

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

---

VANESSA BELLINI BARDELLA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR EM  
TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TRIATOMÍNEOS  
(TRIATOMINAE, HETEROPTERA)**

Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética

---

São José do Rio Preto-SP

---

VANESSA BELLINI BARDELLA

---

**ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR EM  
TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TRIATOMÍNEOS  
(TRIATOMINAE, HETEROPTERA)**

---

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

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas  
(IBILCE/UNESP) – São José do Rio Preto  
para obtenção do título de Mestre em  
Genética.

Bardella, Vanessa Bellini.

Análise citogenética molecular em túbulos seminíferos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera) / Vanessa Bellini Bardella. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

79 f.:il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Citogenética. 2. Cromossomos holocêntricos. 3. Ácido desoxirribonucléico. 3. DNAr. 4. Heterocromatina. 5. Nucléolo. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Bardella, Vanessa Bellini. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 575

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular, junto ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), com auxílio financeiro do CNPq (Processo no. 132576/2008-2)

**VANESSA BELLINI BARDELLA**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR EM TÚBULOS  
SEMINÍFEROS DE TRIATOMÍNEOS (TRITOMINAE,  
HETEROPERA)**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

Titulares:

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira \_\_\_\_\_  
(Presidente e Orientadora)

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi \_\_\_\_\_

Suplentes:

Profa. Dra. Carmen Silva Fontanetti Christofolletti \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti \_\_\_\_\_

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

Ao amor incondicional, Belly.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Ivo e Mariza, e aos meus familiares, pelo incentivo ao ensino e a minha formação pessoal.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela Azeredo-Oliveira, pela total confiança depositada, aos ensinamentos científicos acumulados no decorrer da minha vida acadêmica, à paciência, além da amizade formada entre nós.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais para a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, que forneceu suporte para a minha formação.

Ao Professor Doutor André Luís Laforga Vanzela (UEL), pelo auxílio nos trabalhos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

Aos meus colegas de laboratório: Rita, Lucilene, Carlos, Marcos, Priscila Mary, Priscila Mendonça, Mariana, Tamires, Maysa e Guilherme.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos Ana Carolina Buzzo Marcondelli, Angélica Robatino, Carolina Figueira Câmara e Ana Lígia Pascoaletti e, ao meu namorado, Roque,

que me ajudaram e estiveram ao meu lado nos meus melhores e nos meus piores dias.

À Deus.



## Sumário

<b>1 Introdução geral .....</b>	<b>13</b>
1.1 Importância médico-sanitária dos triatomíneos.....	14
1.2 Célula cística.....	15
1.3 Aspectos citogenéticos.....	15
1.4 Ciclo nucleolar.....	17
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>19</b>
<b>3 Artigos.....</b>	<b>21</b>
3.1 Características ultraestruturais e citogenéticas das células císticas no gênero <i>Triatoma</i> (Heteroptera, Reduviidae).....	22
3.2 Localização cromossômica de sítios heterocromáticos e de DNAr 45S em triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae).....	40
<b>4 Discussão geral e conclusões.....</b>	<b>59</b>
<b>5 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>65</b>
<b>6 Apêndice.....</b>	<b>68</b>
6.1 Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of <i>Triatoma     melanosoma</i> (Heteroptera, Reduviidae).....	70

BARDELLA, V.B. Análise citogenética molecular em túbulos seminíferos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). São José do Rio Preto – SP, 2010. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) – Campus de São José do Rio Preto – SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### Resumo

Os heterópteros apresentam a meiose cóstica nos túbulos seminíferos. Esses possuem o cisto espermatogonial envolto pelas células cósticas, as quais desenvolvem a função de nutrição das células em divisão celular. Quanto às características citogenéticas, esses insetos apresentam cromossomos holocinéticos, baixa variabilidade cariotípica e meiose invertida dos cromossomos sexuais. No presente trabalho foram caracterizadas as células cósticas quanto a sua localização, ultraestrutura e citogenética e, também, foram analisados os aspectos citogenéticos de quatro espécies do gênero *Triatoma*. Foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, citogenética convencional (orceína e AgNOR), bandamento C CMA<sub>3</sub>/DAPI e a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sonda de DNAr 45S de *Drosophila melanogaster*. Os resultados indicaram que a célula cóstica envolve um cisto espermatogonial e apresenta um grande núcleo com invaginações citoplasmáticas. Em todas as espécies foram observados vários graus de ploidia da célula cóstica. *Triatoma infestans* e *T. infestans melanosoma* apresentaram vários blocos heterocromáticos com a periferia CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e o interior DAPI<sup>+</sup>. Associada às bordas dos blocos heterocromáticos foram observados os segmentos de DNAr 45S, além da presença de vários nucléolos em cada núcleo. *Triatoma matogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. brasiliensis* apresentaram apenas um bloco heterocromático com as mesmas características, com exceção de *T. brasiliensis*, que apresentou em algumas células vários blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> dispersos. Nessas espécies foi observado apenas um nucléolo com similaridade na localização dos sítios de DNAr. Quanto aos aspectos citogenéticos, todas as espécies apresentaram  $2n = 20A + XY$ , com decréscimo do tamanho relativo dos cromossomos. Em *T. infestans melanosoma* os cromossomos foram divididos em grupos baseados no tamanho relativo desses. A heterocromatina nessa espécie apresentou blocos DAPI<sup>+</sup> adjacentes a outros CMA<sup>+</sup>, em ambos os terminais de três pares de autossomos maiores. Uma marcação terminal DAPI<sup>+</sup> também foi observada em um pequeno par autossômico (uma extremidade) e no cromossomo X (ambas as extremidades), sendo o cromossomo Y caracterizado como totalmente DAPI<sup>+</sup>. Já, em *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* a heterocromatina foi restrita ao cromossomo Y, que foi caracterizado como DAPI<sup>+</sup> (sinal fraco). As células submetidas à técnica de FISH exibiram diferenças no número, na localização e intensidade dos sinais de hibridização. *Triatoma brasiliensis* e *T. rubrovaria* apresentaram o sinal em um par autossômico, com variação na intensidade do sinal entre os homólogos somente em *T. rubrovaria*. A diferença entre os sítios de hibridização também foi observada nos cromossomos sexuais de *T. matogrossensis*. Já *T. infestans melanosoma* apresentou sítio de DNAr apenas no cromossomo X. Os aspectos

ultraestruturais das células císticas (sulcos e tamanho nuclear) associados aos dados citogenéticos (diversos sítios de DNAr 45S) sugerem que o evento de poliploidização possibilitou o aumento da atividade sintética dessas células. Pode ser sugerido que a quantidade de regiões heterocromáticas, apresentada pelas espécies estudadas, tenha influenciado na formação dos dois tipos morfológicos das células císticas. Os resultados obtidos indicam uma proximidade entre as espécies *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria*, e um cariótipo diferenciado para *T. infestans melanosoma*.

**Palavras-chave:** citogenética, cromossomos holocêntricos, DNAr, heterocromatina, nucléolo.

Bardella, V.B. **Molecular cytogenetic analysis of the holocentric chromosomes of triatomines. São José do Rio Preto – SP, 2010. 79p.** Thesis for the Masters of Science in Genetics-- Sao Paulo State University (UNESP-IBILCE), Sao Jose do Rio Preto campus, Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil

### Abstract

Heteroptera, or "true bugs", exhibit meiosis in their seminiferous tubules. They possess the spermatogonial cysts that are enclosed by cyst cells, which develop the nutritional function of the cells during cell division. In terms of cytogenetic characteristics, these insects possess holokinetic chromosomes, low karyotype variability, and inverted meiosis in the sex chromosomes. In this study, cyst cells from four species of the genus *Triatoma* were characterized by their location, superstructure, and cytogenetic makeup. Electronic transmission microscopy techniques were used, as well as conventional cytogenetic techniques (Orcein and AgNOR), C-banding with CMA<sub>3</sub> and DAPI banding, and Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with a 45S DNA probe of *Drosophila melanogaster*. The results indicated that the spermatogonial cyst is enclosed by the cyst cell, and that the cyst cell possesses a large nucleus with cytoplasmic invaginations. In all species studied, varying degrees of ploidy were observed in the cyst cells. *Triatoma infestans* and *T. infestans melanosoma* presented with various heterochromatic blocks, with CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> at the periphery and DAPI<sup>+</sup> at the interior. Segments of rDNA 45S were found along the edges of the heterochromatic blocks, along with the presence of various nucleoli in each nucleus. *Triatoma matogrossensis*, *T. rubrovaria* and *T. brasiliensis* presented with only one heterochromatic block with the same characteristics (with the exception of *T. brasiliensis*, which presented with various dispersed CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> blocks). In these species, only one nucleolus that was similar to the localization of the rDNA sites was found. All species presented with 2n = 20A + XY, with a decrease in size relative to the chromosomes. In the case of *T. infestans melanosoma*, the chromosomes were split into groups based on their relative sizes. The heterochromatin of this species presented with DAPI blocks adjacent to the CMA<sup>+</sup> blocks, in both terminals of the three pairs of the largest autosomes. A terminal dot DAPI<sup>+</sup> was also observed in a small autosomal pair (one extremity) and on X chromosome (both extremities). The Y chromosome was totally DAPI<sup>+</sup>. However, in *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* and *T. rubrovaria*, the heterochromatin was restricted to the Y chromosome, which was characterized as DAPI<sup>+</sup> (weak signal). The cells were analyzed using the FISH technique, and exhibited differences in location, intensity, hybridization signals, and the number of cells. *Triatoma brasiliensis* and *T. rubrovaria* presented with the signal in an autosomal pair. Only *T. rubrovaria* had varying signal intensity between the homologous chromosomes. This difference between the hybridization sites was also found in the sex chromosomes of *T. matogrossensis*, while *T. infestans melanosoma* presented with the rDNA site only on the X chromosome. The

superstructural aspects of the cyst cells (grooves and nucleus size) associated with the cytogenetic data (various rDNA 45S sites) suggest that the polyploidization played an active role in the increase of synthetic activity in these cells. It may be possible that the quantity of heterochromatic regions in the species studied have an influence on the formation of the two morphological types of cyst cells. The results obtained in this study suggest a genetic proximity between *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* and *T. rubrovaria*, and also indicate a different karyotype for *T. infestans melanosoma*.

**Key Words:** Cytogenetics, Holocentric chromosomes, DNAr, Heterochromatin, Nucleolus



## 1 Introdução geral

### 1.1 Importância médico-sanitária dos triatomíneos

A doença de Chagas ocorre no México, na América Central e na América do Sul. O agente causador dessa patologia é o parasito flagelado *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitido aos seres humanos principalmente por meio dos triatomíneos (transmissão vetorial), por transfusões sangüíneas e por transmissão congênita ou via oral (ingestão de sucos contaminados) (GUZMÁN-BRACHO, 2001).

Até o final da década de 90, 18 milhões de indivíduos apresentavam esta moléstia e cerca de 120 milhões de pessoas (25% dos habitantes da América Latina) estavam sob risco de contrair esta patologia (GUZMÁN-BRACHO, 2001). Dados recentes (2009) revelaram que o número de pessoas infectadas na América Latina está estimado entre 13 e 15 milhões, graças à intensa erradicação do *Triatoma infestans*, principal vetor da doença de Chagas em países da América do Sul (Brasil, Uruguai, Chile, Argentina, Bolívia, Paraguai) e parte da América Central (MENDONÇA, et al., 2009). Outras medidas coordenadas pela Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO: <http://www.paho.org>) foram tomadas como, por exemplo, o intenso acompanhamento dos doadores de sangue, para reduzir o risco da transmissão durante a transfusão, e o acompanhamento materno seguido do tratamento específico dos recém-nascidos infectados. Essas atividades levaram ao sucesso da redução da doença nesses países. No entanto, a redução da carga epidemiológica poderá também reduzir o interesse político e as

verbas operacionais. Deve ser ressaltado que embora 60 milhões de pessoas estejam com suas casas livres destes hematófagos, 40 milhões ainda convivem com esse risco (SCHOFIELD et al., 2006).

## **1.2 Organização dos túbulos seminíferos**

Os testículos dos insetos são organizados em cistos espermatogoniais, os quais são circundados pelas células císticas (SZÖLLÖSI, 1982). Estas desempenham a nutrição das células em divisão celular e são caracterizadas ultraestruturalmente por uma grande quantidade de ribossomos e retículos endoplasmáticos (CRUZ-LANDIM, FERREIRA, 1981; CRUZ-LANDIM, 2001). A observação ultraestrutural, morfológica e citogenética têm evidenciado a presença de poliploidização neste tipo celular, fato relacionado com a função de síntese desta célula (SCHMITD et al., 2002).

## **1.3 Aspectos citogenéticos**

A subfamília Triatominae apresenta 137 espécies, todas de hábito hematófago, distribuídas em seis tribos (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Linshcosteini, Rhodniini e Triatomini) e 18 gêneros (GALVÃO et al., 2003; JURBERG; GALVÃO, 2006). Os insetos pertencentes à subordem Heteroptera, assim como às ordens Homoptera, Lepdoptera e Trichoptera, possuem cromossomos holocêntricos (WOLF, 1996). Esses cromossomos são caracterizados por não possuírem constrição primária e pelo cinetócoro disperso



ao longo das cromátides (HUGHES-SCHRADER, 1961). Outra característica dos heterópteros é a meiose aquiasmática e pós-reducional para os cromossomos sexuais (UESHIMA, 1966).

O número diplóide nos machos de Triatominae varia de  $2n = 20$  a  $2n = 25$  (UESHIMA, 1966). São exceções para o número de autossomos: *Triatoma nítida*, *Panstrongylus megistus* (ambos com 18A) e *Triatoma rubrofasciata* (22A) (PANZERA et al., 1996). As demais variações no número de cromossomos devem-se à presença de vários mecanismos de determinação do sexo. Três mecanismos sexuais são encontrados nos machos: XY, presente em 25 espécies;  $X_1X_2Y$ , presente em 19 espécies e  $X_1X_2X_3Y$ , presente em apenas duas espécies (PANZERA et al., 1996). A partir destas evidências, considera-se que o número tipo dessa subfamília seja  $2n = 20A + XY$  (UESHIMA, 1966).

Os cromossomos monocêntricos e os holocêntricos possuem regiões eucromáticas e heterocromáticas, sendo assim diferenciadas por Heitz, em 1928, com base na diferença de compactação durante a intérfase. A eucromatina é menos condensada, mais acessível à transcrição, enquanto que a heterocromatina é tipicamente mais condensada e menos acessível à transcrição (HUISINGA et al., 2006).

A heterocromatina nos heterópteros ocorre na região terminal dos autossomos e nos cromossomos sexuais (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; MANDRIOLI et al., 1999; ITUARTI; PAPESCHI, 2004; GROVEZA et al., 2004; ANGUS et al., 2004). Poucos trabalhos relatam a localização intersticial da heterocromatina (CAMACHO et al., 1985).

#### 1.4 Ciclo nucleolar

O nucléolo é uma subestrutura nuclear e sem membrana que se organiza próximo de segmentos cromossômicos. É responsável pela transcrição de DNA ribossômico (DNAr) e, desse modo, pela biogênese dos ribossomos (OLSON et al., 2000). Os cístrons ribossomais são organizados no genoma em múltiplas cópias repetidas em *tandem*. Dois grupamentos distintos são conhecidos: um que contém o DNAr 45S, que codifica o RNA ribossomal 28S, 5,8S e 18S, e outra região que contém o DNAr 5S.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), aplicada em animais e plantas, permite a localização e o mapeamento de seqüências específicas de DNA nos cromossomos, como por exemplo, a localização de genes de DNAr (GALIÁN et al., 1995). Com o entendimento da quantidade e da localização das regiões de DNAr, é possível, também, estabelecer o relacionamento filogenético entre espécies próximas (MARTINS; GALETTI, 1999; ABD EL-TEAB; KONDO, 2006).

Nos insetos, quanto ao ciclo nucleolar, predominam as abordagens de quantidade de nucléolos, a fragmentação e a persistência nucleolar, assim como a quantidade e localização das regiões organizadoras nucleolares (RONS) (FOSSEY; LIEBENBERG, 1995; TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; CATTANII; PAPESCHI, 2004; MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004; BARDELLA et al., 2008). Os sítios de DNAr distribuem-se tanto nos autossomos como nos cromossomos sexuais, evidenciando variação de

localização física destes segmentos (CABRERO et al., 2003; CATTANI; PAPERESCHI, 2004).

## **2 Objetivos**

---

## 2 Objetivos gerais

No presente trabalho foram analisadas as características citogenéticas e ultraestruturais dos túbulos seminíferos de cinco espécies do gênero *Triatoma* (*Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Triatoma infestans melanosoma*, *Triatoma matogrossensis* e *Triatoma rubrovaria*), com ênfase à:

- localização das células císticas; comportamento nucleolar; distribuição heterocromática e sítios de DNAr nessas células.

- diferenciação cariotípica, distribuição e caracterização das regiões heterocromáticas e localização das regiões de DNAr;

**3 Artigos científicos** (à serem submetidos para publicação em revistas especializadas)

---

### 3.1 Características ultraestruturais e citogenéticas das células císticas no gênero *Triatoma* (Heteroptera, Reduviidae)

**Autoria:** Bardella, V. B.<sup>1</sup>; Silistino, R.<sup>1</sup>; Vanzella, A. L. L.<sup>2</sup>, Azeredo-Oliveira, M. T. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

**Resumo:** Nos heterópteros a meiose é cística e cada cisto espermatogonial é envolto por uma célula cística. Esse tipo celular também é conhecido como células nutritivas e desenvolvem a função de nutrição das células em divisão celular. O presente estudo caracterizou a localização, a ultraestrutura e os aspectos citogenéticos das células císticas. Foram utilizadas cinco espécies de triatomíneos, nos quais os túbulos seminíferos foram submetidos às técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, coloração convencional (orceína) e impregnação por íons prata (AgNOR), bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 45S de *Drosophila melanogaster*. A célula cística envolve um cisto espermatogonial, possui um grande núcleo e sulcos no envoltório nuclear. Em todas as espécies foram observados vários graus de ploidia da célula cística. *Triatoma infestans* e *Triatoma infestans melanosoma* apresentaram vários blocos heterocromáticos com a periferia CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e o interior DAPI<sup>+</sup>. Associada a borda dos blocos heterocromáticos foram observados os

segmentos de DNAr 45S, além da presença de vários nucléolos em cada núcleo. *Triatoma matogrossensis*, *T. rubrovaria* e *T. brasiliensis* apresentaram apenas um bloco heterocromático com as mesmas características. No entanto, *T. brasiliensis* apresentou em algumas células vários blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> dispersos. Nessa espécie foi observado apenas um nucléolo e localização dos sítios de DNAr similar às demais espécies. Os aspectos ultraestruturais (sulcos e tamanho nuclear) associados aos dados citogenéticos (diversos sítios de DNAr 45S) sugeriram o evento de poliploidização como atuante no aumento da atividade sintética da célula cística. Foi também sugerido que a quantidade de regiões heterocromáticas apresentada pelas espécies estudadas influenciaria na formação dos dois tipos morfológicos das células císticas. O estudo possibilitou o melhor entendimento da organização testicular e dos aspectos ultraestruturais e citogenéticos da célula cística além de reforçar a função sintética deste tipo celular.

**Palavras-chave:** célula cística; DNA ribossômico (DNAr); heterocromatina; Heteroptera; nucléolo; região organizadora nucleolar (RONs)

## 1 Introdução

Os túbulos seminíferos nos invertebrados são constituídos por três tipos celulares básicos: as células germinativas, as células apicais e as células císticas. Essas últimas também são denominadas de células acessórias, e, assim com as células apicais, são de origem somática (ABOÏM, 1945). Nos ovários, esse tipo celular é denominado célula nutritiva e localiza-se na câmara trófica (BONHAG,



WICK, 1985), enquanto que as células císticas envolvem os cistos espermatogoniais na organização testicular (SCHMIDT, DORN, 2004).

As células císticas proporcionam o suporte nutritivo das células em divisão celular nos aparelhos reprodutivos dos machos e das fêmeas (GURAYA, 1995). A principal característica morfológica deste tipo celular é a poliploidização, que ocorre em vários eventos de endomitoses resultando no aumento do núcleo das células císticas (CRUZ-LANDIM, 2001). Os estudos ultraestruturais, morfológicos e citogenéticos são escassos nas células císticas de triatomíneos, bem como estudos relacionados ao comportamento nucleolar e distribuição da heterocromatina.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Material biológico**

Foram utilizados machos adultos de *Triatoma brasiliensis* (15 exemplares), *Triatoma infestans* (6 exemplares), *Triatoma infestans melanosoma* (14 exemplares), *Triatoma matogrossensis* (11 exemplares) e *Triatoma rubrovaria* (10 exemplares) fornecidos pelo Insetário de Triatominae, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araraquara-SP) e pelo Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT), FIOCRUZ (Rio de Janeiro-RJ).

## **2.2 Análise ultraestrutural ao microscópio eletrônico de transmissão**

Fragmentos de túbulos seminíferos foram fixados em solução de *Karnovsky* 2%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, a 4 °C, por 3 horas, e pós fixados em tetróxido de ósmio 1%, durante 1 hora, a 4 °C. O material foi desidratado e incluído em resina Araldite 502. Posteriormente, os cortes ultrafinos de 50 nm foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e submetidos à análise ao microscópio eletrônico ZEISS-LEO 906 (UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto-SP).

## **2.3 Confeção das lâminas**

Os túbulos seminíferos foram fixados em metanol: ácido acético (3:1, v:v), e conservados à -20°C até o uso. No preparo das lâminas, os túbulos foram submetidos a dois banhos em água destilada, por cinco minutos cada. Em seguida, foram incubados em ácido acético 45%, por 10 minutos e, posteriormente, foi realizada a dilaceração e o esmagamento dos túbulos seminíferos. A lamínula foi retirada em nitrogênio líquido.

## **2.4 Coloração convencional e Impregnação por íons prata**

O material foi submetido à técnica convencional de orceína lacto-acética (DE VAIO et al., 1985) e de impregnação por íons prata (HOWELL, BLACK, 1980). As lâminas foram montadas com balsamo do Canadá.

### **2.5 Bandamento-C**

Para o bandamento-C clássico (Giemsa) (SUMMER, 1982), as lâminas foram incubadas em 0,2M HCl, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e incubadas em hidróxido de bário 5%, por 15 minutos, a 60 °C e em 2× SSC, pH 7,0, por 60 minutos, a 60 °C. As lâminas foram desidratadas em álcool 70% e 100%, por 10 minutos cada, e coradas com Giemsa 4%, por 1-2 minutos e montadas em Entelan. Para o bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI as lâminas foram submetidas ao mesmo tratamento, exceto a coloração por Giemsa 4%, e tratadas com fluorocromos: 0,5 mg/mL CMA<sub>3</sub>, por 1,5 h e 2 µg/mL DAPI, por 30 minutos. As lâminas foram montadas com a composição de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) 1:1, mais 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

### **2.6 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Heslop-Harrison et al. (1991) e Cuadrado e Jouve (1994), com modificações. Foi utilizada a sonda pDm238 de DNA ribossomal, que contem os genes 18S, 5,8S, 28S mais os espaçadores intergênicos de *Drosophila melanogaster*, inseridos no plasmídeo pBR322 (ROHIA et al., 1981). Essa sonda foi marcada com biotina-14-

dATP por *nick translation*. Cada lâmina foi incubada com 30  $\mu\text{L}$  de mistura de hibridização, que contem 100 ng de sonda marcada (4  $\mu\text{L}$ ), 50% formamida (15  $\mu\text{L}$ ), 50% polietileno glicol (6  $\mu\text{L}$ ), 20 $\times$ SSC (3  $\mu\text{L}$ ), 100 ng de timo bovino DNA (1  $\mu\text{L}$ ) e 10% SDS (1  $\mu\text{L}$ ). O material foi desnaturado a 90 °C, por 10 minutos e a hibridização foi realizada *overnight*, a 37 °C, em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 2 $\times$  SSC, 20% formamida em 0,1 $\times$  SSC, 0,1 $\times$  SSC e 4 $\times$  SSC/0,2% *Tween* 20, todos a 37 °C. A sonda foi detectada por uma solução contendo 5% BSA, avidina-FITC, e os banhos pós-deteção foram conduzidos em 4 $\times$  SSC/0,2% *Tween* 20, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com 26  $\mu\text{L}$  de uma composição com 23  $\mu\text{L}$  de solução DABCO e glicerol (90%), em água destilada, 2  $\mu\text{L}$  de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI e 1  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$ .

## 2.7 Aquisição das imagens

Todas as imagens foram adquiridas separadamente sem cor (escala de cinza) utilizando-se o microscópio Leica DM 4500 B, equipado com a câmera DFC 300FX. A sobreposição das imagens tanto para o bandamento-CMA<sub>3</sub>/DAPI (em amarelo e azul, respectivamente), quanto para a técnica de FISH (DAPI, em vermelho e sonda de DNAr 45S, verde) foi realizada utilizando-se o *software* Leica IM50 4.0. As imagens foram otimizadas para melhor contrastação e brilho com o *software* *iGrafx Image*.

### 3 Resultados

A análise ultraestrutural evidenciou a presença de uma célula cística envolvendo um cisto espermatogonial (Figura 1a). O núcleo apresentou especialização do envoltório nuclear (sulcos nucleares) e a área nuclear foi maior que o núcleo das espermatogônias (Figura 1a). O citoplasma apresentou-se delgado ao redor de todo o cisto, sendo observadas várias mitocôndrias (Figura 1a-b).

Nos túbulos seminíferos das cinco espécies foi possível identificar diferentes graus de poliploidia celular nas células císticas interfásicas, representados na Figura 2a-d pela espécie *Triatoma infestans*.

A Figura 3a-l representa as características citogenéticas heterocromáticas das células císticas interfásicas. Nas espécies *Triatoma infestans* (não apresentado) e *T. infestans melanosoma* foram observados vários blocos heterocromáticos dispersos (Figura 3a), com região interna DAPI<sup>+</sup> e a região periférica CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Figura 3d,g,j). Diferentemente, *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. matogrossensis* (não apresentado) exibiram apenas um bloco heterocromático. Entretanto, este tipo nuclear compartilhou as mesmas características citogenéticas das demais espécies analisadas (Figura 3b-c, e-f, h-i, k-l). Uma exceção foi observada em *T. brasiliensis* que, em alguns casos, apresentou um bloco heterocromático maior e vários blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> menores (Figura 3b, e, h, k).

Na Figura 4 estão representadas as características citogenéticas nucleolares das células císticas dos triatomíneos analisados. A técnica de impregnação por

íons prata (Figura 4a-c) indicou a quantidade variada de nucléolos e a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) demonstrou a localização dos sítios de DNAr 45S (Figura 4d-f). As espécies *T. infestans* (não apresentada) e *T. infestans melanosoma* exibiram vários nucléolos (Figura 4a) e sítios de DNAr 45S nas bordas das regiões heterocromáticas (Figura 4d). Nas demais espécies *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. matogrossensis* (não apresentada) apenas um único nucléolo foi evidenciado (Figura 4b, c), e os sítios de DNAr 45S foram localizados novamente nas bordas dos blocos heterocromáticos (Figura 4e-f).

#### **4 Discussão**

O túbulo seminífero apresentou apenas uma célula cística ao redor do cisto espermatogonial. Organizações testiculares similares a essa foram observadas em espécies de abelhas (CRUZ-LANDIM, 2001). Outra variação para esse modelo foi proposto por WILDE (1964), no qual uma ou mais células císticas circundariam um cisto espermatogonial em insetos.

A análise ultraestrutural evidenciou a especialização do envoltório nuclear das células císticas. Fricker et al. (1997) sugeriram que os sulcos nucleares relacionam-se com a amplificação da superfície nuclear, promovendo o aumento nas trocas núcleo-citoplasmáticas. Esta especialização nuclear já foi relatada tanto em células animais quanto em células vegetais (LUI et al., 1998; COLLINGS et al., 2000). Portanto, essa especialização do envoltório nuclear sugere o aumento da atividade sintética das células císticas.

Amplos estudos mostram a relação entre a célula cística e a nutrição das células em divisão celular (KLUGLER et al., 2006). Para desempenhar essa função a síntese deste tipo celular seria aumentada por meio da poliploidização ou pela presença de cromossomos politênicos. A ocorrência de grande extensão nuclear e os vários sinais de segmentos de DNAr sugerem a relação do aumento de síntese com o evento de poliploidização nas espécies estudadas. Tal fator ocorre na maioria dos heterópteros (BECKER, NAGL, 1994; SCHMIDT et al., 2002). Entretanto, em espécies de dípteros o aumento da síntese na célula cística é associado à presença de cromossomos politênicos (HARTMAN, SOUTHERN, 1995).

A variação no número de cromocentros observada nos núcleos das células císticas nas espécies *T. infestans* e *T. infestans melanosoma* também foi relatada por De Vaio et al. (1985), em *T. infestans* e *T. rubrovaria*. Entretanto, o presente trabalho observou a ocorrência de apenas um cromocentro para *T. rubrovaria*, assim como para *T. brasiliensis* e *T. matogrossensis*. A diferença no número de cromocentros em *T. rubrovaria* pode estar relacionada ao estudo de diferentes populações dessa espécie.

A ocorrência de dois tipos nucleares (núcleo com um bloco heterocromático ou vários) foi associada à quantidade de heterocromatina apresentada por cada espécie, como apresentado por Bardella et al. (2010). Essa mesma associação também foi proposta por De Vaio et al. (1985).

Outra característica associada aos blocos heterocromáticos foi a disposição da heterocromatina, rica em CMA<sub>3</sub>, periférica à região DAPI<sup>+</sup>. Além disso, também foi observada a riqueza dos sítios de DNAr 45S na periferia dos blocos

heterocromáticos. Essa distribuição pode sugerir um aumento da atividade sintética na periferia da região heterocromática. A maior atividade sintética na periferia de regiões heterocromáticas já foi relatada em outros tipos celulares refletindo a maior facilidade transcricional nessas regiões (HESLOP-HARRISON, 2000). Além disso, a disposição de regiões heterocromáticas próximas às regiões nucleolares reafirma a íntima associação entre essas, corroborando o observado em diferentes organismos e tipos celulares (AZEREDO-OLIVEIRA, 1995; ANHÊ, 2007).

A grande quantidade de nucléolos observada em *T. infestans* e *T. infestans melanosoma* sugere uma atividade sintética maior nas células císticas. Em células com escassa síntese protéica, como os espermatozóides, blastômeros e células musculares, os nucléolos são pequenos ou ausentes; ao contrário, são volumosos em ovócitos, neurônios e células secretoras, nas quais a síntese protéica é importante. Portanto, o tamanho e o número de nucléolos por célula dependem do seu estado funcional, assim quanto maior a atividade celular maior será o tamanho e o número de nucléolos (BICUDO, 1979).

O presente trabalho confirmou a atividade sintética da célula cística com base na especialização do envoltório nuclear, no evento de poliploidização e pela quantidade dos sítios de DNAr e nucléolos. Os resultados também reforçaram que a alta atividade sintética da célula cística está intimamente relacionada com a função de nutrição das células em divisão celular, como o observado em outros insetos.

## **5 Agradecimentos**



Os autores agradecem ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, coordenador do Insetário de Triatominae, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara-SP) e ao Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT), FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ), pela disponibilidade e pelo fornecimento de insetos. À Profa. Dra. Shirley Recco-Pimentel (Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP) pelo fornecimento das sondas de DNAr 45S. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (Processo n. 132576/2008-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

## 6 Referências Bibliográficas

ABOÏM, A. N. Développement embryonnaire et post-embryonnaire des gonades normales et agamétiques de *Drosophila melanogaster*. **Rev Suisse Zool**, v. 52-53, p. 154, 1945.

ANHÊ, A. B. C. **Estudo citoquímico e ultra-estrutural em glândulas salivares de triatomíneos (Heteroptera, Triatominae)**. 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2007.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. **Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)**. 1990. 250f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 1995.

BARDELLA, V. B.; GAETA, M.; VANZELA, A. L. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Localização cromossômica de sítios heterocromáticos e de DNAr 45S em triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae). A ser submetido, 2010.

BECKER, T. A.; NAGL, W. Disproportionate numbers of rDNA loci in diploid and polyploidy testis nuclei of *Gerris najas* detected by fluorescence in situ hybridization. **Cell Biology International**, v. 18, n. 4, p. 245-255, 1994.

BICUDO, H. E. M. C. **Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo mulleri (grupo repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar.** 1979. 209f. Tese de Livre-Docência. - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 1979.

BOHANG, G. P.; WICK, J. R. The functional anatomy of the male and female reproductive systems of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae). **Journal of Morphology**, v. 93, p. 177-283, 1985.

CRUZ-LANDIM, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) Testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia**, v. 91, p. 183-189, 2001.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 5x-Triticale. **Chromosome Research**, v. 2, p. 231-338, 1994.

DE VAIO, E. S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M. et al Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.

FRICKER, M.; HOLLINSHEAD, M.; WHITE, N.; VAUX, D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. **Journal of Cell Biology**, v. 136, p. 1997.

GURAYA, S. S. The comparative cell biology of accessory somatic (or Sertoli) cells in the animal testis. **International Review of Cytology**, v. 160, p. 163-220, 1995.

HARTMAN, T. V.; SOUTHERN, D. I. Genome reorganization from polyteny to polyploidy in the nurse cell found in onion fly (*Delia antiqua*) and cabbage root fly (*Delia radicum*) ovaries (Diptera, Anthomyiidae). **Chromosome Research**, v.3, p. 271-28, 1995.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI, M.; LEITCH, I. J. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique**, v. 3, p. 106-109, 1991.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, v. 12, p. 617-635, 2000.

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.

KLUGLER, J. M.; RÜBSAM, R.; TRAUNER, J.; BÜNING, J. The larval development of the telotrophic meroistic ovary in the bug *Dysdercus intermedius* (Heteroptera, Pyrrhocoridae). **Arthropod Structure & Development**, v. 35, p. 99-110, 2006.

LUI, P. P. Y.; KONG, S. K.; KWOK, T. T.; LEE, C. Y. The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for  $CA^{2+}$  signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, p. 88-93, 1998.

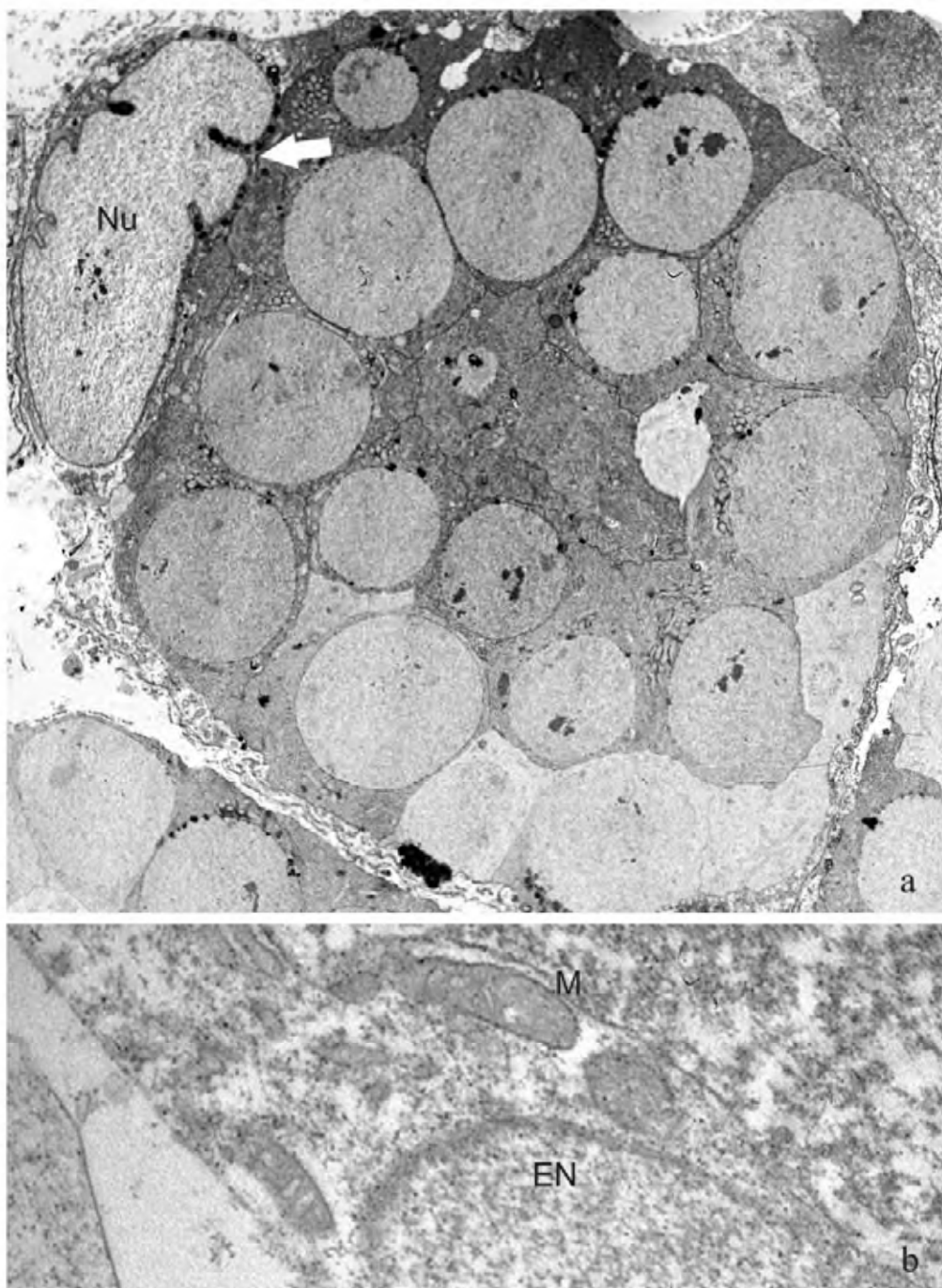
ROHIA, H.; MILLER, J. R.; WOODS, L. C.; GLOVER, D. M. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 290, n. 5809, p. 749-753, 1981.

SCHMIDT, E. D.; SEHN, E.; DORN, A. Differentiation and ultrastructure of the spermatogonial cyst cells in the milkweed *Oncopeltus fasciatus*. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 42, p. 163-178, 2002.

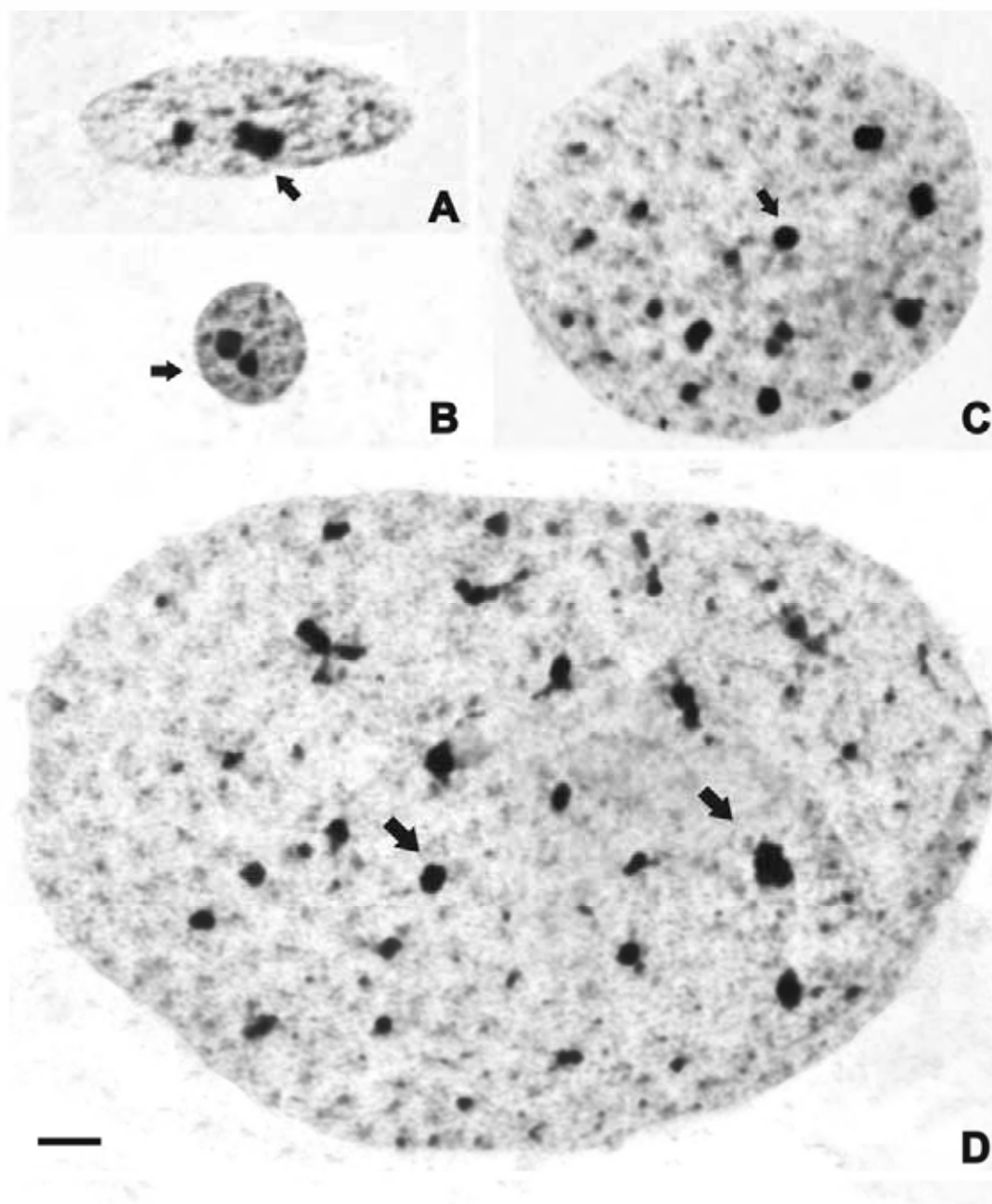
SCHMIDT, E. D.; DORN, A. Structural polarity and dynamics of male germline stem cells in the milkweed bug (*Oncopeltus fasciatus*). **Cell Tissue Research**, v. 318, p. 383-394, 2004.

SUMMER, A. T. The nature of mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetic**, v. 6, p. 59-87, 1982.

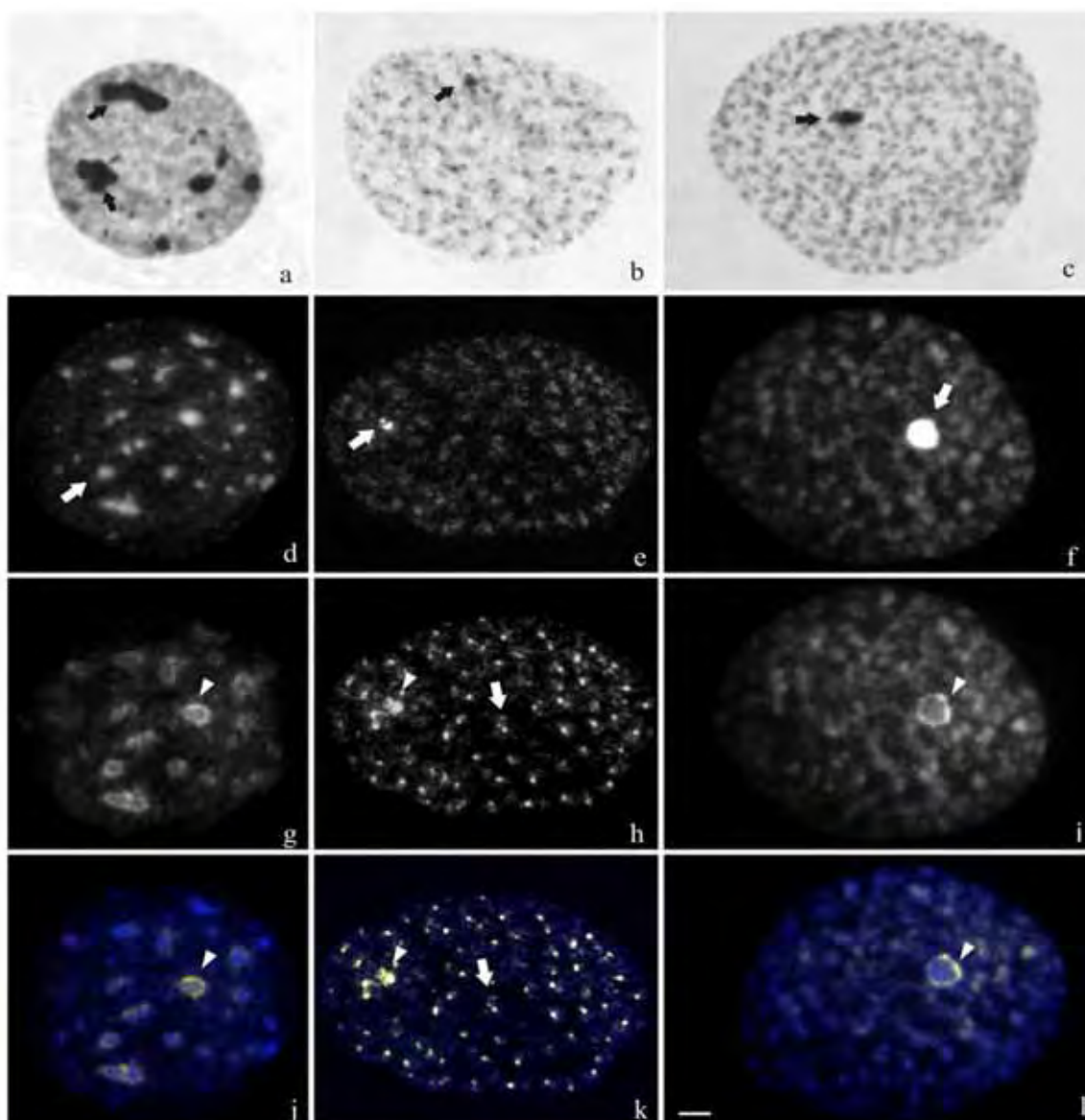
WILDE, J. Reproduction. - In Rockstein, M. The physiology of Insecta. V. 1 Ac. Press. **New York**, 1964.



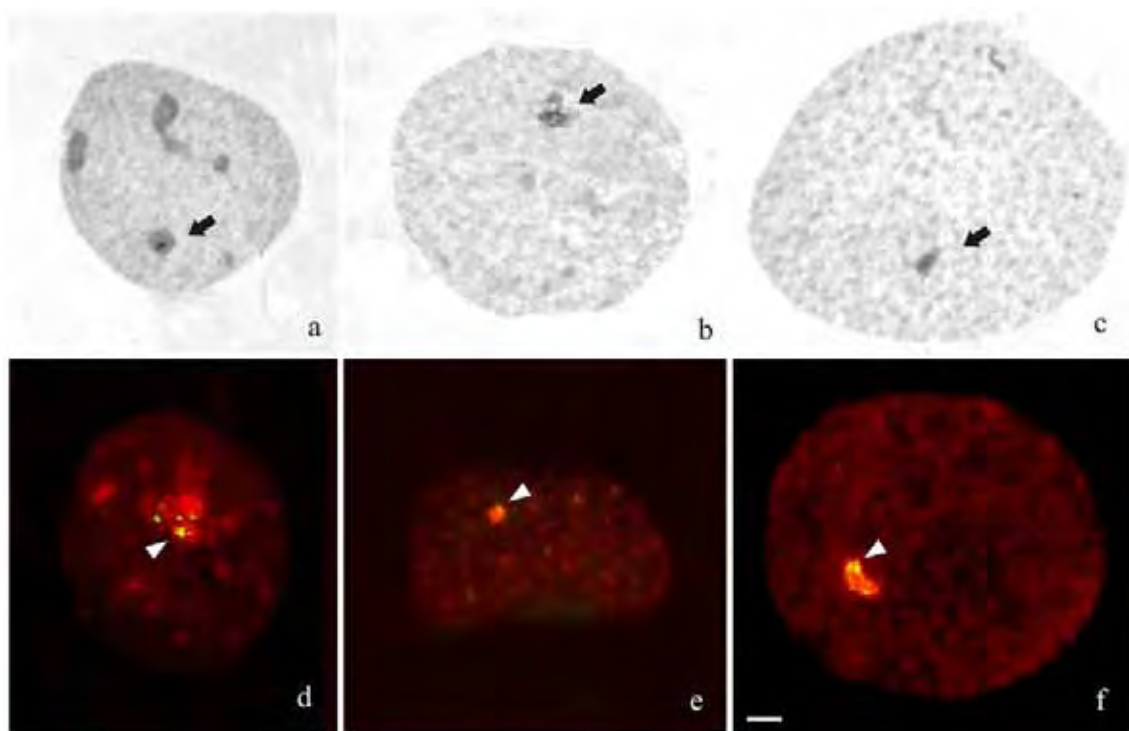
**Figura 1.** Análise ultraestrutural do túbulo seminífero de *Triatoma infestans*. (a) Célula cística envolvendo um cisto espermatogonial, apresentando um grande núcleo (Nu) com invaginações citoplasmáticas (seta) e citoplasma delgado. (b) Região citoplasmática evidenciando a presença de mitocôndrias (M) próximas ao envoltório nuclear da célula cística (EN).



**Figura 2.** Células do túbulo seminífero de *Triatoma infestans* submetidas à técnica de orceína lacto-acética. (a-b) Núcleo poliplóide de tamanho pequeno. (c) Núcleo poliplóide intermediário. (d) Núcleo poliplóide maior. Notar os corpúsculos heteropicnóticos dispersos no núcleo (setas). Barra = 5 $\mu$ m.



**Figura 3.** Células dos túbulos seminíferos de *Triatoma infestans melanosoma* (a, d, g, j), *T. brasiliensis* (b, e, h, k) e *T. rubrovaria* (c, f, i, l) submetidas ao bandamento-C (Giemsa) (a, b, c) e bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI (d-l). (a) Núcleo poliplóide com vários blocos heterocromáticos (setas). (b-c) Núcleos poliplóides com apenas um bloco heterocromático (seta). (d-i) Núcleos poliplóides com corpúsculos internamente DAPI<sup>+</sup> (seta) e periféricamente CMA<sup>+</sup> (ponta de seta). Observar em h, k a presença de vários corpúsculos CMA<sup>+</sup> dispersos. Notar em j, k, l a sobreposição das imagens (DAPI/CMA<sub>3</sub>). Barra = 5µm.



**Figura 4.** Células dos túbulos seminíferos de triatomíneos submetidas à impregnação por íons prata (a-c) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sonda de DNAr 45S. Contra-coloração: sonda com FITC (verde) e núcleo com DAPI (vermelho) (d-f). (a, d) *Triatoma infestans melanosoma* apresentando núcleos com vários nucléolos (seta) e sinais de hibridização nas bordas da região heterocromática (ponta de seta). (b,e) *Triatoma brasiliensis* e *T. rubrovaria* (c,f) apresentando núcleos com uma região nucleolar (b,c - seta) e segmentos de DNAr ao redor da região heterocromática (e,f - ponta de seta). Barra = 5 $\mu$ m.



### 3.2 Localização cromossômica de sítios heterocromáticos e de DNAr 45S em triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae)

**Autoria:** Bardella, V. B.<sup>1</sup>; Gaeta, M.<sup>2</sup>; Vanzela, A. L. L.<sup>2</sup>; Azeredo-Oliveira, M. T. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP/IBILCE), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil.

**Resumo:** A subfamília Triatominae distribui-se, principalmente, na América Central e do Sul, sendo todas as espécies possíveis transmissoras da doença de Chagas. Este grupo é caracterizado pela baixa variabilidade cariotípica, pela ocorrência de cromossomos holocinéticos e por possuir meiose invertida nos cromossomos sexuais. Neste trabalho foi analisado o cariótipo de quatro espécies do gênero *Triatoma*, por meio do bandamento cromossômico C CMA<sub>3</sub>/DAPI e pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sonda de DNAr 45S. Todas as amostras apresentaram  $2n = 20A + XY$ , com decréscimo do tamanho relativo dos cromossomos, que, em *T. infestans melanosoma*, foram divididos em grupos, com base no tamanho relativo dos cromossomos. A heterocromatina nessa espécie apresentou blocos DAPI<sup>+</sup> adjacentes a outros CMA<sup>+</sup>, em ambos os terminais de três pares de autossomos maiores. Uma marcação terminal DAPI<sup>+</sup> também foi observada em um pequeno par autossômico (uma extremidade) e no

cromossomo X (ambas as extremidades), sendo o cromossomo Y caracterizado como totalmente DAPI<sup>+</sup>. Nas espécies *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* a heterocromatina foi restrita ao cromossomo Y, que foi caracterizado como DAPI<sup>+</sup> (sinal fraco). A técnica FISH indicou diferenças no número, na localização e na intensidade dos sinais de hibridização. *Triatoma brasiliensis* e *T. rubrovaria* apresentaram o sinal em um par autossômico, sendo que nessa última espécie houve também variação na intensidade do sinal entre os homólogos. A diferença entre os sítios de hibridização também foi observada entre os cromossomos sexuais de *T. matogrossensis*. As espécie *T. infestans melanosoma* apresentou sítio de DNAr apenas no cromossomo X. As análises convencionais e de bandamento fluorescente sugerem uma proximidade entre as espécies *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* e um cariótipo diferenciado para *T. infestans melanosoma*.

**Palavras-chave:** DNA ribossômico (DNAr); cromossomos holocinéticos; heterocromatina, hibridização *in situ* fluorescente (FISH); *Triatoma*.

## 1 Introdução

O grupo Triatominae é constituído por insetos transmissores da doença de Chagas, que afeta cerca de 13 a 15 milhões de pessoas nas Américas (MENDONÇA et al., 2009). Além da sua importância medico-sanitária, os triatomíneos são notáveis devido a não diferenciação morfológica cromossômica a partir da região centromérica (PANZERA et al., 1996). Insetos pertencentes à

subordem Heteroptera, assim como as ordens Homoptera, Lepdoptera e Trichoptera, possuem cromossomos holocinéticos (WOLF, 1996). Durante a mitose as cromátides movimentam-se de modo paralelo devido ao cinetócoro difuso (comportamento holocinético) e, na meiose, os autossomos são quiasmáticos e os cromossomos sexuais são aquiasmáticos (UESHIMA, 1979). Além disso, existem evidências de meiose pós-reducional para os cromossomos sexuais (SOLARI, 1979).

A natureza holocinética dos cromossomos permite a ocorrência de variações cariotípicas intra e interespecíficas em Heteroptera. O cariótipo comum para Triatominae é  $2n = 20A + XY$  (PANZERA et al., 1996) e os estudos com bandamento cromossômico indicaram poucas bandas heterocromáticas, que são frequentemente localizadas nas regiões terminais dos cromossomos (REBAGLIATI et al., 2003). O uso do bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI revelou, para a maioria dos insetos, blocos ricos em CG associados a regiões organizadoras nucleolares (RONs) (MANDRIOLI et al., 1999; REBAGLIATI et al., 2003; GOLUB et al., 2004). Estudos envolvendo a localização do DNA ribossômico têm mostrado sítios tanto em autossomos quanto nos cromossomos sexuais (GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 1996; CATTANI et al., 2004). Apesar das RONs serem usadas como um excelente marcador para o entendimento do comportamento dos cromossomos holocinéticos, a localização do DNA ribossômico (DNAr) e as relações cariotípicas entre as espécies de triatomíneos ainda não são esclarecidas. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o complemento cromossômico quanto ao tamanho cromossômico, a detecção das

áreas heterocromáticas e sítios de DNAr para elucidar a distribuição desses segmentos na organização cariotípica de quatro espécies de triatomíneos.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Material biológico**

Machos adultos de *Triatoma brasiliensis* (15 espécimens), *T. infestans melanosoma* (14 espécimens), *T. matogrossensis* (11 espécimens) e *T. rubrovaria* (10 espécimens) foram utilizados no estudo. Esses insetos foram provenientes do Insetário de Triatominae, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araraquara-SP) e pelo Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT), FIOCRUZ (Rio de Janeiro-RJ).

### **2.2 Preparação cromossômica**

Os túbulos seminíferos foram fixados em metanol: ácido acético (3:1, v:v), e conservados à -20 °C, até o uso. No preparo das lâminas os túbulos seminíferos foram submetidos a dois banhos em água destilada, por cinco minutos cada. Em seguida, foram incubados em ácido acético 45%, por 10 minutos e, posteriormente, foi realizada a dilaceração e o esmagamento celular. A lamínula foi retirada em nitrogênio líquido.

### **2.3 Medições cromossômicas**

Foram utilizadas as fotomicrografias de duas metáfases de cinco indivíduos diferentes de cada espécie para a mensuração cromossômica. A medição foi realizada manualmente, com a utilização de compasso com ponta seca. Foram medidas as distâncias entre cada extremidade da estrutura em caixa formada pelos cromossomos homólogos. Os cromossomos sexuais foram medidos separadamente. As medidas foram ordenadas de modo decrescente e posteriormente, foram calculadas as médias e os desvios padrões. Em seguida, foi gerado um gráfico com os valores obtidos.

### **2.4 Bandamento cromossômico**

As lâminas foram confeccionadas como descrito na preparação cromossômica e submetidas ao bandamento-C, de acordo com SUMMER (1982), com modificações. As lâminas foram incubadas a 0,2M HCl, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e incubadas em hidróxido de bário 5%, por 15 minutos, a 60 °C e em 2× SSC, pH 7,0, por 60 minutos, a 60 °C. As lâminas foram desidratadas em álcool 70% e 100%, por 10 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com fluorocromos: 0,5 mg/mL CMA<sub>3</sub>, por 1,5 h e 2 µg/mL DAPI, por 30 minutos, sendo, posteriormente, montadas com a composição de glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) 1:1, mais 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

## 2.5 Hibridização *in situ* fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com HESLOP-HARRISON et al. (1991) e CUADRADO e JOUVE (1994), com modificações. Foi utilizada a sonda pDm238 de DNA ribossomal, que contem os genes 18S, 5,8S, 28S, mais os espaçadores intergênicos de *Drosophila melanogaster*, inseridos no plasmídeo pBR322 (ROHIA et al., 1981). Essa sonda foi marcada com biotina-14-dATP, por *nick translation*. Cada lâmina foi incubada com 30 µL de mistura de hibridização contendo 100 ng de sonda marcada (4 µL), 50% formamida (15 µL), 50% polietileno glicol (6 µL), 20× SSC (3 µL), 100 ng de timo bovino DNA (1 µL) e 10% SDS (1 µL). O material foi desnaturado a 90 °C, por 10 minutos e a hibridização foi realizada *overnight*, a 37 °C, em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 2× SSC, 20% formamida em 0,1× SSC, 0,1× SSC e 4× SSC/0,2% *Tween* 20, todos a 37 °C. A sonda foi detectada por uma solução contendo 5% BSA, avidina-FITC, e os banhos pós-deteção foram conduzidos em 4× SSC/0,2% *Tween* 20, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com 26 µL de uma composição com 23 µL de solução DABCO e glicerol (90%), em água destilada, 2 µL de 2 µg/mL de DAPI e 1 µL de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>.

## 2.6 Aquisição das imagens

Todas as imagens foram adquiridas separadamente sem cor (escala de cinza) utilizando-se o microscópio Leica DM 4500 B, equipado com a câmera DFC 300FX. A sobreposição das imagens tanto para o bandamento-CMA<sub>3</sub>/DAPI (em amarelo e azul, respectivamente), quanto para a técnica de FISH (DAPI, em vermelho e sonda de DNAr 45S, em verde) foi realizada utilizando-se o *software* Leica IM50 4.0. As imagens foram otimizadas para melhor contrastação e brilho com o *software* *iGrafx Image*.

### 3 Resultados

Todas as espécies apresentaram cariótipo  $2n = 20A + XY$ , com evidente diminuição do tamanho cromossômico. Esta característica foi mais acentuada em *T. infestans melanosoma*, sendo os autossomos organizados em dois grupos (Figura 1). O grupo A foi composto por três grandes pares (1, 2 e 3), representando 42,8% do cariótipo, enquanto que o grupo B, com sete pares (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), alcançou 47,67% do cariótipo (Figura 1 e Tabela 1). *Triatoma infestans melanosoma* exibiu regiões heterocromáticas em ambos os terminais dos três maiores autossomos (grupo A) (Figura 2a-b). Neste caso foram visualizados blocos terminais ricos em AT (Figura 2a), adjacentes à blocos ricos em CG (Figura 2b). Os blocos ricos em AT foram encontrados também em um autossomo do grupo B (Figuras 2c). Ambos os cromossomos sexuais de *T. infestans melanosoma* apresentaram heterocromatina rica em AT. O cromossomo Y apresentou-se totalmente brilhante, enquanto que o X exibiu apenas uma marcação terminal (Figura 2c-d).

As espécies *Triatoma brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* também apresentaram cariótipos similares com diminuição gradual do tamanho cromossômico (Figura 1 e Tabela 1). Os cromossomos sexuais foram menores que os autossomos com o Y maior que o cromossomo X (Figura 1 e Tabela 1). Na Figura 3 estão representadas as metáfases dessas espécies submetidas ao bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI. As regiões heterocromáticas foram caracterizadas como DAPI<sup>+</sup> por toda a extensão do cromossomo Y, exceto para *T. matogrossensis* que apresentou uma marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> terminal (Figura 3i-j). Blocos heterocromáticos conspícuos foram mais evidenciados nos núcleos do que em metáfases de *Triatoma brasiliensis* (Figura 3g-h). Em *Triatoma matogrossensis* e *T. rubrovaria* essas regiões não foram observadas (Figura 3c-d, k-l).

A técnica de FISH, com sonda de DNAr 45S, indicou diferença na intensidade do sinal entre todas as espécies e entre os cromossomos em *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* (Figura 4). A presença do segmento de DNAr 45S foi observada no cromossomo X de *T. infestans melanosoma*, e em ambos os cromossomos sexuais de *T. matogrossensis* (Figura 4a-b). As espécies *T. brasiliensis* e *T. rubrovaria* apresentaram o sinal de hibridização (DNAr) em um par autossômico (Figura 4c-d).

#### 4 Discussão

O número cromossômico  $2n = 20A + XY$  é o mais comum em Triatominae, encontrado-se também espécies com nove a 11 pares de autossomos



(UESHIMA, 1979). Em geral, os cariótipos dos heterópteros apresentam diminuição gradual do tamanho cromossômico (KUSNETSOVA et al., 2004; LANZONE, SOUZA, 2006). Jacobs (2003) sugeriu que a diminuição em tamanho dos cromossomos poderia ser um fator para o agrupamento de espécies, também propôs que esta característica apareceria em espécies ancestrais, como no gênero *Dundocoris* (Heteroptera, Aradidae). A similaridade dos tamanhos cromossômicos pode sugerir um relacionamento próximo entre *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria*, como o proposto em estudos filogenéticos (SCHOFIELD, GALVÃO, 2009), quando comparados com *T. infestans melanosoma*. O cariótipo dessa última espécie apresentou similaridades com o cariótipo de *Triatoma infestans*, descrito por Pérez et al. (1997), e com *Pachylis argentinus* (Coreidae), apresentado por PAPESCHI et al. (2003). Em todos esses casos os pares cromossômicos foram agrupados em grandes e pequenos. A ocorrência do cromossomo Y sempre maior do que o X, nas quatro espécies estudadas, está de acordo com De Vaio et al. (1985) para o gênero *Triatoma*. Esses resultados reforçam a diferenciação cariotípica entre espécies hematófagas e fitófagas, visto que nesse último grupo o cromossomo X é maior que o Y (REBAGLIATI et al., 2003; CATTANI et al., 2004).

O bandamento cromossômico indicou que a heterocromatina é restrita ao cromossomo Y em *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. matogrossensis*, ao contrário do observado para outros insetos com cromossomos holocinéticos, os quais exibem a heterocromatina tanto nos autossomos quanto nos cromossomos sexuais (LANZONE, DE SOUZA, 2006), como encontrado para *T. infestans melanosoma*. A localização terminal da heterocromatina é uma característica

comum na subordem Heteroptera, sendo também encontrada heterocromatina em blocos intersticiais (CAMACHO et al., 1985; GROVEZA et al., 2004; REBAGLIATI et al., 2003). Outra característica encontrada neste presente trabalho foi a ocorrência de blocos ricos em AT/CG adjacentes nos primeiros três pares de autossomos de *T. infestans melanosoma*, sendo comum em outros estudos a ocorrência de blocos DAPI<sup>+</sup> ou CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (REBAGLIATI et al., 2003). Na maioria das espécies os blocos ricos em CG estão associados à sítios de DNAr. Nos insetos, essa característica foi observada em *Spartocera fusca* (Coreidae) por CATTANI et al. (2004). *Triatoma matogrossensis* também exibiu esse modelo, enquanto que em *T. brasiliensis* e *T. rubrovaria* os segmentos de DNAr 45S não se associaram a blocos ricos em CG. Já, em *T. infestans melanosoma*, esta associação foi observada com regiões ricas em AT. Fossey e Liebenberg (1995) reportaram pela primeira vez sítios de DNAr 45S associados a regiões ricas em AT em *Carlisis wahlbergi* (Coreidae: Heteroptera).

Estudos envolvendo a localização física do DNAr nos heterópteros apresentaram esse segmento tanto nos cromossomos sexuais quanto nos autossomos (PAPESCHI et al., 2003). Desse modo, as quatro espécies estudadas exibiram esta tendência, visto que *T. infestans melanosoma* e *Triatoma matogrossensis* exibiram sinal de hibridização (DNAr 45S) nos cromossomos sexuais e *T. brasiliensis* e *T. rubrovaria* apresentaram essas regiões em um par de cromossomo autossômico. Diferenças também foram detectadas na intensidade do sinal entre todas as espécies e dentro dos cariótipos (*Triatoma matogrossensis* e *T. rubrovaria*). Sanchez-Gea et al. (2000) e Papeschi et al. (2003) observaram o mesmo fato em grupos de Heteroptera e Coleoptera. A diferença de intensidade

entre os sinais de hibridização reflete a diferença de repetições do segmento de DNAr 45S. Essa diferença pode ser explicada por um *crossing-over* desigual, responsável por variações entre homólogos e /ou ampliações e / ou deleções, que podem ser responsáveis por alterações envolvendo homólogos ou heterólogos (em diferentes espécies) em *T. rubrovaria*. Já, para *T. matogrossensis*, como não há *crossing-over* entre os cromossomos sexuais pode ter ocorrido um rearranjo cromossômico como o evento de translocação. Dessa forma, a ampliação do entendimento da evolução cariotípica nas quatro espécies estudadas do gênero *Triatoma*, no presente trabalho, reforça que técnicas citogenéticas clássicas e moleculares podem ser utilizadas como ferramentas para o esclarecimento das relações entre as espécies. Fato exemplificado pela sugestão de um maior relacionamento durante a evolução cromossômica entre as espécies *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* e uma diferenciação cromossômica para *T. infestans melanosoma*.

## 5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, coordenador do Insetário de Triatominae, do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara-SP) e ao Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT), FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ), pela disponibilidade e pelo fornecimento de insetos. À Profa. Dra. Shirley Recco-Pimentel (Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas –

UNICAMP) pelo fornecimento das sondas de DNAr 45S. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (Processo n. 132576/2008-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

## 5 Referências bibliográficas

CAMACHO, J. P. M.; BELDA, J.; CABREJO, J. Meiotic behavior of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-band and silver impregnation. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 27, 1985.

CATTANI, M. V.; GREIZERSTEIN, E. J.; PAPESCHI, A. G. Male meiotic behavior and nucleolus organizer regions in *Camptischium clavipes* (Fabr) (Coreidae, Heteroptera) analyzed by fluorescent banding and in situ hybridization. **Caryologia**, v. 57, n. 3, p.267-273, 2004.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 5x-Triticale. **Chromosome Research**, v. 2, p. 231-338, 1994.

DE VAIO, E. S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M. et al. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.

FOSSEY, A.; LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisis wahlbergi* Stal (Coreidae:Heteroptera). **Cytobios**, v. 81, p. 7-15, 1995.

GOLUB, N. V.; NOKKALA, S.; KUANETSOVA, V. G. Holocentric chromosome of *Psocids* (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA<sub>3</sub> and DAPI. **Folia Biologica (Kraków)**, v. 52, n. 3-4, p. 143-149, 2004.

GROVEZA, S.; KUZNETSOVA, V. G.; NOKKALA, S. Patterns of chromosome banding in four nabid species (Heteroptera, Cimicomorpha, Nabidae). **Hereditas**, v. 140, p. 99-104, 2004.

GONZÁLEZ-GARCIA, J. M.; ANTONIO, C.; SUJA, J. A. et al. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 4, p. 124-132, 1996.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JONSSON, K.; LEITCH, A. R.; SHI, M.; LEITCH, I. J. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. **Technique**, v. 3, p. 106-109, 1991.

JACOBS, D. H. Cytogenetics of the genus *Dundocoris* Hoberlandt (Heteroptera, Aradidae, Carventinae) where chromosome fusion played the dominant role in karyotype evolution. **Caryologia**, v.56, n. 3, p. 233-252, 2003.

KUSNETSOVA, V. G.; GROVEZA, S.; NOKKALA, S. New cytogenetic data on Nabidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with a discussion of karyotype variation and meiotic patterns, and their taxonomic significance. **European Journal of Entomology**, v. 101, p. 201-210, 2004.

LANZONE, C.; DE SOUZA, M. J. C-banding, fluorescent staining and NOR location in holocentric chromosomes of bugs of the Neotropical genus *Antiteuchus* (Heteroptera: Pentatomidae:Discocephalinae). **European Journal of Entomology**, v. 13, p. 239-243, 2006.

MANDRIOLLI, M.; FANASSI, D.; BIZZARO, D.; MANICARDI, G. C. Cytogenetic analysis of the holocentric chromosomes of aphid *Schizaphis graminum*. **Hereditas**, v. 131, p. 185-190, 1999.

MENDONÇA, V. J.; SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R. F.; JÚNIOR, J. M.; JÚNIOR, M. B.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggest its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.

PAPESCHI, A. G.; MOLA, M. L.; BRESSA, M. J. et al. Behaviour of ring bivalents in holocentric systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viruda* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 11, p. 725-733, 2003.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; HORMOS, S.; PANZERA, Y.; CESTAU, R.; DELGADO, V.; NICOLINI, P. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 515-518, 1996.

PÉREZ, R.; PANZERA, F.; PAGE, J.; SUJA, J. A.; RUFAS, S. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 5, p. 47-56, 1997.

REBAGLIATI, P. J.; PAPESCHI, A. G.; MOLA, L. M. Meiosis and fluorescent banding in *Edessa meditabunda* and *E. rufomarginata* (Heteroptera: Pentatomidae: Edessinae). **European Journal of Entomology**, v. 100, p. 11-18, 2003.

ROIHA, H.; MILLER, J. R.; WOODS, L. C.; GLOVER, D. M. Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 290, n. 5809, p. 749-753, 1981.

SANCHEZ-GEA, J. R.; SERRANO, J.; FALIAN, J. Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, v. 43, p. 22-28, 2000.

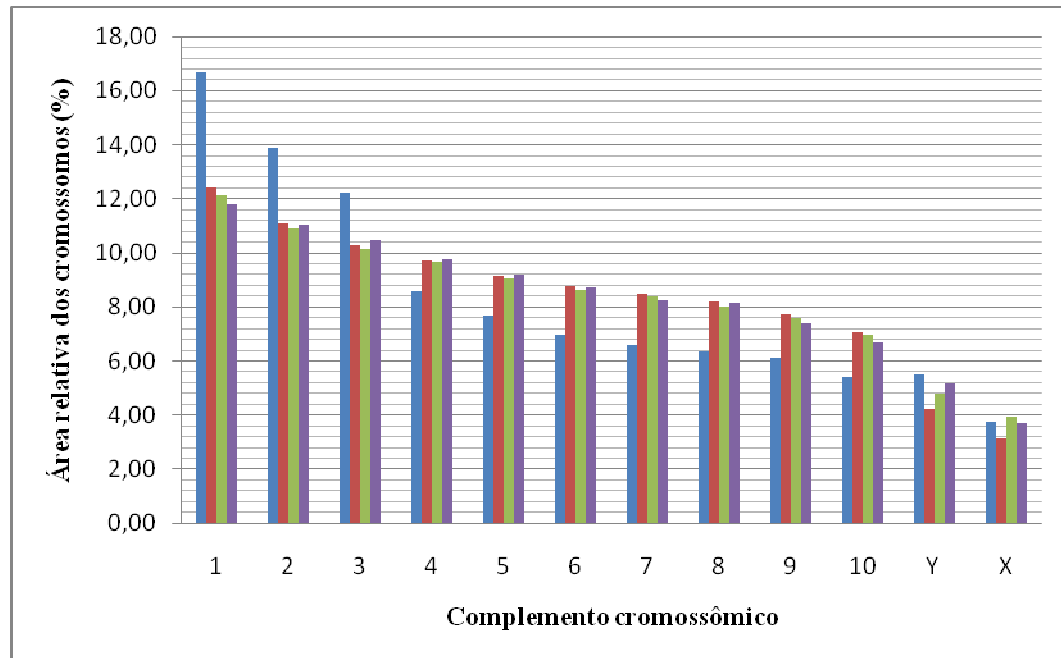
SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v.110, n. 2-3, p.88-100, 2009.

SOLARI, A. J. Autosoma synaptonemal complexes and sex chromosome without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae; Hemiptera). **Chromosoma**, v. 72, p. 225-240, 1979.

SUMMER, A. T. The nature of mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetic**, v. 6, p. 59-87, 1982.

WOLF, K. W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 25, n. 1/2, p. 37-62, 1996.

UESHIMA N. Hemiptera II: Heteroptera. – In: Bernard, J. (ed.). *Animal cytogenetics*. V. 3. **Insecta**. Berlin-Stuttgart, 1979.

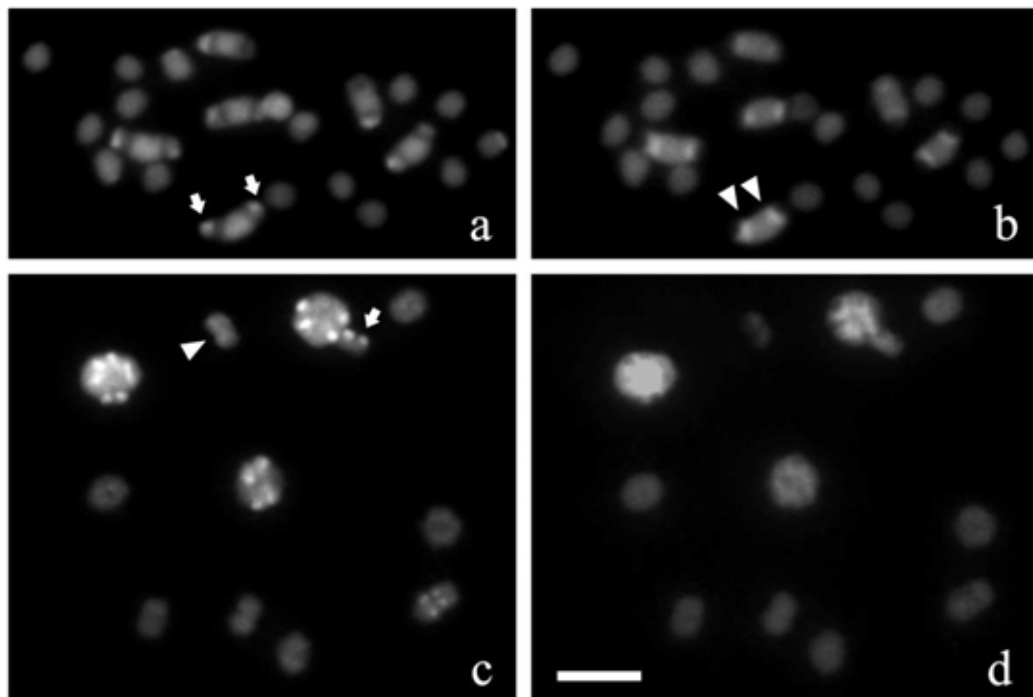


**Figura 1.** Diagrama representativo dos cariótipos baseado nas áreas relativas dos cromossomos. Todas as espécies apresentaram  $2n = 20A + XY$ . *Triatoma infestans melanosoma* (azul) apresentou cariótipo com acentuado decréscimo do tamanho relativo. *Triatoma brasiliensis* (vermelho), *T. matogrossensis* (verde) e *T. rubrovaria* (roxo) apresentaram discreto decréscimo do tamanho relativo dos cromossomos.

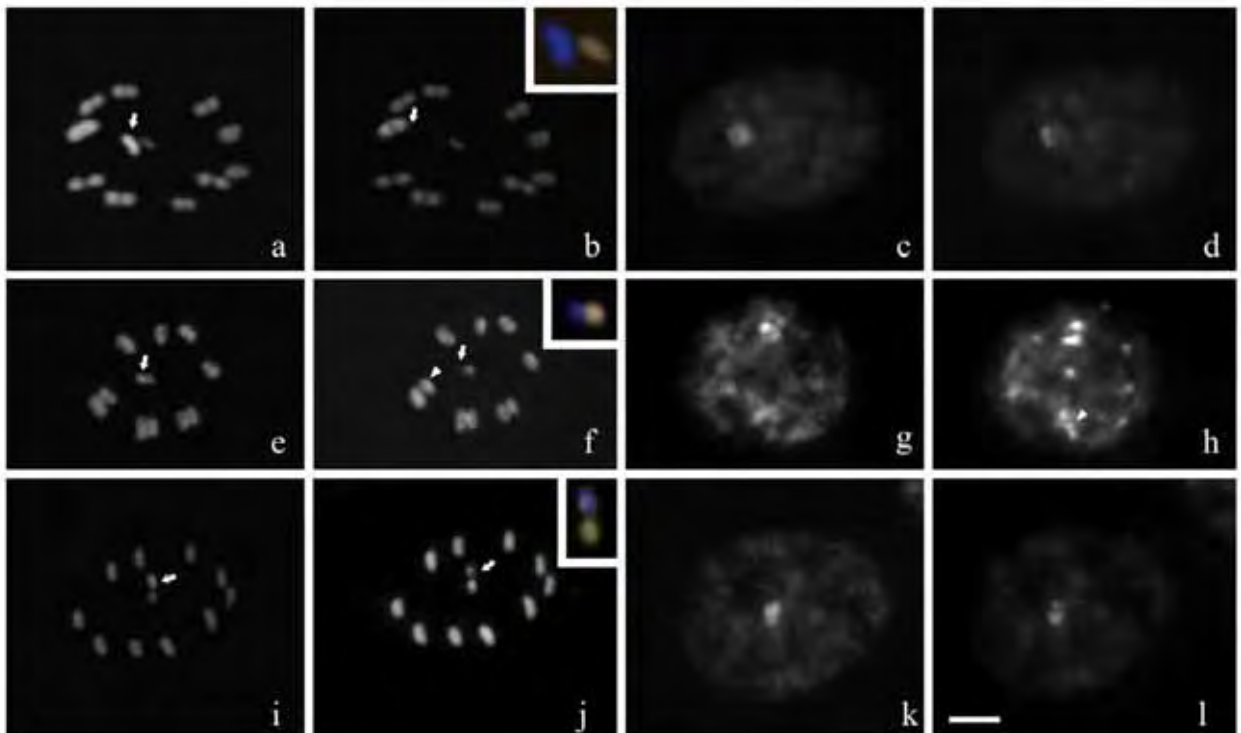


**Tabela 1.** Representação das médias e desvio padrão das áreas relativas dos cromossomos das espécies *Triatoma infestans melanosoma*, *T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria*.

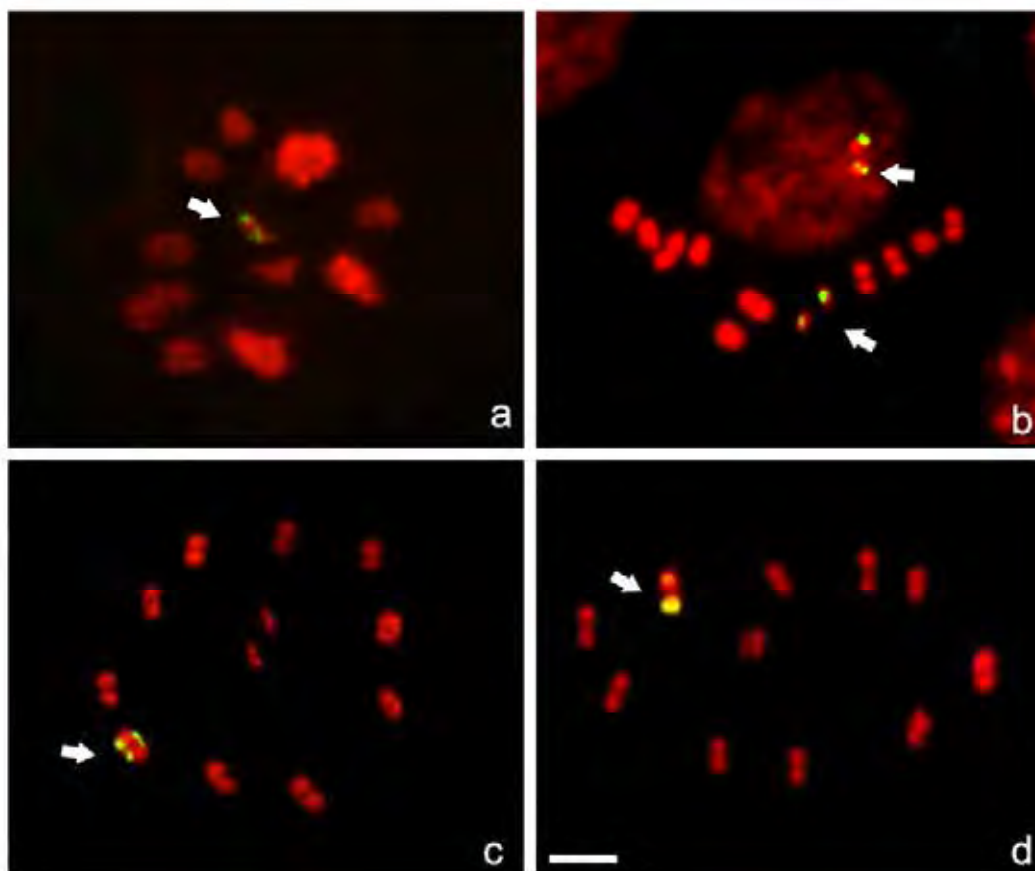
<b>Área relativa dos cromossomos</b>				
Áreas relativas dos cromossomos (%) e desvio padrão				
	<i>T. infestans melanosoma</i>	<i>T. brasiliensis</i>	<i>T. matogrossensis</i>	<i>T. rubrovaria</i>
A1	16.68 (± 1.15)	12.40 (± 1.10)	12.16 (± 0.96)	11.81 (± 0.69)
A2	13.88 (± 1.36)	11.11 (± 0.69)	10.92 (± 0.65)	11.04 (± 0.69)
A3	12.24 (± 1.47)	10.27 (± 0.68)	10.16 (± 0.60)	10.48 (± 0.70)
A4	8.57 (± 0.56)	9.70 (± 0.49)	9.68 (± 0.51)	9.75 (± 0.32)
A5	7.66 (± 0.41)	9.16 (± 0.25)	9.05 (± 0.49)	9.19 (± 0.41)
A6	6.98 (± 0.35)	8.76 (± 0.33)	8.62 (± 0.51)	8.71 (± 0.36)
A7	6.59 (± 0.60)	8.50 (± 0.26)	8.37 (± 0.42)	8.24 (± 0.40)
A8	6.36 (± 0.67)	8.19 (± 0.18)	8.02 (± 0.26)	8.15 (± 0.30)
A9	6.11 (± 0.62)	7.74 (± 0.53)	7.59 (± 0.63)	7.38 (± 0,51)
A10	5.40 (± 0.56)	7.08 (± 0.49)	6.97 (± 0.54)	6.68 (± 0.53)
Y	5.52 (± 0.57)	4.24 (± 0.42)	4,81 (± 0.49)	5.16 (± 0.49)
X	3.73 (± 0.47)	3.15 (± 0.34)	3.92 (± 0.42)	3.72 (± 0.45)



**Figura 2.** Células metafásicas dos túbulos seminíferos de *Triatoma infestans melanosoma* submetidas ao bandamento-C CMA<sub>3</sub>/DAPI. (a-b) Metáfase mitótica apresentando três pares autossômicos com blocos DAPI<sup>+</sup> (a - seta) terminais e adjacentes à blocos ricos em CG (b - ponta de seta). (c-d) Metáfase I com quatro autossomos apresentando blocos terminais DAPI<sup>+</sup> (c) e três autossomos com blocos CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (d). Observar também o cromossomo Y totalmente DAPI<sup>+</sup> (c - sinal fraco) (ponta de seta) e o cromossomo X com um bloco terminal DAPI<sup>+</sup> (c - seta). Barra = 5µm.



**Figura 3.** Células dos túbulos seminíferos de triatomíneos submetidas ao bandamento - C e, posteriormente, tratadas com DAPI (a,e,i,c,g,k) e com CMA<sub>3</sub> (b,f,j,d,h,l). *Triatoma rubrovaria* (a-d); *T. brasiliensis* (e-h) e *T. matogrossensis* (i-l). (a-b) Metáfase I de *T. rubrovaria* apresentando o cromossomo Y DAPI<sup>+</sup> (sinal fraco) (a – seta). (c-d) Núcleo interfásico com bloco heterocromático composto pelos cromossomos sexuais (setas). (e-f) *Triatoma brasiliensis* com Y totalmente DAPI<sup>+</sup> (e – seta). (g-h) Núcleos interfásicos evidenciando blocos heterocromáticos dispersos (ponta de seta) e o bloco heterocromático composto pelos cromossomos sexuais (h - seta). (i-j) *Triatoma matogrossensis* apresentando cromossomo Y DAPI<sup>+</sup> e um bloco CMA<sup>+</sup> (seta). (k-l) Núcleo interfásico sem ocorrência de outros blocos heterocromáticos. Em destaque (b, f e j) sobreposição das imagens DAPI e CMA nos cromossomos sexuais (Y – DAPI<sup>+</sup>). Barra = 5µm.



**Figura 4.** Metáfases meióticas dos triatomíneos submetidas à técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sonda de DNAr 45S de *Drosophila melanogaster*, contra-corada com FITC (verde) e com material cromossômico contra-corado com DAPI (vermelho). (a) *Triatoma infestans melanosoma* com um sinal de hibridização terminal no cromossomo X (seta). (b) *Triatoma matogrossensis* apresentando segmentos de DNAr nos dois cromossomos sexuais da metáfase I e também dois sinais de hibridização no núcleo interfásico (setas). (c) *Triatoma brasiliensis* com sinal de hibridização em um par autossômico (seta). (d) *Triatoma rubrovaria* com um sinal de DNAr em um autossomo (seta). Notar a diferença na intensidade dos sinais de hibridização entre os cromossomos sexuais de *T. matogrossensis* e no par autossômico de *T. rubrovaria*. Barra = 5 $\mu$ m.

## **4 Discussão geral e conclusões**

---

#### 4 Discussão geral e conclusões

A organização cística com uma única célula envolvendo um cisto espermatogonial é uma característica compartilhada entre grupos de insetos (CRUZ-LANDIM, 2001). Entretanto, dados da literatura evidenciam a presença de mais de uma célula cística por cisto espermatogonial (WILDE, 1964). As características ultraestruturais e citogenéticas, tais como a especialização do envoltório nuclear ea presença de diversos sítios de DNAr 45S, sugerem que o evento de poliploidia está relacionado com o aumento da atividade de síntese na célula cística das espécies estudadas. A poliploidia foi sugerida para outros heterópteros, entretanto em grupos de dípteros o aumento da atividade sintética foi relacionada a presença de cromossomo politênicos nas células císticas (BECKER, NAGL, 1994; HARTMAN, SOUTHERN, 1995; SCHMIDT et al., 2002).

As análises cariotípicas e do bandamento cromossômico nas células metafásicas dos túbulos seminíferos dos triatomíneos possibilitaram o agrupamento entre as espécies estudadas. *Triatoma brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* apresentam similaridades quanto ao tamanho cromossômico e à localização das regiões heterocromáticas, diferenciando apenas quanto à localização dos sítios de DNAr 45S. A similaridade entre os cromossomos e o decréscimo no tamanho desses são característicos em heterópteros (KUSNETSOVA et al., 2004; LANZONE, SOUZA, 2006). Poucas espécies apresentam diferenciação acentuada do tamanho cromossômico (PÉREZ et al. 1997; PAPESCHI et al. 2003), fato que também foi observado para os cromossomos de *T. infestans melanosoma*. A distinção do tamanho cromossômico

associada à presença de várias regiões heterocromáticas diferenciou essa espécie das demais estudadas.

A variação na localização dos sítios de DNAr 45S já foi observada nos heterópteros, tendo sido encontrados sítios nos autossomos ou nos cromossomos sexuais, bem com a diferenciação de intensidade dos sinais deste segmento entre cromossomos da mesma espécie (PAPESCHI et al., 2003; CATTANI, PAPESCHI, 2004), o que pode ser explicada por um *crossing-over* desigual.

Dessa forma, os resultados obtidos, por meio da análise citogenética clássica e molecular, nas células císticas e germinativas dos túbulos seminíferos das quatro espécies do gênero *Triatoma* possibilitaram as seguintes conclusões:

a. A atividade nutritiva da célula cística pode ser confirmada pela associação dos seguintes fatores: poliploidia nuclear, que permite maior transcrição; invaginações citoplasmáticas no núcleo, que aumentam a superfície nuclear permitindo o aumento de trocas entre esses compartimentos; e, por fim, a disposição periférica do DNAr nos blocos heterocromáticos o que facilitaria a transcrição deste segmento;

b. Núcleo das células císticas com vários blocos heterocromáticos (*T. infestans* e *T. infestans melanosoma*) ou com a presença de um único bloco heterocromático (*T. brasiliensis*, *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria*) refletindo a diferença na quantidade de heterocromatina apresentada em cada espécie;

c. Proximidade evolutiva entre *T. brasiliensis* , *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* e a divergência dessas espécies em relação à *T. infestans melanosoma*;

d. A diferença na intensidade do sinal dos segmentos de DNAr em *T. rubrovaria* e *T. matogrossensis* sugerem, respectivamente, a atuação de *crossing-over* desigual e translocação cromossômica envolvendo as regiões de DNAr nessas espécies.



## **5 Referências Bibliográficas**

(introdução e discussão geral)

---

## 5 Referências Bibliográficas

ANGUS, R. B.; KEMENY, C. K.; WOOD, E. L. The C-banded karyotypes of the four British species of *Notonecta* L. (Heteroptera: Notonectidae). **Hereditas**, v. 140, p. 134-138, 2004.

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. 7, n. 2, p. 326-335, 2008.

BECKER, T. A.; NAGL, W. Disproportionate numbers of rDNA loci in diploid and polyploidy testis nuclei of *Gerris najas* detected by fluorescence in situ hybridization. **Cell Biology International**, v. 18, n. 4, p. 245-255, 1994.

CABRERO, J.; BUGROV, A.; WARCHALOWSKA-SLIWA, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J. P. M. Comparative FISH analysis in five species of *Eyprepocnemidine* grasshoppers. **Heredity**, v. 90, p. 377-381, 2003.

CATTANI, M. V.; PAPESCHI, A. G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolar during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae: Heteroptera). **Hereditas**, v. 140, p. 105-111, 2004.

CRUZ-LANDIM, C.; FERREIRA, A. Studies on the fine structure of cyst cells and its relationships with the spermatids on *Myocryllus sp.* (Orthoptera). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, n. 2, p. 401-406, 1981.

CRUZ-LANDIM, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) Testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia**, v. 91, p. 183-189, 2001.

FOSSEY, A.; LIEBENBERG, H. Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carlisis wahlbergi* Stal (Coreidae:Heteroptera). **Cytobios**, v. 81, p. 7-15, 1995.

GALIÁN, J.; SERRANO, J.; LA RÚA, P.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera:Cicindelinae). **Heredity**, v. 74, p. 524-530, 1995.

GALVÃO, C.; CARCAVALHO, R.; SILVA ROCHA, D.; JUNBERG, J. A checklist the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p 1-36, 2003.

GROZEVA, S.; KUZNETSOVA, V. G.; NOKKALA, S. Patterns of chromosome banding in four nabid species (Heteroptera, Cimicomorpha, Nabidae) with high chromosome number karyotypes. **Hereditas**, v. 140, n. 2, p. 99-104, 2004.

GUZMÁN-BRACHO C. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 372-376, 2001.

HARTMAN, T. V.; SOUTHERN, D. I. Genome reorganization from polyteny to polyploidy in the nurse cell found in onion fly (*Delia antique*) and cabbage root fly (*Delia radicum*) ovaries (Diptera, Anthomyiidae). **Chromosome Research**, v.3, p. 271-28, 1995.

HUGHES-SCHRADER S.; SCHRADER F. The kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v.12, p. 327-350, 1961.

HUISINGA, K. L.; BROWER-TOLAND, B.; EIGIN S. C. The contradictory definitions of heterochromatin transcription and silencing. **Chromosoma**, v. 115, p. 110-122, 2006.

ITUARTE, S.; PAPESCHI, A. G. Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia (Fuscagobia) fuscata* (Stal) (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). **Genetica**, v. 122, p. 199- 2006, 2004.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. **Neue Serie**, v. 50, p. 1096-1116, 2006.

KUSNETSOVA, V. G.; GROVEZA, S.; NOKKALA, S. New cytogenetic data on Nabidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with a discussion of karyotype variation

and meiotic patterns, and their taxonomic significance. **European Journal of Entomology**, v. 101, p. 201-210, 2004.

LANZONE, C.; DE SOUZA, M. J. C-banding, fluorescent staining and NOR location in holocentric chromosomes of bugs of the Neotropical genus *Antiteuchus* (Heteroptera: Pentatomidae:Discocephalinae). **European Journal of Entomology**, v. 13, p. 239-243, 2006.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M. J. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus fish* (Anastomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, p. 363-367, 1999.

MANDRIOLI, M.; GANASSI, S.; BIZZARO, D.; MANICARDI, C. G. Cytogenetic analysis of the holocentric chromosomes of the aphid *Schizaphis graminum*. **Hereditas**, v. 131, p. 185-190, 1999.

MENDONÇA, V. J.; SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R. F.; JÚNIOR, J. M.; JÚNIOR, M. B.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICALLELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggest its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.

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. 33-37, 2004.

OLSON, M. O.; DUNDR, M.; SZEBENI, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trends Cell Biol.** v. 10, p. 189–196, 2000.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; HORMOS, S.; PANZERA, Y.; CESTAU, R.; DELGADO, V.; NICOLINI, P. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 515-518, 1996.

PAPESCHI, A. G.; MOLA, M.L.; BRESSA, M. J. et al. Behaviour of ring bivalents in holocentric systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viruda* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 11, p. 725-733, 2003.

PÉREZ, R.; PANZERA, F.; PAGE, J.; SUJA, J.A.; RUFAS, S. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 5, p. 47-56, 1997.

SCHOFIELD, C. J.; JAMMIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 538-588, 2006.

SCHMIDT, E. D.; SEHN, E.; DORN, A. Differentiation and ultrastructure of the spermatogonial cyst cells in the milkweed *Oncopeltus fasciatus*. **Invertebrate Reproduction and Development** v. 42, p. 163-178, 2002.

SZÖLLÖSI, A. Relationships between germ and somatic cells in the testes of locusts and moths. In **“Insect Ultrastructure”** (R.C. King and H. Akai, eds.), v. 1, p. 32-60. Plenum Press, New York.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. **Carylogia**, v. 52, n. 3-4, p. 177-184, 1999.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analysed by silver staining. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae:Hemiptera). **Chromosoma**, v. 18, p. 97-122, 1966.

WILDE, J. Reproduction. – In Rockstein, M. The physiology of Insecta V. 1 Ac. Press. **New York**, 1964.

WOLF, K. W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. 1/2, p. 37-62, 1996.



## **6 Apêndice**

Artigo publicado durante o curso de mestrado, com base nos resultados obtidos durante o Programa de Iniciação Científica (bolsa PIBIC/CNPq Processos n. 002579/2005; 101450/2006-2; 101490/2006-2), desenvolvido junto ao Laboratório de Biologia Celular (Departamento de Biologia) (IBILCE-UNESP – Campus de São José do Rio Preto-SP).

## Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera)

V.B. Bardella, M.T.V. Azeredo-Oliveira and E. Tartarotti

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", IBILCE/UNESP, São José do  
Rio Preto, SP, Brasil

Corresponding author: M.T.V. Azeredo-Oliveira

E-mail: [tercilia@ibilce.unesp.br](mailto:tercilia@ibilce.unesp.br)

Genet. Mol. Res. 7 (2): 326-335 (2008)

Received October 30, 2007

Accepted January 10, 2008

Published April 15, 2008

**Abstract.** Triatomines are of great concern in public health because they are vectors of Chagas' disease. This study presents an analysis of the species *Triatoma melanosoma*. The cytogenetic characteristics of triatomines include holocentric chromosomes, post-reductional meiosis in the sex chromosomes and nucleolar fragmentation in the meiotic cycle. The methodology utilized consisted of the techniques of lacto-acetic orcein staining and silver ion impregnation. The organs analyzed were adult testicles. The results enabled to classify the chromosomes by number and size, being three large, eight medium and one small heterochromosome. The three largest chromosomes and the heterochromosomes showed heteropyknotic chromatin in meiosis. The heterochromosomes in 8.05% of the cells in metaphase I behaved as pseudobivalents, contrasting with 91.95% of the cells with individualized sex chromosomes, confirming the achiasmatic nature of these chromosomes. However, the pseudobivalents occurred prominently in metaphase II (78.38%), this fact probably is related to the post-reductional nature of the sex chromosomes. The nucleolus in *T. melanosoma* persisted until the diplotene phase after which it began to fragment. Nucleolar corpuscles were observed in metaphases I and II and during anaphases I and II, these characteristics being related to the phenomenon of nucleolar



persistence. In the initial spermatids, peripheral silver ion impregnation occurred, which could be analogous to the pre-nucleolar corpuscles observed after fragmentation. Thus, this study extends our knowledge of the characteristics of triatomines, in particular, heteropyknotic degree, kinetic activity, formation of sex chromosome achiasmatic pseudobivalency, confirmation of the fragmentation phenomenon, and post-meiotic nucleolar reactivation.

**Key words:** Triatomines; Cytogenetics; Meiosis; Nucleolus; Holocentric chromosomes; Spermatogenesis

## Introduction

Chagas' disease is an endemic parasitosis with a pronounced importance among heart diseases in South America (Tartarotti et al., 2004). This disease affects more than 11 million people and occurs in Mexico and Central and South America (Dias et al., 2002). On the American continent, Chagas' disease is one of the main endemic diseases after malaria (Tartarotti et al., 2004).

The etiologic agent of Chagas' disease is the protozoan *Trypanosoma cruzi*, and the transmission of this disease occurs by contact with the feces of the triatomine contaminated with the protozoan (Coll-Cárdenas et al., 2004). However, the disease may also be transmitted congenitally and by blood infection (Tartarotti et al., 2004).

The triatomines are divided into six tribes: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicoli, Linshcosteini, Rhodniini and Triatomini, totaling 137 species (Galvão et al., 2003). Within the Triatomini tribe, in the *Triatoma* genus, there is the *Triatoma melanosoma* species. This species is distributed throughout the extreme north of Argentina, in the province of Misiones. Initially, it was described by Martinez and collaborators (1987) as a *T. infestans* subspecies, and as a result it was denominated *T. infestans melanosoma* (Lent et al., 1994). This classification originated from the erroneous conception of *T. melanosoma* as a dark form of *T. infestans*. *T. melanosoma* is now recognized to be a species (Lent et al., 1994).

In cytogenetic terms, male triatomines have a diploid number of chromosomes varying from 21 to 25, and the typical form of the group is  $2n = 22$  (Ueshima, 1966). The chromosomes of these insects are holocentric and have an unusual meiotic segregation (De Vaio et al., 1985): the autosomes are chiasmatic and pre-reductional, while the sex chromosomes are achiasmatic and post-reductional (Solari, 1979). The heterochromosomes, during metaphase II, alternatively behave as pseudobivalents. The chromosomal size is usually homogeneous in the triatomines, but there are some exceptions: *T. infestans*, *T. platensis*, *T. rubrovaria* and *T. pseudomaculata*. These species have from one to three chromosomes larger than the others and are heteropyknotic in conventional staining (De Vaio et al., 1985; Pérez et al., 1992).

In triatomines, and in other insects, studies of nucleolar behavior have revealed the number of nucleoli in the spermatocytes and their fragmentation during the meiosis prophase I, as well as nucleolar reactivation at the end of spermatogenesis (Warchalowska-Śliwa and Maryanska-Nadachowska, 1992; González-García et al., 1995; Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle and Azeredo-

Oliveira, 2004). Another objective of cytogenetic study is the location of nucleolar organizing regions (NORs), observed in some autosomes and/or heterochromosomes. In triatomines, nucleolar fragmentation occurs during prophase I between diplotene and diakinesis. Nucleolar corpuscles are also observed in the metaphases, together with the nucleolar reactivation that occurs in anaphase II, which are both phenomena typical of triatomines. Usually, these nucleolar corpuscles become smaller as the spermatids mature (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004).

The aim of the present study was the characterization of the meiotic cycle with an emphasis on nucleolar activity in *T. melanosoma*, in order to contribute to a better understanding of the chromosomal behavior and the phenomenon of nucleolar fragmentation in *Triatominae*.

### Material and Methods

The species analyzed was *T. melanosoma* (Heteroptera: Reduviidae). For the study, 15 specimens were used. The insects were provided by the Special Health Service of Araraquara, State of São Paulo, Brazil, belonging to the Department of Epidemiology of University of São Paulo (USP). The seminiferous tubules of adult males were submitted to the cytochemical techniques of lacto-acetic orcein (De Vaio et al., 1985, with modifications) and silver staining (Howell and Black, 1980). The slides were examined with a Zeiss-Jenaval photomicroscope and the photomicrographs were made on a 400-ASA film.

### Results

#### Lacto-acetic orcein

The polyploidy nuclei of testicular tubule nutritive cells showed dispersed heteropyknotic corpuscles (Figure 1A). The spermatogonial metaphases showed chromatin bridges and heteropyknosis at the chromosome ends (Figure 1B). During the diffuse stage (prophase I), in progressive degrees of chromosome condensation, the heteropyknotic regions showed peripheral or central dispositions (Figure 1C,D). In the diplotene, the presence of terminal and interstitial chiasmata was observed in the bivalent autosomes and achiasmatic sex chromosomes. The heteropyknosis of three autosomes and at least one sexual chromosome was observed (Figure 1f,g). In the diakinesis, there was typical chiasmatic terminalization of the autosomes (Figure 1h). In metaphase I (Figure 1i), the sex chromosomes were visualized alternatively in the pseudobivalent (Figure 1j) or individualized form (Figure 1k). The pseudobivalent presence or absence was analyzed by means of cellular score. In metaphase I, 91.95% of the cells displayed individualized heterochromosomes, and in metaphase II, 78.38% of the observed cells were in the pseudobivalent configuration (Table 1). In metaphase II, the heterochromosomes were again observed to be either individualized (Figure 1l,m) or pseudobivalent (Figure 1n). During anaphase, parallel migration, typical of holocentric chromosomes, was observed and the late migration of chromosomes was verified (Figure 1o-q). In spermiogenesis, dots were observed on the periphery of early spermatids (Figure 1r,s). During differentiation the dots reduced to the formation of small points at the beginning of the spermatozooids (Figure 1t).  
©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *T. melanosoma*

## Silver ion impregnation

The nucleolar cycle was observed in the cells of the seminiferous tubules during spermatogenesis (Figures 2 and 3). The polyploidy nuclei of the nutritive cells of the testicular tubules showed several nucleolar corpuscles; in addition, the polyploidization phase of this cell was observed (Figure 2a-c). The spermatogonial cells displayed intense

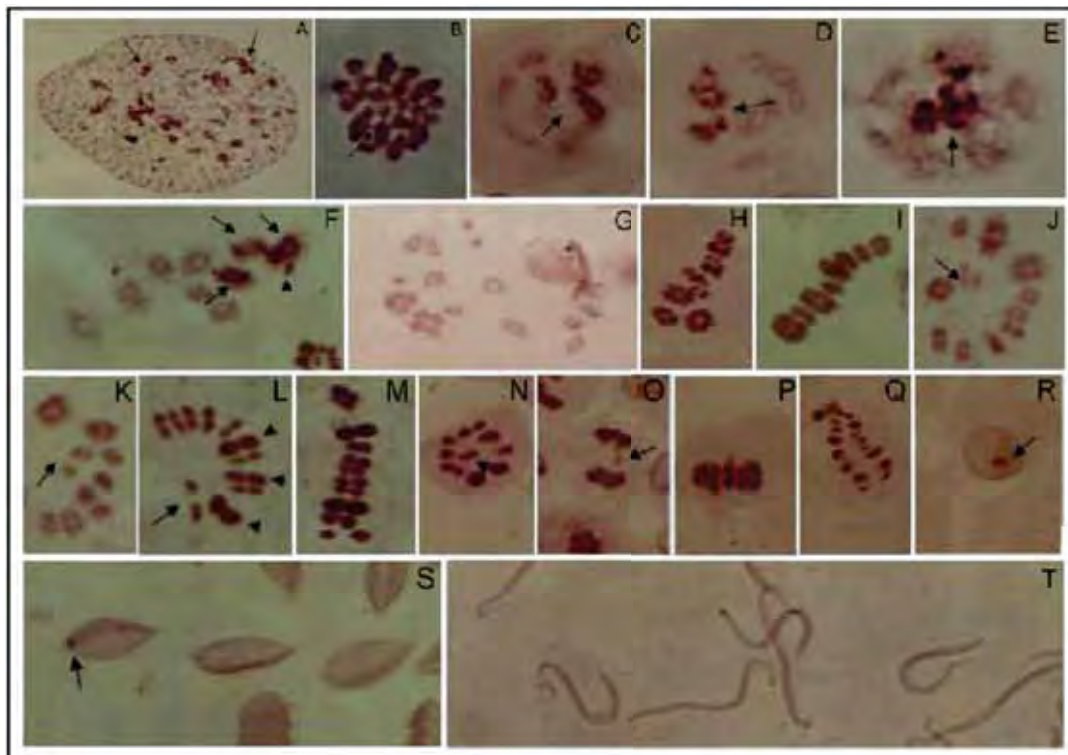
**Figure 1.** Seminiferous tubule of *Triatoma melanosoma* stained by lacto-acetic orcein. **A.** Polyploidy nucleus with dispersed heteropyknotic corpuscles (arrows). **B.** Spermatogonial metaphase with chromatin bridges joining the chromosomes (arrow). **C,D.** Diffuse stage with peripheral chromocenter, see arrows. **E.** Diffused stage showing chromocenter alternatively in central position (arrow). **F.** Diplotene, observe heteropyknosis in the three largest autosomes (arrows) and at least one heterochromosome (arrowhead). **G.** Final diplotene stage, note the typical chiasmatic figures, stressing the achiasmatic behavior of the sex chromosomes. **H,I.** Diakinesis, note the chiasmatic finalization, and above all pseudobivalent heterochromosome behavior. **J,K.** Circular metaphase I, note achiasmatic sex chromosomes in the center (arrows). **L,M.** Metaphase II, note the three largest autosomes with a greater degree of pyknosis (arrowheads) and individualized sex chromosomes (arrow). **N.** Circular metaphase II with sex pseudobivalent (arrowhead). **O.** Anaphase I, note late chromosome migration (arrow). **P,Q.** Anaphase II, note parallel chromosome migration. **R,S.** Spermatids, note peripheral heteropyknotic corpuscles (arrows). **T.** Spermatids in final elongation stage.

**Table 1.** Presence of sex chromosomes as pseudobivalents in meiotic metaphases.

Presence of pseudobivalent    Absence of pseudobivalent

Metaphase I 7 (8.05%) 80 (91.95%)

Metaphase II 58 (78.38%) 16 (21.62%) **330** ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) V.B. Bardella et al.

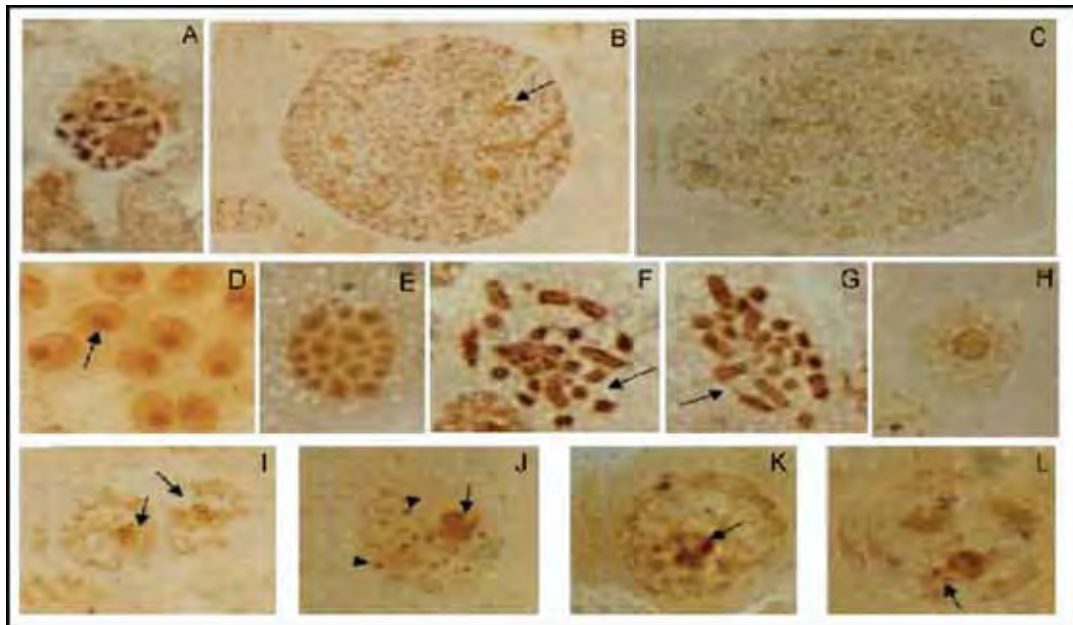


**Table 1.** Presence of sex chromosomes as pseudobivalents in meiotic metaphases.

	Presence of pseudobivalent	Absence of pseudobivalent
Metaphase I	7 (8.05%)	80 (91.95%)
Metaphase II	58 (78.38%)	16 (21.62%)

nucleolar activity (Figure 2d). The cells in spermatogonial metaphase demonstrated no specific staining but showed chromatin bridges between the chromosomes (Figure 2e-g). The spermatogonial interphasic cells showed an evident nucleolus, reflecting the gene activity of these nuclei (Figure 2h). In the initial diffuse stage, dispersed nucleolar staining was observed throughout the nucleus, together with the presence of the nucleolus (Figure 2i-k). Still in the diffuse stage, it was possible to observe NORs associated with the nucleolus and the beginning of chromosome condensation (Figure 2l). In the diplotene-diakinesis, nucleolar staining was visualized (Figure 3a), and in the advanced diakinesis stages, it was possible to relate the NORs to three autosomes and one heterochromosome (Figure 3b,c). In diakinesis, nucleolar fragmentation was also observed (Figure 3d). In metaphase, as well as in anaphase, the chromosomes became intensely compacted which made it difficult to analyze the staining. However, it was possible to observe small nucleolar fragments inside the cell (Figure 3e-h). Still in metaphase II, the behavior of pseudobivalents in the heterochromosomes was observed (Figure 3g). The spermatids, at the beginning of spermiogenesis, contained one corpuscle, suggesting post-meiotic nucleolar activity, possibly related to the differentiation process (Figure 3i). During the differentiation process of the spermatids, the corpuscles decrease and fragment (Figure 3j), until the spermatozooids formed (Figure 3k).

**Figure 2.** Seminiferous tubules of *Triatoma melanosoma* stained by silver ion impregnation. **A.** Polyploid nuclei in early polyploidization. **B,C.** Polyploid nuclei in progressive ploidy stages, note the great number of nucleolar corpuscles (arrow). **D.** Spermatogonial nuclei with nucleolar activity (arrow). **E-G.** Spermatogonial metaphases with chromatin bridges (arrows). **H.** Primary spermatocyte with evident nucleolus. **I-K.** Initial diffused prophase stage, note nucleoli (arrows) and nucleolar corpuscles (arrowheads). **L.** Final diffused stage, note chromatin associated with nucleolar region (arrow). **331** ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *T. melanosoma*

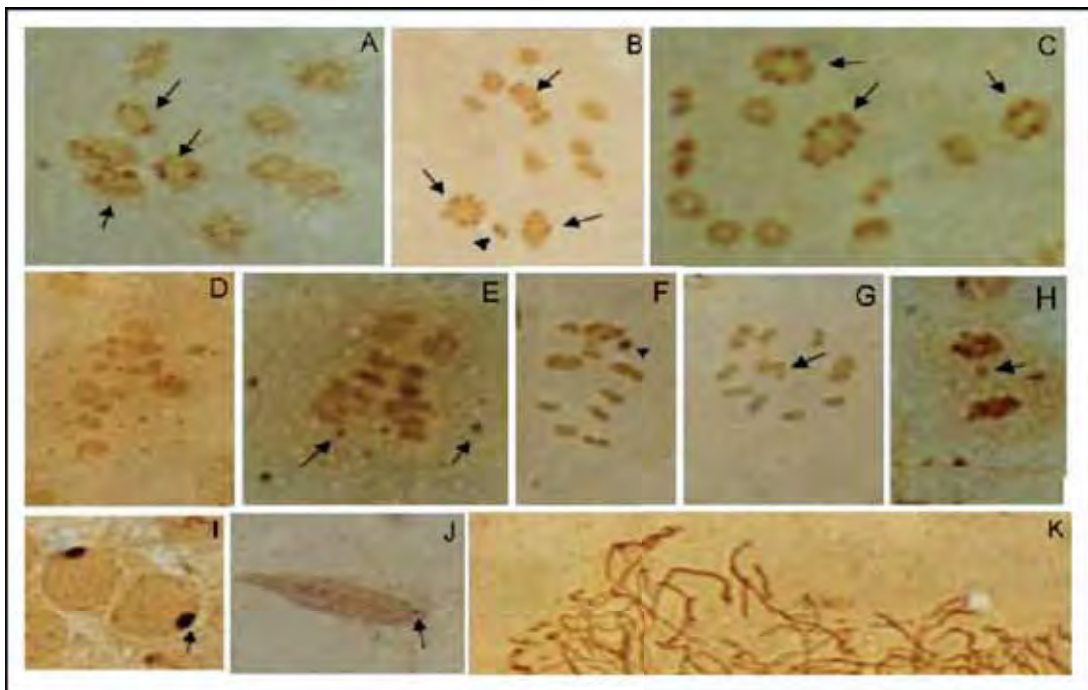


## Discussion

The study of spermatogenesis in *T. melanosoma*, in association with the information in the literature, has made it possible to observe chromosome characteristics and meiotic behavior in Heteroptera. The polyploidy nuclei of *T. melanosoma* displayed several dispersed heterochromatic corpuscles. The study of polyploidy nuclei in other triatomines has revealed the existence of only one heterochromatic corpuscle as a frequent occurrence in these insects (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004).

The adult males of *T. melanosoma* showed a diploid number of chromosomes  $2n = 22$  (20A, XY), corroborating the study of Panzera and collaborators (1996). In the species analyzed, the chromosomes were classified in the metaphase II according to size; thus, they were denominated as three large, eight medium and one small, the last corresponding to one of the heterochromosomes. As mentioned above, in male triatomines the diploid number of chromosomes varies from 21 to 25 chromosomes (Ueshima, 1966); however, it is believed that 60% of the species analyzed possess a diploid number of chromosomes  $2n = 20A + XY$  (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997).

**Figure 3.** Seminiferous tubule of *Triatoma melanosoma* stained by silver ion impregnation. **A-C.** Diplotene-diakinesis with nucleolar organizing regions evidenced in at least three autosomal bivalents (arrows) and one heterochromosome (arrowhead). **D.** Diakinesis, note the complete nucleolar fragmentation. **E.** Early anaphase I, note the persistence of nucleolar corpuscles (arrows). **F,G.** Ring metaphase II with sex pseudobivalent at the center (arrow), note the nucleolar persistence (arrowhead). **H.** Anaphase II, note chromosome showing late migration (arrow). **I.** Spermatid in early differentiation, notice silver ion impregnation in the periphery (arrow). **J.** Spermatids in elongation phase, note peripheral nuclear stain in opposition to the area of flagellum formation. **K.** Spermatozoid agglomeration. **332** ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) V.B. Bardella et al.



In *T. melanosoma* the three largest autosomes of the diploid complement, together with the heterochromosomes, were heteropyknotic. In the triatomines, little variation in chromosome size is usually observed (De Vaio et al., 1985). However, the species *T. infestans*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, and *T. pseudomaculata* have between 1 and 3 chromosomes larger than the others, appearing heteropyknotic with conventional staining (De Vaio et al., 1985; Pérez et al., 1992).

The chromosomes of *T. melanosoma* are characterized as holocentric based on migration pattern, late migration and lack of primary constriction. These characteristics are typical of the Hemiptera and of the Homoptera, Lepidoptera and Trichoptera orders (Wolf, 1996). In Hemiptera after high dosages of radiation, a series of chromosome structural rearrangements occur; however, the complete elimination of the chromosomes or fragments, due to a faulty inclusion in the telophase, has rarely been observed (Hughes-Schrader and Schrader, 1961). In holocentric chromosomes, the microtubules of the spindle interact with the whole extent of the chromatin and do not have a localized centromere (Pérez et al., 1997). Atomic force microscopic analyses of insects with holocentric chromosomes have shown, in a 3-D reconstruction, that the junction between the two chromatids is totally homogeneous over the whole chromosome (Mandrioli and Manicardi, 2003).

In triatomines, meiosis is inverted for the heterochromosomes. During anaphase I, the sex chromosomes are pre-equational, and in anaphase II they become post-reductional. However, the autosomes follow a standard meiotic segregation (Pérez et al., 2000). In addition, the meiosis of *T. melanosoma* exhibited patterns usually found in triatomines in metaphases I and II. In metaphase I, the sex chromosomes were positioned in the center of the ring formed by autosomes, as occurs in *T. infestans*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius pictipes* (De Vaio et al., 1985; Pérez et al., 1992). In addition, the heterochromosomes in 8.05% of the cells analyzed in metaphase I behaved as pseudobivalents, in contrast to the remaining cells, in which the sex chromosomes were individualized, confirming the achiasmatic nature of these chromosomes (Solari, 1979). The heterochromosomes also behaved as pseudobivalents during metaphase II, this being constituted of a chromatid from chromosome X and another from chromosome Y. These observations have also been made by other researchers (De Vaio et al., 1985; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004). Interestingly, in the present study, the pseudobivalent formation occurs to a large extent in metaphase II (78.38%); this fact may have a possible relationship with the post-reductional nature of the sex chromosomes.

With regard to the chiasmatic presence in diplotene stages, four bivalents with two chiasmata, one terminal and the other interstitial were observed in *T. melanosoma*. Six bivalents exhibited terminal chiasmata, with a characteristic ring format. The heterochromosomes in this phase are completely individualized and achiasmatic, although in metaphase I they have a side by side association. Usually, holocentric chromosomes show 1 or 2 chiasms; however, this number may be higher in larger chromosomes. This is also the case with the Homoptera *Psylla foersteri*, which has three chiasmata in an autosomal pair originating in the fusion between 5 or 6 small chromosomes. However, these chromosomes migrate slowly, and the medium chiasmata are not usually segregated in anaphase I, resulting in cell loss during spermatogenesis (Nokkala et al., 2004).

A characteristic phenomenon in *T. melanosoma* was the anaphase with late migration, suggesting that the chromosomes with late migration may be the sexual ones (Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004). The anaphasic figures observed in the present study indicate that the 333  
©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *T. melanosoma*

kinetic activity of the chromosomes is located preferentially in terminal regions and its segregation mechanism is entirely equidistant throughout the extent of the chromosome, and that the orientation of the bivalent was uniform and parallel to the polar axis of the spindle. These observations are in agreement with that proposed in the literature regarding the chromosome pair in Hemiptera (Hughes-Schrader and Schrader, 1961).

In *T. infestans*, in anaphases I and II, the kinetic activity was restricted to the chromosome end, irrespective of whether this was euchromatic or heterochromatic. It was also observed that the kinetic activity at the euchromatic end was greater than that at the heterochromatic end (Pérez et al., 1997). However, studies with specific centromeric probes in holocentric chromosomes of Cyperaceae detected the presence of centromeric scattering which, interestingly, was restricted to heterochromatic areas (Guerra et al., 2006).

With regard to silver ion impregnation, the testicular tubules of *T. melanosoma* analyzed in the present study, revealed only one nucleolus in the initial nuclei of prophase I, differing in this way from some heteroptera that possess more than one nucleolus (Fossey and Liebenberg, 1995). However, at the beginning of the diffuse stage, in addition to the nucleolus, small arginophilic corpuscles dispersed throughout the nuclear area were observed. This observation suggests a transcriptional activity not restricted to the nucleolar structure at the beginning of the meiotic prophase.

The nucleolus in *T. melanosoma* persisted until prophase I, specifically in the diplotene; after this phase the nucleolar fragmentation phenomenon began to occur. Nucleolar corpuscles were observed in metaphases I and II, as well as during anaphases I and II. These characteristics relate to the phenomenon of nucleolar persistence, in which the nucleolus does not disappear totally in triatomines, but is preserved as pre-nucleolar corpuscles until the beginning of the next meiotic cycle (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle and Azeredo-Oliveira, 2004). These pre-nucleolar corpuscles are composed of proteins involved in pre-RNA processing, which leave the nucleolus in the prophase and are mainly located in the periphery of the chromosomes during the cell cycle; these proteins originate from the dense fibrillar center and granular center of the active nucleolus (Hernandez-Verdum, 2006).

In *T. melanosoma*, between the diplotene and diakinesis phases, silver ion impregnation was observed in at least three autosomes and one heterochromosome, suggesting the existence of NORs in those chromosomes. Studies of the *Panstrongylus* genus (*P. megistus* and *P. herreri*) have demonstrated the existence of NORs in sexual chromosomes, in prophase I of the meiosis and in chromosomal associations of NOR-carrying autosomes in the nucleolus (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999). The association between the nucleolus and the sexual chromosomes and autosomes is a common characteristic in insects observed in Heteroptera and also in Psocoptera (Golub et al., 2004).

In the *T. melanosoma* diplotene-diakinesis stage, the positive Ag-NOR staining on one of the heterochromosomes persists until the meiotic metaphases. However, the silver ion impregnations do not persist during the meiotic stage; for example, in the Heteroptera *Belostoma oxyurum*, the sex chromosomes continue to be Ag-NOR positive until the diffuse stage, after which no staining was observed on these chromosomes (Papeschi, 1995).

At the beginning of cell differentiation, that is, in the initial spermatids, a prominent peripheral silver ion staining occurs. This may be analogous to the pre-nucleolar corpuscles observed in the early nucleolar fragmentation. In other words, after the reorganization of the nuclear envelope, silver-positive proteins that were previously small corpuscles in the cell, are

334 ©FUNPEC-RP  
www.funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research 7 (2): 326-335 (2008) V.B. Bardella et al.

destined for the nucleus for future nucleolar reorganization.

In conclusion, the present study contributes to our knowledge of the cytogenetics of triatomines through the analysis of heteropyknotic degree in *T. melanosoma* spermatogenesis, chromosome size arrangement and their correlation at the different pyknotic levels. This study also corroborates the behavior of holocentric chromosomes in Heteroptera, terminal anaphase kinetic activity and the formation of achiasmatic pseudobivalents in the sex chromosomes. Finally, the data of this study confirm the phenomena of nucleolar fragmentation in triatomines and post-meiotic nucleolar reactivation at the beginning of cell differentiation.

### Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. José Soares Barata, director, and João Luis Molina Gil and Maurício R. da Silva Filho, technicians, of the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA) (Araraquara, SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School for providing the specimens studied. Special thanks go to FAPESP and PIBIC/CNPq.

### References

- Coll-Cardenas R, Espinoza-Gomez F, Maldonado-Rodriguez A, Reyes-Lopez PA, et al. (2004). Active transmission of human Chagas disease in Colima Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 363-368.
- De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, et al. (1985). Meiotic differences between three Triatomine species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica* 67: 185-191.
- Dias JC, Silveira AC and Schofield CJ (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Fossey A and Liebenberg H (1995). Meiosis and nucleolar structures in the stink bug *Carkis wahlbergi* Stal (Coreidae: Heteroptera). *Cytobios* 81: 7-15.
- Galvão C, Carvalho RU, Rocha DS and Jurberg J (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Golub NV, Nokkala S and Kuznetsova VG (2004). Holocentric chromosomes of psocids (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA3 and DAPI. *Folia Biol.* 52: 143-149.
- Gonzalez-Garcia JM, Rufas JS, Antonio C and Suja JA (1995). Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 104: 287-297.
- Guerra M, Brasileiro-Vidal AC, Arana P and Puertas MJ (2006). Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* 126: 33-41.
- Hernandez-Verdum D (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem. Cell Biol.* 125: 127-137.
- Howell WM and Black DA (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hughes-Schrader S and Schrader F (1961). The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.
- Lent H, Jurberg J, Galvão C and Carcavallo RU (1994). *Triatoma melanosoma* novo status para *Triatoma infestans melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89: 363-368.
- Mandrioli M and Manicardi GC (2003). Analysis of insect holocentric chromosomes by atomic force microscopy. *Hereditas* 138: 129-132.
- Martinez A, Olmedo RA and Carcavallo RU (1987). Una nueva subespecie argentina de *Triatoma infestans*. *Chagas* 4: 7-8.
- Morielle A and Azeredo-Oliveira MTV de (2004). Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia* 57: 31-37.
- Nokkala S, Kuznetsova VG, Maryanska-Nadachowska A and Nokkala C (2004). Holocentric chromosomes in meiosis. I. Restriction of the number of chiasmata in bivalents. *Chromosome Res.* 12: 733-739.
- Panzer F, Perez R, Hornos S, Panzer Y, et al. (1996). Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): **335**
- ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br *Genetics and Molecular Research* 7 (2): 326-335 (2008) Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *T. melanosoma*



a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 515-518.

- Papeschi AG (1995). Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Cytologia* 60: 291-295.
- Perez R, Panzera Y, Scafiezzo S, Mazzella MC, et al. (1992). Cytogenetics as a tool for triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87: 353-361.
- Perez R, Panzera F, Page J, Suja JA, et al. (1997). Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 5: 47-56.
- Perez R, Rufas JS, Suja JA, Page J, et al. (2000). Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 8: 17-25.
- Solari AJ (1979). Autosomal synaptonemal complex and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.
- Tartarotti E and Azeredo-Oliveira MTV (1999). Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 52: 117-184.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV and Ceron CR (2004). Problemática vetorial da doença de Chagas. *Arq. Ciênc. Saúde* 11: 44-47.
- Tavares MG and Azeredo-Oliveira MTV (1997). Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analyzed by silver staining. *Cytobios* 89: 93-103.
- Ueshima N (1966). Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.
- Warchalowska-Śliwa E and Maryanska-Nadachowska A (1992). Karyotypes, C-bands, NORs location in spermatogenesis of *Isophya brevipennis* Brunner (Orthoptera: Phaneropteridae). *Caryologia* 45: 83-89.
- Wolf KW (1996). The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *Inst. J. Insect Morphol. Embryol.* 25: 37-62.