatogenesis in *Triatoma melanica* Neiva and Lenti, 1941 (Hemiptera, Triatominae). *J Vector Ecol* 39: 231–233.
5. Alevi KCC, Castro NFC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Cystic spermatogenesis in three species of the prolixus complex (Hemiptera: Triatominae). *Ital J Zool (Modena)* 82: 172–178.
6. Morielle-Souza A, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2010. Ultrastructural analysis of the nucleolar aspects at spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Micron* 41: 791–796.
7. Alevi KCC, Guerra AL, Imperador CHL, Rosa JA, Azeredo- Oliveira MTV, 2016. Reproductive biology of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae) during the imaginal molt. *Am J Trop Med Hyg* 94: 689–690.
8. Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV, 1999. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 52: 177–184.
9. Alevi KCC, Castro NFC, Lima ACC, Ravazi A, Morielle-Souza A, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2014. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). *Cell Biol Int* 38: 977–980.
10. Howell WM, Black DA, 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014–1015.
11. Costa LC, Azeredo-Oliveira MTV, Tartarotti E, 2008. Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatomine, Heteroptera). *Genet Mol Biol* 31: 438–444.

12. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo- Oliveira MTV, 2013. Análise das possíveis regiões organizadoras nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. *Rev Cienc Farm Básica e Apl* 34: 417–421.
13. Bardella VB, Azeredo-Oliveira MTV, Tartarotti E, 2008. Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). *Genet Mol Res* 7: 326–335.
14. Severi-Aguiar GDC, Azeredo-Oliveira MTV, 2005. Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. *Caryologia* 58: 293–299.
15. Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC, Azeredo- Oliveira MTV, 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141–151.
16. Pereira NP, Alevi KCC, Mendonça PP, Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Spermatogenesis and nucleolar behavior in *Triatoma vanda* and *Triatoma williamsi* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res* 14: 12145–12151.
17. Borgueti AO, Alevi KCC, Silistino-Souza R, Rosa JA, Azeredo- Oliveira MTV, 2015. Immunofluorescence and ultrastructural analysis of the chromatoid body during spermatogenesis of *Triatoma platensis* and *T. rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae). *Micron* 74: 44–46.
18. Madeira FF, Lima ACC, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC, 2016. Nucleolar persistence phenomenon during spermatogenesis in genus *Meccus* (Hemiptera, Triatominae). *Genet Mol Res* 15. doi:10.4238/gmr.15017427.

19. Morielle A, Azeredo-Oliveira MTV, 2004. Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia* 57: 31–37.
20. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo- Oliveira MTV, 2014. Is there post-meiotic transcriptional activity during hemipteran spermiogenesis? *Invertebr Reprod Dev* 58: 193–198.

### 4.3. Artigo III (Manuscrito a ser submetido para a revista **Micron**)

#### **First evidences of transcriptional activity during the nucleolar persistent phenomenon in triatomines (Hemiptera, Triatominae)**

Fernanda Fernandez Madeira<sup>a</sup>, Kaio Cesar Chaboli Alevi<sup>a</sup>, Ana Letícia Guerra<sup>a</sup>, Nayara Fernanda da Costa Castro<sup>b</sup>, Patrícia Simone Leite Vilamaior<sup>b</sup>, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Cell Biology, Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, Sao Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho (UNESP/IBILCE), Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, Sao Paulo State University - Júlio de Mesquita Filho (UNESP/IBILCE), Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil.

**Keywords:** Nucleolar persistence, Spermatogenesis, Transcriptional activity, Triatomines

#### **ABSTRACT**

The subfamily Triatominae currently consists of 151 species, all of great importance for public health, since they are considered potential vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease. In addition to their epidemiological importance, these insects are considered important biological models for cell studies, since they have peculiar characteristics in their cells, such as the persistence of the nucleolus during meiosis. This phenomenon, first described in triatomines in 1999, is characterized by the presence of nucleolus or nucleolar corpuscles during all phases of meiosis. So far, this phenomenon has been described for 59 species of triatomines, distributed in ten genera. All the knowledge of this phenomenon is restricted to the presence of the nucleolus during meiosis, so the present work aimed to analyze if this persistent nucleolar material has transcriptional activity. The analysis of the meiotic metaphases of the species *Triatoma infestans*, *Rhodnius montenegrensis* and *Panstrongylus megistus* by the fluorochrome Acridine Orange made it possible to characterize the presence of RNA in the remaining nucleolar material. So, it was demonstrated for the first time that the nucleolar material persistent during triatomine meiosis

is transcriptionally active, supporting the hypothesis of a relationship between nucleolar persistence during the meiosis of these insects and the formation of the organelle chromatoid body, which is responsible for the support of all transcriptional activity during spermiogenesis.

## SHORT COMMUNICATION

The triatomines belong to the Hemiptera order, Heteroptera suborder, Reduviidae family and Subfamily Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). There are currently 151 species described in the subfamily Triatominae (149 valid species and two fossil species), comprised of 18 genera and five tribes (GALVÃO, 2014; ALEVI et al., 2016b; MENDONÇA et al., 2016; SOUZA et al., 2016), being all susceptible to infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) and thus considered as potential vectors of Chagas' disease (NOIREAU et al., 2009).

These vectors are important biological models for cell studies, as they present some peculiarities when compared to other eukaryotes, such as holocentric chromosomes with diffuse kinetochore, inverted meiosis for sex chromosomes and nucleolar persistence during meiosis (BARTH, 1956; UESHIMA, 1966; TARTAROTTI e AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

The phenomenon of nucleolar persistence is characterized by the presence of the nucleolus or nucleolar corpuscles during all phases of meiosis (ALEVI et al., 2014a). This nucleolar behavior is uncommon when compared to other eukaryotes, since in the nucleologenesis of eukaryotes the nucleolus fragments at the end of the prophase and is reorganized only at the end of the anaphase/beginning of the telophase (GONZÁEZ-GARCIA et al., 1995). This phenomenon has also been observed in several other organisms, such as carcinogenic embryonic cells (SHELDON et al., 1981), in mitosis of the parasite *Giardia lamblia* (LARA-MARTÍNEZ et al., 2016), meristematic mung bean cells (VAUGHAN and Braselton, 1985), and some aquatic species of Heteroptera (CASTANHOLE et al, 2008; PEREIRA et al, 2015).

To date, 59 species of triatomines, distributed in ten genera - *Cavernicola*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Meccus*, *Mepraia*, *Nesotriatoma*, *Psammolestes* (MADEIRA et al., 2016), *Rhodnius* (MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; ALEVI et al., 2014a), *Panstrongylus* (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) and *Triatoma* (SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; 2006; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; BARDELLA et al., 2008;

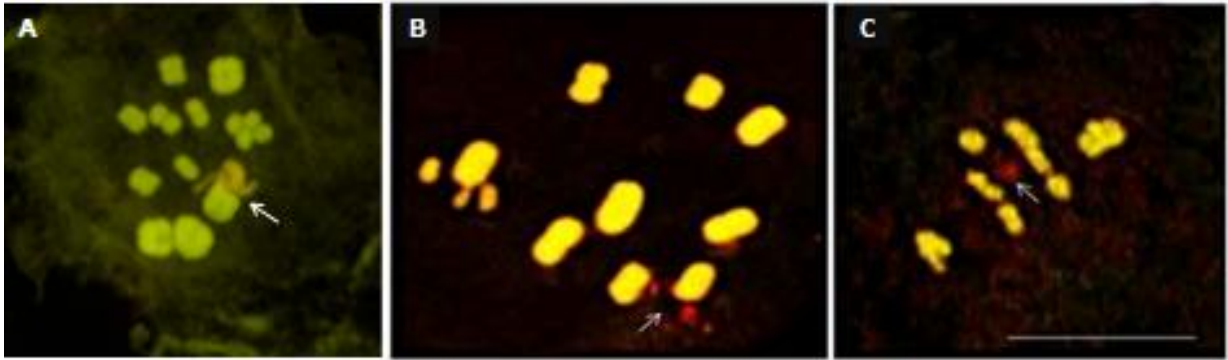
COSTA et al., 2008; ALEVI et al., 2013b; IMPERADOR et al., 2015; PEREIRA et al., 2015) - had their nucleogenesis described and presented this phenomenon during meiosis, confirming the nucleolar persistence as a synapomorphy of the subfamily Triatominae (MADEIRA et al., 2016).

All studies in the literature involving the nucleolar persistence phenomenon in triatomines are mainly focused on the nucleolar behavior during meiosis and are performed by the silver ion impregnation cytogenetic technique, since silver has affinity for the nucleolar proteins C23 (Nucleolin) and B23 (Numatrine) (HOWEL and BLACK, 1980). Thus, as the knowledge of this phenomenon during meiosis is restricted only to the presence of the nucleolus, this study aimed to evaluate if the persistent nucleolar material is in transcriptional activity.

As all triatomine species studied so far showed nucleolar persistence (MADEIRA et al., 2016), five adult males belonging to three genera of triatomines (*Triatoma infestans*, *Rhodnius montenegrensis* and *Panstrongylus megistus*) were used to represent the subfamily Triatominae, once that these genera are considered the most important epidemiologically (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

The species were supplied by the "Insetário de Triatominae", installed in the Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), Araraquara, São Paulo. After separation and fixation of the seminiferous tubules, slides with the biological material were prepared by cellular squashing technique and stained with the fluorochrome Acridine Orange (VIDAL, 1987), which allows the distinction between DNA in green/yellow and RNA in red. The images were obtained by laser confocal microscopy (ZEISS LSM 710, 2010), increasing by 63x.

Through the analysis of the meiotic metaphases, it was possible to characterize the presence of RNA (Figures 1A, B - arrows) in the persistent nucleolar material, making it possible to emphasize that the nucleolus that persists during triatomine meiosis is in transcriptional activity



**Figure 1.** Meiotic metaphases of the species *Triatoma infestans* (A), *Rhodnius montenegrensis* (B) and *Panstrongylus megistus* (C). Note the presence of RNA in nucleolar material (arrows) in red and DNA in chromosomes in yellow. Bar: 10  $\mu\text{m}$ .

The process of division and differentiation by which spermatozoa are produced in the seminiferous tubules is called spermatogenesis. It consists of three phases: spermatocytogenesis or proliferation phase, meiosis or multiplication phase, and spermiogenesis or differentiation phase (JOHNSON et al., 1997). Until this study, it was uncertain whether the persistent nucleolus had transcriptional activity during triatomine meiosis. Thus, through the detection of the presence of RNA in the remaining nucleolar material, it was possible to confirm that, during the whole peculiar nucleogenesis of triatomines, the nucleolar material is transcriptionally active, unlike all other eukaryotes already studied.

This fluorochrome had already been used previously in studies involving triatomines as, for example, in the real time analysis of salivation of the specie *Rhodnius prolixus* during its feeding process (SOARES et al., 2006). Morielle-Souza and Azeredo-Oliveira (2008) also used this fluorochrome to confirm the presence of RNA/protein complexes in triatomines, by distinguishing rRNA in red. Although these authors support the hypothesis of post-meiotic reactivation of the persistent nucleolar material, Alevi et al. (2014b) corroborated the hypothesis of the absence of post-meiotic transcriptional activity, since the C-band cytogenetic technique revealed completely heterochromatic rDNA and NOR, suggesting that they were inactivated by epigenetic factors. Thus, we believe, through the analysis of the published images, in comparison with our results analyzed in confocal microscopy, that the red material highlighted in the spermatids by the authors are only cytoplasmic remnants and not a marking of transcriptional activity proper, corroborating the suggested by Alevi et al. (2014b).

Schmid et al. (1982) postulated that the post-meiotic reactivation of rRNA genes is an ancient evolutionary pattern in male gametogenesis of sexually reproductive organisms, since it has been detected since primitive cephalocordates (amphioxo *Branchiostoma lanceolatum*) and has remained in the vertebrates, mammals or not. However, it seems that the same is not true for some invertebrates, like triatomines. Since the post-meiotic inactivation in the triatomines has already been verified, it is suggested that the transcriptional activity of the persistent nucleolar material is essential for the formation of the cytoplasmic organelle chromatoid body (CB) (BORGUETTI et al., 2015), recently described for these insects (SILISTINO-SOUZA et al., 2012).

The CB is a cytoplasmic structure originated by the nucleolar material fragmentation during the initial stages of spermatogenesis (PANIAGUA et al., 1986). This organelle is potentially involved in important functions of the spermiogenesis process, such as the acrosome formation, intercellular transport and spermatozoa tail formation (PERUQUETTI et al., 2008). Its identification occurred for the first time in spermatocytes of rat, mouse, guinea pig, and several other mammals (BENDA, 1891). In 1907, this organelle was first reported in the Insecta class (SCHAFER, 1907).

Studies involving the proteic and RNA composition of the CB suggest that the association between this organelle and mRNAs leads to the translation repression of the same, corroborating the hypothesis of CB acts as a form of storage of the information translated in the spermatogenesis (KOTAJA and SASSONE-CORSI, 2007). In this way, CB would support the entire process of differentiation during spermiogenesis, once the transcriptional activity is repressed during this phase (BRAUN 1998; KOTAJA et al., 2006; MEIKAR et al., 2014). We believe then that similar modes of regulation of transcriptional activity are present during triatomine spermatogenesis, as has been postulated for yeasts and other multicellular organisms (JIM and NEIMAN, 2016).

Thus, this study corroborates the relationship between CB formation and the nucleolar persistence phenomenon that occurs during triatomine meiosis, demonstrating, for the first time, that the persistent nucleolar material is in transcriptional activity.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process number 2015/14762-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## REFERENCES

- Alevi, K.C.C., Castro, N.F.C., Lima, A.C.C., Ravazi, A., Morielle-Souza, A., Oliveira, J., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2014a. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). *Cell Biol Int* 38(8), 977-980.
- Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2013b. Análise das possíveis Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. *Rev Ciênc Farmac Básica Apl* 34 (3), 417-421.
- Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., da Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2014b. Is there post-meiotic transcriptional activity during hemipteran spermiogenesis?. *Invertebr. Reprod. Dev.* 58(3), 193-198.
- Alevi, K.C.C., Reis, Y.V., Guerra, A.L., Imperador, C.H.L., Banho, C.A., Moreira, F.F.F., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2016. Would *Nesotriatoma bruneri* Usinger, 1944 be a valid species? *Zootaxa* 4103, 396-400.
- Bardella, V.B., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Tartarotti, E., 2008. Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). *Genet Mol Res* 7(2), 326-335, 2008.
- Barth, R., 1956. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae); VI parte: estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 54(3), 599-616..
- Benda, C., 1891. Neue Mitteilungen über die Entwicklung der Genitaldrüsen und die Metamorphose der Samenzellen (Histogenese der Spermatozoen). *Verhandlungen der berliner physiologischen gesellschaft.* *Arch Anat Physiol*, 549-552.
- Borgueti, A.O., Alevi, K.C.C., Silistino-Souza, R., Rosa, J.A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2015. Immunofluorescence and ultrastructural analysis of the chromatoid body during spermatogenesis of *Triatoma platensis* and *T. rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae). *Micron* 74, 44-46.
- Braun, R.E., 1998. Post-transcriptional control of gene expression. during spermatogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9, 483–489.

- Castanhole, M.M.U., Pereira, L.L.V., Bicudo, H.E.M.C., Costa, L.A.A, et al., 2008. Heteropicnotic chromatin and nucleolar activity in meiosis and spermiogenesis of *Limnogonus aduncus* (Heteroptera, Gerridae): a stained nucleolar organizing region that can serve as a model for studying chromosome behavior. *Genet Mol Res* 7, 1398-1407.
- Costa, L.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Tartarotti, E., 2008. Spermatogenesis and nucleolar activity in *Triatoma klugi* (Triatominae, Heteroptera). *Genet Mol Biol* 31(2), 438-444.
- Galvão, C., 2015. Vetores da doença de Chagas no Brasil – Série Zoologia: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 288 p.
- González-García, J.M., Rufas, J.S., Antonio, C., Suja, J.A., 1995. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 104(4), 287-297.
- Howell, W.M., Black, D.A., 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Cell Mol Life Sci* 36(8), 1014-1015.
- Imperador, C.H.L., Alevi, K.C.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V. PERSISTÊNCIA NUCLEOLAR EM *Triatoma wygodzinskyi* (HEMIPTERA, TRIATOMINAE). *Ciênc Tecnol* 7, esp.
- Jin, L., Neiman, A.M., 2016. Post-transcriptional regulation in budding yeast meiosis. *Curr. Genet.* 62(2), 313-315.
- Johnson, L., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Scrutchfield, W.L., 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Therio.* 48(7), 1199-1216.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S.N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W., Sassone-Corsi, P., 2006. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2647–2652.
- Kotaja, N., Sassone-Corsi, P., 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8(1), 85-90.
- Lara-Martínez, R., Segura-Valdez, M.L.L., La Mora-De La Mora, D., López-Velázquez, G., Jiménez-García, L.F., 2016. Morphological studies of nucleologenesis in *Giardia lamblia*. *Anat Rec* 299(5), 549-556.

- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163, 123-520.
- Madeira, F.F., Borsatto, K.C., Lima, A.C.C., Ravazi, A., Oliveira, J., Rosa, J. A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Alevi, K.C.C., 2016. Nucleolar Persistence: Peculiar Characteristic of Spermatogenesis of the Vectors of Chagas Disease (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg* 95(5), 1118-1120.
- Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Pinotti, H., Gurgel-Gongalves, R., Pita, S., Guerra, A.L., Panzera, F., Araújo, R.F., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Rosa, J.A., 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* 4107, 239-254.
- Meikar, O., Vagin, V.V., Chalmel, F., Sostar, K., Lardenois, A., Hammell, M., Jin, Y., Da Ros, M., Wasik, K.A., Toppari, J., Hannon, G.J., Kotaja, N. 2014. An atlas of chromatoid body components. *RNA* 20, 483– 495.
- Morielle, A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2004. Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryol* 57(1), 31-37, 2004.
- Morielle-Souza, A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet Mol Res* 6(3), 713-720.
- Morielle-Souza, A., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2008. Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Micron* 39(7), 1020-1026.
- Noireau, F., Diosque, P., Jansen, A.M., 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40(2), 1-23.
- Paniagua, R., Nistal, M., Amat. P., Rodriguez, M.C., 1986. Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anat. Embryol.* 174, 301–306.
- Pereira, L.L.V., Alevi, K.C.C., Moreira, F.F.F., Barbosa, J.F., Silistino-Souza, E.R., Júnior, F.S., Souza-Firmino, T.S., Banho, C.A., Itoyama, M.M., 2015. Study of nucleolar behavior

- during spermatogenesis in *Martarega brasiliensis* (Heteroptera, Notonectidae). Genet Mol Res 14, 8988-8994.
- Pereira, N. P., Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2015. Spermatogenesis and nucleolar behavior in *Triatoma vanda* and *Triatoma williami* (Hemiptera, Triatominae). Genet Mol Res 4(4), 12145-12151.
- Peruquetti, R.L., Assis, I.M., Taboga, S R., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2008. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. Micron 39(4), 419-425.
- Severi-Aguiar, G.D.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2005. Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. Caryol 58(4), 293-299.
- Severi-Aguiar, G.D.C., Lourenço, L.B., Bicudo, H.E.M.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). Genetica 126(1-2), 141-151.
- Schafer, F., 1907. Spermatogenese von *Dytiscus*. Ein Beitrag zur Frage der Chromatin reduction. Zoologische Jahrbücher 23, 535.
- Schmid, M., et al., 1982. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in vertebrates. Chromosoma 86, 149–178.
- Sheldon, S., Lehman, J.M., 1981. Continued presence of nucleoli in human germ cell tumors during mitosis. Cancer. Res. 41(9), 3666-3668.
- Silistino-Souza, R., Peruquetti, R.L., Taboga, S.R., Azeredo-Oliveira, M.T.V., 2012. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). Micron 43(9), 954-960.
- Soares, A. C., Carvalho-Tavares, J., de Figueiredo Gontijo, N., dos Santos, V.C., Teixeira, M. M., Pereira, M. H., 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. J. Insect. Physiol. 52(5), 468-472.
- Souza, E.S., Atzinger, N.C.B.V., Furtado, M.B., Oliveira, J., Damieli, J.N., Vendramini, D.P., Gardim, S., Rosa, J.A., 2016. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. Zookeys 621, 45-62.

Tartarotti, E., Azeredo-Oeiveira, M.T.V., 1999. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryol* 52 (3-4), 177-184.

Ueshima, N., 1966. Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18(1), 97-122.

Vaughan, M.A., Braselton, J. P., 1985. Nucleolar persistence in meristems of mung bean. *Caryologia* 38(3-4), 357-362.

## Discussão

---

## V. DISCUSSÃO

A espermatogênese é o processo de divisão e diferenciação pelo qual os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos. Constitui-se de três fases: espermatocitogênese ou fase de proliferação, meiose ou fase de multiplicação; e espermiogênese ou fase de diferenciação (JOHNSON et al., 1997).

Geralmente, durante a meiose dos eucariotos, as células cessam a transcrição de RNAr na fase de prófase, ocorrendo a fragmentação nucleolar e a migração da maior parte das suas proteínas para o citoplasma, sendo que algumas permanecem associadas às Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) dos cromossomos. A transcrição de RNAr é reativada apenas na anáfase, ocorrendo gradualmente a reorganização do nucléolo (GONZÁLEZ-GARCIA et al., 1995). Entretanto, Tartarotti e Azeredo-Oliveira (1999) observaram em triatomíneos resquícios do material nucleolar durante todas as fases da divisão meiótica, caracterizando o fenômeno de persistência pela primeira vez nesses insetos.

Até o momento, o fenômeno de persistência nucleolar havia sido descrito para apenas 24 espécies de triatomíneos, incluindo os gêneros *Triatoma* (SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; 2006; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; BARDELLA et al., 2008; COSTA et al., 2008; ALEVI et al., 2013a; IMPERADOR et al., 2015; PEREIRA et al., 2015), *Rhodnius* (MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; ALEVI et al., 2014a), e *Panstrongylus* (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

Alevi et al. (2014) sugerem a realização de novos estudos citogenéticos, por meio da impregnação por íons prata, a fim de descrever o fenômeno para os outros 15 gêneros da subfamília. No presente estudo, a análise do comportamento nucleolar por meio dessa técnica, durante a meiose de 59 espécies, incluídas em sete gêneros (*Cavernicola*, *Psammolestes*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Meccus*, *Mepraia* e *Nesotriatoma*), permitiu corroborar a hipótese de que todas as espécies apresentam o fenômeno de persistência nucleolar, sendo os resultados observados semelhantes para todos os triatomíneos. Dessa forma, os resultados do presente estudo permitiram a descrição da persistência nucleolar como uma sinapormorfia da subfamília Triatominae.

O fenômeno de persistência do material nucleolar já foi verificado anteriormente em diversos outros organismos e tipos celulares, como em células embrionárias carcinogênicas (SHELDON et al., 1981), na mitose do parasito *Giardia lamblia* (LARA-MARTÍNEZ et al., 2016) e de células meristemáticas do feijão-mungo (VAUGHAN e BRASELTON, 1985), em

algumas espécies aquáticas de Heteroptera (CASTANHOLE et al., 2008; PEREIRA et al., 2015), dinoflagelados e células malignas de mamíferos. Em sua maioria, esse material é encontrado na forma de corpos pré-nucleolares (PNBs). Os corpos pré-nucleolares são descritos como estruturas fibrogranulares densas, de tamanho e forma variáveis, contendo RNA e proteínas acídicas, como a B23, C23 e No38 (OCHS et al., 1985; FLECHON; KOPECNY, 1998). Assim, a persistência do nucléolo em outros organismos, tanto durante a mitose como a meiose, suporta a teoria de que o material nucleolar não desaparece completamente durante as fases de metáfase e anáfase. Entretanto, o significado funcional desse fenômeno ainda permanece desconhecido.

Todo o conhecimento sobre a persistência nucleolar é restrito à presença do nucléolo durante a meiose, detectado pela técnica de impregnação por íons prata. Embora já tenha sido reportado que a variação da intensidade da coloração pela prata possa estar associada com o grau de atividade nucleolar (presumidamente sua atividade transcricional), esta se refere apenas à impregnação das RONS (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). Schmid et al. (1982) verificou que a coloração por prata se encontra restrita às RONS que estão envolvidas na síntese de RNAr naquele momento ou anteriormente, ao estudar a espermatogênese de dez espécies não-mamíferas (incluindo aves, anfíbios, répteis e peixes) e uma espécie de cefalocordado – um anfioxo lanceolado (*Branchiostoma lanceolatum*). Já para os invertebrados, em estudos citoquímicos de oócitos de grilo, a prata não se ligou ao DNAr, nem ao RNAr transcrito, mas sim às proteínas que se associam rapidamente com o RNAr recém-transcrito (HOWELL, 1977). Assim, acreditamos que o padrão de coloração dos componentes nucleolares pela prata é bastante variante de acordo com o organismo de estudo. Porém, Alevi et al. (2014b) verificaram, em triatomíneos, que as marcações por prata e por banda-C, técnica utilizada para revelar regiões heterocromáticas (SUMMER, 1972), se davam na mesma localização em espermátides, possibilitando a ideia de que para esses insetos a impregnação por íons prata não marca necessariamente regiões ativas transcionalmente.

Assim, até o presente trabalho, era incerto se o nucléolo persistente apresentava ou não atividade transcricional nos triatomíneos. Existem hipóteses na literatura de que esses corpos nucleolares ou corpúsculos remanescentes carreguem um material “primário” ou “novo”, ou que representem uma fonte de RNA nucleolar para as células-filhas, enquanto um novo nucléolo está sendo organizado (WACHTLER; STAHL, 1993; MELLO, 1995). Medina et al. (1995) propuseram que o reinício da síntese de RNA pré-ribossomal nas células-filhas durante a telófase é necessário para a agregação de PNBs já formados na região organizadora nucleolar (NOR), para que então o nucléolo seja reorganizado.



O estudo de Morielle-Souza e Azeredo-Oliveira (2008) corrobora a hipótese de reativação pós-meiótica em triatomíneos, pois foram observadas, em espermátides iniciais, regiões claramente metacromáticas e regiões coradas em vermelho, pelas técnicas Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) e *Acridine Orange*, respectivamente, confirmando a presença de complexos RNA/proteínas. Entretanto, por meio de uma análise mais detalhada das imagens publicadas, e em comparação com as imagens obtidas do fluorocromo *Acridine Orange* por microscopia confocal no presente estudo, verifica-se que as regiões avermelhadas são apenas parte do citoplasma celular e não regiões ativas transcricionalmente propriamente ditas.

Outros estudos envolvendo a espermatogênese de vertebrados, particularmente de roedores, também verificaram a reativação pós-meiótica de genes do RNAr, sugerindo um tipo de padrão da sua síntese na gametogênese masculina de organismos de reprodução sexuada. A conservação evolutiva dessa reativação das NORs desde os cefalocordados até o homem indica a necessidade do RNA ribossomal sintetizado pós-meioticamente. Possivelmente, esse RNAr novo pode ser um pré-requisito para a produção de RNAm, o qual é transcrito durante os estágios iniciais do desenvolvimento da espermátide (SCHMID et al., 1982; PERUQUETTI et al., 2008).

Em espermátides, Alevi et al. (2014b) constataram que os nucléolos persistentes, embora presentes, se encontravam inativados, possivelmente por fatores epigenéticos, resultando na heterocromatização dessa estrutura celular. Assim, os autores sugerem que a organela citoplasmática corpo cromatóide (CB) seja a responsável pela atividade transcricional necessária para a espermiogênese. Recentemente, Borguetti et al. (2015), por meio da ausência da proteína fibrilarina no nucléolo de espermátides e sua presença nas espermatogônias dos triatomíneos, corroboraram o proposto por Alevi et al. (2014b) e sugeriram que a formação do CB se iniciaria ainda na fase de espermatocitogênese, sendo suportada pelo material nucleolar persistente ativo transcricionalmente. Ao estudarem o ciclo nucleolar e o surgimento do CB em vários modelos de vertebrados (peixe, anfíbio, réptil e mamífero), Peruquetti e colaboradores (PERUQUETTI et al., 2008; PERUQUETTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 2009; PERUQUETTI et al., 2010a; PERUQUETTI et al., 2010b; PERUQUETTI et al., 2011; PERUQUETTI et al., 2012a; PERUQUETTI et al., 2012b; PERUQUETTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 2013) verificaram que ambos os processos aparentam ser extremamente conservados entre as diferentes espécies.

Acredita-se que o corpo cromatóide atue como um coordenador do controle pós-transcricional em células germinativas masculinas haploides, agindo como um centro que

determina o destino dos RNAm (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007), corroborando a hipótese do CB atuar como uma forma de estocagem da informação traduzida na espermatogênese. Em espermátides arredondadas, o CB atua na repressão traducional por meio da interação com componentes da via dos miRNA (KOTAJA et al., 2006).

Recentemente, a presença de mais de 10 miRNAs foi detectada em compartimentos nucleolares, os quais não foram associados com a transcrição de RNAs precursores ribossomais (BAI et al., 2014). Sendo assim, devido ao fato da função desses miRNAs no nucléolo ainda permanecer desconhecida, sua presença pode futuramente associar a fisiologia nucleolar com a do CB. Essa hipótese é fundamentada pelo fato que o funcionamento do CB é fortemente baseado na existência de vias de miRNA na composição molecular dessa organela (DE PAULLI et al., 2017).

Em triatomíneos, a presença da proteína nucleolar fibrilarina foi detectada em uma posição perinuclear citoplasmática, que corresponde à localização onde o CB é frequentemente observado (SILISTINO-SOUZA et al., 2012). Essa correspondência de posicionamento providencia mais uma evidência para a hipótese da associação entre os produtos nucleolares com o CB durante a espermatogênese. Além disso, outra proteína nucleolar – a nucleolina (C23) – foi recentemente detectada como parte integrante do CB, após uma extensiva análise proteômica dessa estrutura (MEIKAR et al., 2014).

A proteína testículo-específica KIF17b é uma cinesina que oscila entre os compartimentos nuclear e citoplasmático, podendo estar envolvida com o transporte de componentes específicos do CB, uma vez que já foi implicada com o transporte de RNA (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007), suportando a hipótese da origem do CB a partir do material nucleolar.

O CB atuaria suportando todo o processo de diferenciação durante da espermiogênese dos triatomíneos, uma vez que a atividade transcricional encontra-se reprimida durante essa fase (BRAUN 1998; KOTAJA et al. 2006; MEIKAR et al. 2014). Acreditamos então que modos similares de regulação da atividade transcricional estejam presentes durante a espermatogênese dos triatomíneos, assim como já foi postulado para as leveduras e outros organismos multicelulares (JIM e NEIMAN, 2016).

Assim, esse estudo corrobora a hipótese da formação do CB ser iniciada ainda durante a espermatocitogênese e ser intensificada pela atividade transcricional do fenômeno de persistência nucleolar que ocorre durante a meiose dos triatomíneos, auxiliando o suporte da inatividade transcricional já descrita durante a espermiogênese.



## VI. CONCLUSÕES

- O fenômeno de persistência nucleolar pode ser considerado como uma sinapomorfia da subfamília Triatominae.
- O material nucleolar persistente durante a meiose dos triatomíneos encontra-se transcricionalmente ativo, possivelmente corroborando a relação entre a persistência nucleolar e a formação da organela corpo cromatóide.

## Referências Bibliográficas

---

### VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEVI, K.C.C.; CASTRO, N.F.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Presence of Cytoplasmic Organelle chromatoid body in class Insecta. **Entomology, Ornithology and Herpetology**, v. 02, n. 109, p. 1-3, 2013a.

ALEVI, K. C. C.; CASTRO, N. F. C.; LIMA, A. C. C.; RAVAZI, A.; MORIELLE-SOUZA, A.; DE OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). **Cell Biology International**, v. 38, n. 8, p. 977-980, 2014a.

ALEVI, K. C. C.; CASTRO, N. F. C.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Presence of chromatoid bodies in the *Rhodnius* genus detected by cytochemical analysis. **Genetics and molecular research**, v. 15, n. 2, 2016a.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A. D.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Análise das possíveis Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 417-421, 2013b.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Is there post-meiotic transcriptional activity during hemipteran spermiogenesis? **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 58, n. 3, p. 193-198, 2014b.

ALEVI, K. C. C.; MOREIRA, F. F. F.; JURBERG, J.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Description of diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1106-1110, 2015.

ALEVI, K. C. C.; REIS, Y. V.; GUERRA, A. L.; IMPERADOR, C. H. L.; BANHO, C. A.; MOREIRA, F. F. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Would *Nesotriatoma bruneri* Usinger, 1944 be a valid species? **Zootaxa**, v. 4103, p. 396-400, 2016b.

BARDELLA, V. B.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; TARTAROTTI, E. Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 07, n.02, p. 326-335, 2008.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae); VI parte: estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 3, p. 599-616, 1956.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BOISVERT, F. M.; VAN KONINGSBRUGGEN, S.; NAVASCUÉS, J.; LAMOND, A. I. The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 574-585, 2007.

BORGUETI, A. O.; ALEVI, K. C. C.; SILISTINO-SOUZA, R.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Immunofluorescence and ultrastructural analysis of the chromatoid body during spermatogenesis of *Triatoma platensis* and *T. rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae). **Micron**, v. 74, p. 44-46, 2015.

CARVALHO H. F.; RECCO-PIMENTEL S. M. **A Célula**. São Paulo: Manole, 2013.

CASSEB-HASSAN, P. M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estrutura Nucleolar e Impregnação por Íons Prata. **HB Científica**, v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999.

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

CHAGAS, CARLOS. “Nova trypanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida

do homem”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

COMINGS, D.E.; OKADA, T. A. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. **Journal of ultrastructure research**, v. 39, n. 1-2, p. 15-23, 1972.

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

DE PAULI, L. F.; SANTOS, E. G.; ARCANGELO, F. P. D.; ORCINI, W. A.; PERUQUETTI, R. L. Differential Expression of the Nucleolar Protein Fibrillarin During Mammalian Spermatogenesis and Its Probable Association with Chromatoid Body Components. **Micron**, v. 94, p. 37-45, 2017.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 373–383, 1998.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 603-612, 2002.

FAWCETT, D.W.; EDDY, E. M.; PHILLIPS, D. M. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. **Biology of reproduction**, v. 2, n. 1, p. 129-153, 1970.

FERREIRA, I.L.M.; SILVA, T.P.T.E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 507–509, 2006.



FIOCRUZ, 2013. Agência FIOCRUZ de notícias – Doença de Chagas. **Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde**. Disponível em <<https://agencia.fiocruz.br/doenca-de-chagas>>. Acesso em 03 de julho de 2016.

FISCHER, D.; WEISENBERGER, D.; SCHEER, U. Assigning functions to nucleolar structures. **Chromosoma**, v. 101, n. 3, p. 133-140, 1991.

FLECHON, J. E.; KOPECNY, V. The nature of the “nucleolus precursor body” in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. **Zygote**, v. 06, p. 183-191, 1998.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil** – Série Zoologia: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2015, 288 p.

GARDIM, S.; ALMEIDA, C. E.; TAKIYA, D. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision of Triatomini. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 23, p. 74-79, 2014.

GONÇALVES, R. G.; GALVÃO, C.; MENDONÇA, J.; COSTA NETO, E. M. **Guia de triatomíneos da Bahia**. Feira de Santana: UEFS Editora, 2012, 112 p.

GONZÁEZ-GARCÍA, J. M.; RUFAS, J. S.; ANTONIO, C.; SUJA, J. A. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. **Chromosoma**, v. 104, n. 4, p. 287-297, 1995.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v. 53, n. 1, p. 37-50, 1975.

HARAGUCHI, C. M.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; SHODA, T.; HOSHI, K.; AKASAKI, K.; YOKOTA, S. Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.53, p.455–465, 2005.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal of Cell Science**, v. 99, n. 3, p. 465-471, 1991.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stain proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v. 62, p. 361-367, 1977.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.

IAMAT, 2016. Chagas Disease. **International Association For Medical Assistance To Travellers**. Disponível em <<https://www.iamat.org/risks/chagas-disease>>. Acesso em 15 de junho de 2016.

IMPERADOR, C. H. L.; ALEVI, K. C. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. PERSISTÊNCIA NUCLEOLAR EM *Triatoma wygodzinskyi* (HEMIPTERA, TRIATOMINAE). **Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. esp., 2015.

JIN, L.; NEIMAN, A. M. Post-transcriptional regulation in budding yeast meiosis. **Current Genetics**, v. 62, n. 2, p. 313-315, 2016.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCRUTCHFIELD, W. L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1199-1216, 1997.

JURBERG, J.; CUNHA, V.; CAILLEAUX, S.; RAIGORODSCHI, R.; LIMA, M. S.; ROCHA, D. S.; MOREIRA, F.F.F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrobaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, p. 43-56, 2013.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M. S.; MOREIRA, F. F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R. S.; LAMAS JÚNIOR, V. D.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S. **Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas)**. Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, 52 p., 2014.

JUSTI, S. A.; GALVÃO, C.; SCHRAGO, C. G. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-22, 2016.

JUSTI, S. A.; RUSSO, C. A.; MALLET, J. R. S.; OBARA, M. T.; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites and vectors**, v. 7, n.01, p. 1-12, 2014.

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

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 85-90, 2007.

LARA-MARTÍNEZ, R.; SEGURA-VALDEZ, M. L. L.; LA MORA-DE LA MORA, D., LÓPEZ-VELÁZQUEZ, G.; JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F. Morphological studies of nucleogenesis in *Giardia lamblia*. **The Anatomical Record**, v. 299, n. 5, p. 549-556, 2016.

LATORRE-ESTIVALIS, J. M.; LAZZARI, C. R.; GUARNERI, A. A.; MOTA, T.; OMONDI, B. A.; LORENZO, M. G. Genetic basis of triatomine behavior: lessons from available insect genomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 63-73, 2013.

LEFÈVRE, B. The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. **BioEssays**, v. 30, n. 7, p. 613-616, 2008.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Revisión de los triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y su significado como vectores del mal de Chagas. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123-520, 1979.

MALATESTA, M.; ZANCANARO, C.; BIGGIOGERA, M. Immunoelectron microscopic characterization of nucleolus-associated domains during hibernation. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 1, p. 47-53, 2011.

MEDINA, F. J.; CERDIDO, A.; FERNÁNDEZ-GOMEZ, M. E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. **Experimental Cell Research**, v. 221, p. 111-125, 1995.

MEIKAR, O.; VAGIN, V. V.; CHALMEL, F.; SÔSTAR, K.; LARDENOIS, A.; HAMMELL, M.; JIN, Y.; DA ROS, M.; WASIK, K. A.; TOPPARI, J.; HANNON, G. J.; KOJOTA, N. An atlas of chromatoid body components. **RNA**, v. 20, p. 1–3, 2014.

MELLO, M. L. S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 28, p. 149-154, 1995.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; DANTAS, M. M.; MONTEIRO, A. L. P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 26, p. 1-3, 1993.

MENDONÇA, V. J.; ALEVI, K. C. C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONGALVES, R.; PITA, S.; GUERRA, A. L.; PANZERA, F.; ARAÚJO, R. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v. 4107, p.239-254, 2016.

MORIELLE, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). **Caryologia**, v. 57, n. 1, p. 31-37, 2004.

MORIELLE-SOUZA, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. **Genetics and Molecular Research**, v.06, n. 03, p. 713-720, 2007.

NAGAMORI, I.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. **Cell Cycle**, v. 7, n. 22, p. 3503-3508, 2008.

NEWTON, K.; PETFALSKI, E.; TOLLERVEY, D.; CÁCERES, J. F. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. **Molecular and Celular Biology**, v. 23, n. 23, p. 8519-8527, 2003.

NICOL, S. M.; CAUSEVIC, M.; PRESCOTT, A. R.; FULLER-PACE, F. V. The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. **Experimental Cell Research**, v. 257, n. 2, p. 272-280, 2000.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 1-23, 2009.

OCHS, R. L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C<sub>23</sub> (110Kd/p15,I) is the nucleolar silver staining protein. **Experimental Cell Research**, v. 152, p. 260-265, 1984.

OCHS, R. L.; LISCHWE, M. A.; SCHEN, E.; CARROLL, R. E.; BUSCH, H. Nucleologensis: composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, v. 92, p. 330-336, 1985.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 189-201, 2005.

PARVINEN, M.; PARVINEN, L.M. Active movements of the chromatoid body. A possible transport mechanism for haploid gene products. **The Journal of cell biology**, v. 80, n. 3, p. 621-628, 1979.

PARVINEN, M.; SALO, J.; TOIVONEN, M.; NEVALAINEN, O.; SOINI, E.; PELLINIEMI, L.J. Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. **Histochemistry and cell biology**, v. 108, n. 1, p. 77-81, 1997.

PEREIRA, L. L. V.; ALEVI, K. C. C.; MOREIRA, F. F. F.; BARBOSA, J. F.; SILISTINO-SOUZA, E. R.; JÚNIOR, F. S.; SOUZA-FIRMINO, T. S.; BANHO, C. A.; ITOYAMA, M. M. Study of nucleolar behavior during spermatogenesis in *Martarega brasiliensis* (Heteroptera, Notonectidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 8988-8994, 2015.

PEREIRA, N. P.; ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Spermatogenesis and nucleolar behavior in *Triatoma vanda* and *Triatoma williamsi* (Hemiptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 12145-12151, 2015.

PEREZ, C. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 11, p. 595-603, 2015.

PERUQUETTI, R. L.; ASSIS, I. M.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v. 39, n. 4, p. 419-425, 2008.

PERUQUETTI, R. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of the nucleolar cycle and chromatoid body formation in the spermatogenesis of some vertebrate species. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 456-457, 2009.

PERUQUETTI, R. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Chromatoid Body Assembling and Nucleolar Cycle: Two Important Physiological Events for the Spermatogenesis in Vertebrates. In: Perrote, A.. (Org.). **Recent Advances in Germ Cells Research**, 1<sup>a</sup> ed., NY: Nova Science Publishers, p. 133-148, 2013.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 3, p. 399-406, 2010a.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Morphological changes of mammalian nucleoli during spermatogenesis and their possible role in the chromatoid body assembling. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, p. 1-12, 2012a.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar cycle and its correlation with chromatoid bodies in the *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae) spermatogenesis. **The Anatomical Record**, v. 293, n. 5, p. 900-910, 2010b

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; CABRAL, S. R.; OLIVEIRA, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Relationship between the nucleolar cycle and chromatoid body formation in the spermatogenesis of *Phrynops geoffroanus* (Reptilia, Testudines). **Animal Cells and Systems**, v. 16, n. 2, p. 104-113, 2012b.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; SANTOS, L. R. S.; OLIVEIRA, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar cycle and chromatoid body formation: is there a relationship between these two processes during spermatogenesis of *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)? **Micron**, v. 42, n. 1, p. 87-96, 2011.

REUNOV, A.; ISAEVA, V.; AU, D.; WU, R. Nuage constituents arising from mitochondria: is it possible?. **Development, growth and differentiation**, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2000.

RODRIGUEZ-CORONA, U.; SOBOL, M.; RODRIGUEZ-ZAPATA, L. C.; HOZAK, P.; CASTANO, E. Fibrillarin: from Archaea to human. **Biology of the Cell**, v. 107, n. 6, p. 159-174, 2015.

ROSA, J. A.; ROCHA, C. S.; GARDIM, S.; PINTO, M. C.; MENDONÇA, V. J.; FERREIRA FILHO, J. C. R.; COSTA DE CARVALHO, E. O.; CAMARGO, L. M. A.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J. D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C. E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62-76, 2012.

SCHAFER, F. Spermatogenese von Dytiscus. Ein Beitrag zur Frage der Chromatin reduction. **Zoologische Jahrbücher**, v. 23, p. 535, 1907.

SCHEER, U.; XIA, B.; MERKERT, H.; WEISENBERGER, D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. **Chromosoma**, v. 105, p. 470-480, 1997.

SCHMID, M.; LOSER, C.; SCHMIDTKE, J.; ENGEL, W. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizer during spermiogenesis in vertebrates. **Chromosoma**, v. 86, p. 149-178, 1982.

SCHMUNIS, G. A. **A Tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Américas**. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora, p. 1-15, 1999.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolutions, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009

SCHREIBER, G.; PENALVA, F.; CARVALHO, H. C. Morfologia comparada dos túbulos testiculares e sistemática dos Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Ciência e Cultura**, v. 20, p.640–641, 1968.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions. **Caryologia**, v. 58, n. 4, p. 293-299, 2005.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; LOURENÇO, L. B.; BICUDO, H. E. M. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 141-151, 2006.

SHELDON, S.; LEHMAN, J.M. Continued presence of nucleoli in human germ cell tumors during mitosis. **Cancer Research**, v. 41, n. 9, p. 3666-3668, 1981.

SILISTINO-SOUZA, R.; PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). **Micron**, v. 43, n. 9, p. 954-960, 2012.

SOUZA, E. S.; ATZINGER, N. C. B. V.; FURTADO, M. B.; OLIVEIRA, J.; DAMIELI, J. N.; VENDRAMINI, D. P.; GARDIM, S.; ROSA, J.A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. **Zookeys**, v. 621, p. 45-62, 2016.



- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OEIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. **Caryologia**, v. 52, n. 3-4, p. 177-184, 1999.
- TOLLERVEY, D.; LEHTONEN, H.; JANSEN, R.; KERN, H.; HURT, E.C. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. **Cell**, v. 72, p. 443-457, 1993.
- UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). **Chromosoma**, v. 18, n. 1, p. 97-122, 1966.
- ÜNAL, E.; KINDE, B.; AMON, A. Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1554-1557, 2011.
- VAUGHAN, M.A.; BRASELTON, J. P. Nucleolar persistence in meristems of mung bean. **Caryologia**, v. 38, 357-362, 1985.
- VIDAL, B. C. **Métodos em Biologia Celular**. In: Biologia Celular (Vidal, B. C. e Mello, M. L. S., eds.). Edições Atheneu, Rio de Janeiro, p. 5-34, 1987.
- WACHTLER, F.; STAHL, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. **Micron**, v. 24, p. 473-505, 1993.
- WHO, 2016. Chagas disease (American trypanosomiasis). **World Health Organization**. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 04 de julho de 2016.
- YOKOTA, S. Historical survey on chromatoid body research. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 41, n. 4, p. 65-82, 2008.

ZATSEPINA, O. V.; DUDNIC, O. A.; TODOROV, I. T.; THIRY, M.; SPRING, H.; TRENDELENBURG, M. F. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. **Chromosoma**, v. 105, n. 7-8, p. 418-430, 1997.



## 1. Técnicas citogenéticas convencional e molecular

### 1.1. Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980)

Após o preparo usual das lâminas, segue-se o seguinte procedimento:

- Pingar uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico) sobre o material limpo e seco;
- Adicionar duas gotas de solução de nitrato de prata a 50% à solução reveladora e misturá-las delicadamente;
- Cobrir com uma lamínula;
- Colocar as lâminas em uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido com água deionizada (câmara úmida) e incubar em estufa pré-aquecida a 70°C, até que a mistura das soluções se torne uma coloração marrom-dourada (cerca de 7 minutos);
- Lavar a lâmina em água destilada corrente, até que a lamínula se desprenda;
- Secar ao ar e montar em verniz cristal no dia seguinte, para posterior análise.

A solução reveladora é obtida dissolvendo-se 1g de gelatina em 50 mL de água deionizada, e acrescentando-se 0,5 mL de ácido fórmico.

A solução de nitrato de prata a 50% é obtida pela dissolução de 1g de  $\text{AgNO}_3$  em 2 mL de água deionizada.

### 1.2. Fluorocromo Acridine Orange (VIDAL, 1987)

O procedimento de coloração do material compreende mergulhar a lâmina, com o material fixado, em solução de alaranjado de acridina (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) diluído em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) durante 15-20 minutos.

Após esse período, a lâmina é montada com glicerol e, logo após, deve ser realizada a análise do material para que não ocorra perda da fluorescência.

A solução de alaranjado de acridina é obtida pela mistura de 0,5g de *Acridine Orange* com 100 mL de água destilada ou tampão fosfato.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Assinatura do autor