



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

Weverson Luciano Pires

Estudo Citogenético Comparativo entre *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata* (Triatominae, Heteroptera)

Dissertação apresentada para a
obtenção do Título de Mestre em
Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto – SP
2008



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

Weverson Luciano Pires

Estudo Citogenético Comparativo entre *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata* (Triatominae, Heteroptera)

Dissertação apresentada para a
obtenção do título de mestre:
Programa de Pós-Graduação em
Genética (IBILCE/UNESP)

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto – SP
2008

Pires, Weverson Luciano

Estudo Citogenético Comparativo entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (Heteroptera: Triatominae) / Weverson Luciano Pires. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.
68 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^ª Dra Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Dissertação (mestrado – Genética) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética. 2. Triatomíneos. 3. Cromossomos Holocêntricos.
4. Meiose. 5. Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs).
6. Heterocromatina. 7. Nucleogênese. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575

WEVERSON LUCIANO PIRES

Estudo Citogenético Comparativo entre *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*
(Triatominae, Heteroptera)

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Alba Regina de Abreu Lima Catelani
Professor Doutor
Fundação Educacional de Fernandópolis

Prof^ª. Dr^ª. Lílian Castiglioni
Professor Doutor
UNIRP

São José do Rio Preto, ___de___de 2008

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia, junto ao programa de Pós - Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), processo número 131227/2007- 6.

“Se você desistir quando for inverno, perderá as promessas da Primavera, a exuberância do Verão e a beleza do Outono.”

“Will-power is everything”

Dedico...

*Aos meus familiares, em especial a minha avó Jandira, ao meu tio
Aparecido e a minha mãe Aparecida, pelo apoio e incentivo de sempre,
eterna gratidão e amor.*

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha família: vovó Jandira, mamãe Aparecida e tio Aparecido pelo crescimento com caráter, dignidade e, acima de tudo, a humildade de sempre. Amo muito vocês.

Orgulhosamente a minha orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pela oportunidade que me concedeu, pela atenção, respeito e compreensão ao longo desses anos. Obrigado por contribuir com grande parte do meu conhecimento, esse que será apenas meu e somente Deus poderá herdá-lo.

A Prof^a Dr^a Ester Tartarotti, agradeço pelo ensino das técnicas citoquímicas, por acompanhar alguns resultados no início do trabalho, pela ajuda ao escrever alguns resumos para os congressos. Enfim, obrigado por sempre estar ao meu lado quando muitas dúvidas apareciam.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética, pela amizade, apoio, atenção e ensinamentos. O meu grande respeito.

À secretária do Departamento de Biologia, Simone, pela amizade e atenção quanto às necessidades.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, em especial a Sílvia, pela atenção, compreensão e ajuda.

A todos os funcionários do IBILCE/UNESP, que contribuem para a manutenção do campus universitário.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, a Prof^a Dr^a Patrícia Simone Leite Vilamaior e ao técnico de apoio acadêmico Luiz Roberto Faleiros Junior, pelo estágio básico em “Técnicas em Biologia Celular” e pela contribuição para que as portas da universidade se abrissem.

Aos amigos do laboratório: Rita Luiza Peruquetti, Lucilene Regina Maschio, Vanessa Bellini Bardella. Aprendi muito com o nosso dia-a-dia, risos, tensões, mas no final a grande família do Laboratório de Biologia Celular, sentirei saudades.

Ao técnico Josué Rodrigues dos Santos, pela colaboração e grande amizade.

Aos companheiros de república e da pós-graduação: Vitor, Rafael, Hector, Rogério, Gabriel e Bruno. Risos e discussões, nada mais foram que mais uma lição de vida.

Aos meus primeiros alunos, que estiveram muito presentes durante esses dois anos de mestrado e no início de minha carreira como professor. A primeira vez nós nunca esquecemos.

Aos funcionários, diretores e mantenedores do CEPRO de Ouroeste, ao grande amigo Nélon e a sua esposa Dulce, pela indicação, oportunidade e confiança. Agradeço muito por contribuírem com o início da minha carreira como professor.

Aos meus grandes companheiros inseparáveis, meu primo Elvio Sales, aos amigos Aurélio Fernandes e Danilo Elesbão, e a vários outros amigos e amigas da pacata cidade de Ouroeste. Obrigado pela torcida.

A minha grande amiga Giovana Correa, por estar presente em momentos difíceis da minha vida. Serei sempre grato por ter dado aqueles conselhos.

A DEUS...

obrigado pela força de vontade de sempre e pela graça da vida.

Sumário

Lista de figuras e quadro.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Importância Epidemiológica dos Triatomíneos.....	2
1.2. Citogenética de Triatomíneos.....	4
1.3. Aspectos biológicos de <i>Triatoma maculata</i> e <i>Triatoma pseudomaculata</i>	8
2. Objetivos.....	11
3. Material e Método.....	13
3.1. Obtenção dos Insetos.....	14
3.2. Órgãos analisados.....	14
3.3. Dissecção dos insetos.....	14
3.4. Preparações citológicas.....	14
3.4.1. Coloração Padrão: Orceína Lacto-Acética.....	14
3.4.2. Tratamento e Colorações Específicas.....	15
3.4.2.1. Preparações Citológicas para Coloração.....	15
3.4.2.1.1. Impregnação por Nitrato de Prata.....	15
3.4.2.1.2. Bandamento – C.....	16
3.4.2.1.3. Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos – CEC.....	17
3.5. Fotomicrografias.....	18
4. Resultados.....	19
4.1. <i>Triatoma maculata</i>	20
4.1.1. Orceína Lacto-Acética.....	20

4.1.2. Impregnação por íons prata.....	20
4.1.3. Bandamento – C.....	21
4.1.4. Variante de CEC.....	21
4.2. <i>Triatoma pseudomaculata</i>	32
4.2.1. Orceína Lacto-Acética.....	32
4.2.2. Impregnação por íons prata.....	32
4.2.3. Bandamento – C.....	32
4.2.4. Variante de CEC.....	33
5. Discussão.....	46
5.1. Mecanismos de meiose em Triatomíneos.....	47
5.2. Relação entre as regiões heterocromáticas e o nucléolo.....	48
5.3. Diferenciação estrutural da heterocromatina nos cromossomos holocêntricos dos triatomíneos.....	48
5.4. Atividade nucleolar na meiose dos triatomíneos.....	50
6. Conclusões	53
7. Referências Bibliográficas.....	56
8. Bibliografia Consultada.....	67

Lista de Figuras e Quadro

Figura 1: Cariótipo/Cariograma de <i>Triatoma maculata</i>	22
Figura 2: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	23
Figura 3: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	24
Figura 4: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	25
Figura 5: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de impregnação por íons prata.....	26
Figura 6: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de impregnação por íons prata.....	27
Figura 7: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	28
Figura 8: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	29
Figura 9: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	30
Figura 10: Túbulos seminíferos de <i>T. maculata</i> submetidos à técnica de Variante de CEC.....	31
Figura 11: Cariótipo/Cariograma de <i>T. pseudomaculata</i>	34
Figura 12: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	35
Figura 13: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	36
Figura 14: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de orceína lacto-acética.....	37
Figura 15: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de impregnação por íons prata.....	38
Figura 16: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de impregnação por íons prata.....	39

Figura 17: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de impregnação por íons prata.....	40
Figura 18: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	41
Figura 19: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	42
Figura 20: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de bandamento – C.....	43
Figura 21: Túbulos seminíferos de <i>T. pseudomaculata</i> submetidos à técnica de Variante de CEC.....	44
Quadro – I: Resumo de algumas características da espermatogênese de <i>Triatoma maculata</i> e <i>Triatoma pseudomaculata</i>	45

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A: autossomos

AF: aumento final

AgNOR: proteínas argênticas da Região Organizadora Nucleolar

AT: azul de toluidina

B23: proteína nucleolar (numatrina)

°C: graus Celsius

C23: proteína nucleolar (nucleolina)

CEC: concentração eletrolítica crítica

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNAr: ácido desoxirribonucléico ribossômico

FISH: hibridação *in situ* fluorescente

H₂O: água

HCl: ácido clorídrico

MI: meiose I

MII: meiose II

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitros

RNA: ácido ribonucléico

RNAr: ácido ribonucléico ribossômico

RNPs: ribonucleoproteínas

RONs: regiões organizadoras nucleolares

S: sexuais

SSC: solução salina concentrada

Resumo

Os triatomíneos são vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da moléstia de Chagas. Esses insetos são hematófagos e pertencem à ordem Heteroptera e à família Reduviidae. Disseminada por grandes extensões do Brasil e de outros países latino-americanos, a doença de Chagas representa um grave e importante problema de saúde pública, caracterizando limitações e dificuldades aos tratamentos. Isso ocorre devido à precariedade apresentada pela vida dos contingentes humanos mais expostos à infecção. Atualmente, a parasitose tem grande participação entre as doenças cardíacas na América do Sul. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que, até a década de 90, por volta de 20 milhões de indivíduos estavam infectados pelo *Trypanosoma cruzi* nas áreas endêmicas. Dados atuais revelam que o número de pessoas infectadas foi reduzido para 9,8 milhões graças à intensa erradicação desses insetos. No entanto, a vigilância deve continuar, pois é fundamental para se evitar novos casos. Citogeneticamente, o interesse sobre os triatomíneos está em seus cromossomos holocêntricos e no processo incomum da meiose, cuja segregação dos sexuais é pós-reducional. O número básico de cromossomos nos triatomíneos é de $2n=22$. No presente trabalho foi analisado a espermatogênese de duas espécies do gênero *Triatoma* (*Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*), com ênfase aos seguintes aspectos: fases da espermatogênese; estrutura cromatínica e dos cromossomos meióticos e acompanhamento do ciclo nucleolar. Essas espécies estão distribuídas principalmente nos estados do Nordeste brasileiro e são consideradas potencialmente vetores do *T. cruzi*. As espécies analisadas foram cedidas pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP. Os órgãos estudados foram os testículos de machos adultos, que após o esmagamento celular, foram submetidos às seguintes técnicas citoquímicas: coloração orceína lacto-acética; impregnação por íons prata; bandamento – C e variante de CEC. Os resultados indicam que nas duas espécies foi observada uma associação entre nucléolo e regiões heterocromáticas, tanto nas células interfásicas somáticas como nas da linhagem germinativa. A localização dessas regiões específicas evidencia, mais uma vez, a íntima relação funcional entre essas estruturas. Os cariogramas das duas espécies, montados com base nas metáfases I, indicaram 10 autossomos e um par de cromossomos sexuais (22 cromossomos), coincidentes, portanto, com o número modal do grupo. A técnica de bandamento – C revelou que o cromossomo Y é heterocromático nas duas espécies. No ciclo meiótico evidenciou-se que a atividade nucleolar persiste até o final da prófase I (diplóteno-diacinese) quando, então, ocorre a fragmentação dessa estrutura em pequenos corpúsculos (partículas de ribonucleoproteínas – RNP); nas fases iniciais da espermatogênese até a fase de alongação das espermátides, é visível um corpúsculo de RNP análogo ao “corpo cromatóide” verificado na espermatogênese de vertebrados. As abordagens citoquímicas utilizadas ampliaram e reforçaram os conhecimentos das características citogenéticas semelhantes e diferentes desses triatomíneos.

Palavras-chave: Triatomíneos; cromossomos holocêntricos; meiose; Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs); Heterocromatina; Nucleologênese.

Abstract

The triatomines are vectors of the protozoan *Typanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas' disease. These insects are hematophages that belong to the order Heteroptera and to the family Reduviidae. Disseminated through large portions of Brazil and of other Latin American countries, Chagas' disease represents a grave and important public health problem, characterizing limitations and difficulties in treatments. This occurs due to the precariousness presented by life contingent to humans most exposed to the infection. Currently, parasitosis presents high participation among cardiac diseases in South America. According to the World Health Organization, it is estimated that, until the 1990s, approximately 20 million individuals were infected by *Trypanosoma cruzi* in endemic areas. Current data reveal that the number of persons infected was reduced to 9.8 million by virtue of intense eradication of these insects. Nevertheless, vigilance must continue, since it is fundamental to avoiding new cases. Cytogenetically, the interest in triatomines is in its holocentric chromosomes and in its uncommon meiosis process, whose sexual segregation is post-reductional. The basic number of chromosomes in triatomines is $2n=22$. The present work analyzed the spermatogenesis of two species of the genus *Triatoma* (*Triatoma maculata* and *Triatoma pseudomaculata*), with emphasis on the following aspects: spermatogenesis phases; structure of chromatin and of meiotic chromosomes and accompaniment of the nucleolar cycle. These species are distributed principally in the states of northeastern Brazil and are considered potential vectors for *T. cruzi*. The species analyzed were supplied by the insectary of the Special Health Service of Araraquara (SESA), belonging to the Department of Epidemiology in the School of Public Health at USP. The organs studied were the testicles of adult males, that after cellular crushing were submitted to the following cytochemical techniques: lacto-acetic orcein staining; impregnation by silver ions; C-banding and variant of CEC. The results indicate that in the two species an association was observed between the nucleolus and heterochromatic regions, in both interphasic somatic cells and the germ line. The localization of these specific regions evidence, once more, an intimate functional relationship between these structures. The kariograms of the two species, mounted based on metaphases I, indicated 10 autosomes and one pair of sexual chromosomes (22 chromosomes), coincidental, however, with the modal number of the group. The C-banding technique revealed that the Y chromosome is heterochromatic in both species. The meiotic cycle evidenced that nucleolar activity persists until the end of prophase I (diplotene-diacinese) when, consequently, fragmentation of this structure occurs in small corpuscles (particles of ribonucleoproteins – RNP); in initial phases of spermatogenesis until the spermatid elongation phase, one RNP corpuscle is visible that is analogous to the chromatoid body verified in vertebrate spermatogenesis. The cytochemical approaches utilized amplify and reinforce the knowledge on cytogetic characteristics that are similar to and different from these triatomines.

Key words: Triatomines; holocentric chromosomes ; meiosis; Nucleolar Organizing Regions (NORs); Heterochromatin; Nucleogenesis.

1- Introdução

1.1- Importância epidemiológica dos triatomíneos

A subfamília Triatominae possui um destaque médico-sanitário e citogenético, sendo constituída de dezessete gêneros. Desses, três são os principais transmissores da doença de Chagas: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Os triatomíneos possuem grande importância para a parasitologia humana, pois são vetores do *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado causador da doença de Chagas. Esses insetos são hematófagos e pertencem à ordem Heteroptera e à família Reduviidae. Transmitem a doença por seu hábito de defecar, após a hematofagia, sobre os olhos, nariz, boca e outras áreas próximas, visto que esses insetos sugam sangue até se acharem repletos. Neste momento o parasita passa das fezes do artrópode para a circulação sanguínea e/ou regiões de mucosa do hospedeiro - o que também pode ocorrer através de micro cortes causados pelo ato de coçar o local por onde o barbeiro sugou o sangue. Os insetos da ordem Heteroptera são compostos por organismos fitófagos (família Pentatominae), entomófagos e hematófagos, sendo os dois últimos pertencentes à família Reduviidae.

A doença de Chagas humana é um fato “acidental,” pois a medida que o homem invadiu focos naturais e provocou desequilíbrios ecológicos, os triatomíneos infectados passaram a se adaptar em casas rurais de má qualidade. Esse contexto ecológico explica, em parte, o processo de desencadeamento dos mecanismos que levaram ao aparecimento da doença em seres humanos. Devemos levar em consideração os fatores econômicos, sociais e culturais, pois o “Mal de Chagas” advém da pobreza, caracterizada por condições precárias de moradia, saneamento e educação.

Disseminada por grandes extensões do Brasil e de outros países latino-americanos, essa doença representa um grave e importante problema de saúde pública, caracterizando limitações e dificuldades aos tratamentos. Isso ocorre devido a precariedade apresentada pela vida dos contingentes humanos mais expostos à infecção. Atualmente, a parasitose tem grande participação entre as doenças cardíacas na América do Sul. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que, até a década de 90, cerca de 20 milhões de indivíduos eram infectados pelo *Trypanosoma cruzi* nas áreas endêmicas (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996; Tartarotti, 2006). Dados mais recentes revelam que o número de pessoas infectadas foi reduzido para 9,8 milhões, graças a 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. No entanto, teme-se que esse sucesso na redução da carga epidemiológica poderá também diminuir o interesse político e, conseqüentemente, as verbas operacionais para o controle, pois a vigilância é fundamental para se evitar novos casos da doença (Schofield et al., 2006).

Dentre as características biológicas dos triatomíneos podemos citar que são insetos de vida relativamente longa (1 a 2 anos) com evolução de ovo a adulto entre 4 e 7 meses, passando por 5 estádios de ninfas não aladas antes de atingir a fase adulta. O barbeiro tem boa performance biológica em termos de oviposição, a fêmea copula uma vez e inicia a oviposição, aproximadamente 30 dias após a fecundação, de 200 ovos em parcelas de 1 a 45 ovos, e grande capacidade de resistência ao jejum em torno de 6 a 10 meses (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Os mamíferos de pequeno porte infectados por triatomíneos silvestres, não são significativamente afetados pelo *T. cruzi* (o que sugere longos períodos de adaptação entre os mamíferos e o protozoário). A ação antrópica no ambiente, porém, fez esses insetos passarem a viver em frestas de casas rurais de pau-a-pique e a transmitirem o protozoário aos humanos que, não adaptados ao *Trypanosoma* como os outros mamíferos de pequeno porte, desenvolvem a doença (Neves, 1991).

É importante ressaltar que os triatomíneos nascem livres do *Trypanosoma* contraindo a infecção em qualquer estágio de sua vida, ao sugar o sangue contaminado do homem ou de algum reservatório. Os barbeiros têm hábitos noturnos, fotofobia, termotropismo positivo, mimetismo acentuado de certas espécies e hábito quase que obrigatório de evacuar imediatamente após o repasto sangüíneo (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996; Tartarotti, 1998).

Segundo Silveira (1983), das 44 espécies de triatomíneos identificadas, as mais importantes pelo seu grau de contágio são: *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*. As espécies secundárias seriam: *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma vitticeps*.

Para a profilaxia da doença de Chagas, é necessário associar dados biológicos dos redúvidos, que fornecem informações sobre a distinção entre espécies silvestres de baixo risco e espécies domiciliares nocivas, hábitos e horários de hematofagia, capacidade reprodutiva, resistência a inseticidas, ciclo evolutivo, reservatórios domésticos e silvestres do agente

etiológico, bem como as inter-relações entre espécies e gêneros estudados no contexto evolutivo, por meio de ensaios citogenéticos que comparam padrões cromossômicos que podem ser aplicados ao estudo da filogenia dos triatomíneos, contribuindo para o conhecimento biológico (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1996; Tartarotti, 1998).

1.2- Citogenética de Triatomíneos

Citogeneticamente, o interesse sobre os triatomíneos está em seus cromossomos com cinetócoros difusos (Schrader, 1947; Hughes-Schrader & Scharader, 1961 apud De Vaio et al., 1985), ou seja, com distribuição ao longo do cromossomo ao invés de localização na região centromérica. A meiose desses insetos merece também destaque, pois na primeira divisão (anáfase I) os autossomos são quiasmáticos e segregam-se regularmente e os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e dividem-se equacionalmente, com segregação desses na segunda divisão (anáfase II), ou seja, com segregação dos cromossomos sexuais pós-reducional (Schreiber & Pellegrino, 1950; Barth, 1956; Ueshima, 1966; Solari, 1979 apud De Vaio et al., 1985).

O número básico de cromossomos para os triatomíneos é de 22, sendo 10 pares de cromossomos autossomos e 1 par de heterocromossomos sexuais (Ueshima, 1966). Porém, existem espécies com múltiplos cromossomos sexuais (XY, X_1X_2Y , $X_1X_2X_3Y$), causados pela fragmentação do X original, e também aquelas que apresentam 9 (*Panstrongylus megistus* e *Triatoma nítida*) ou 11 pares de autossomos (*Triatoma rubrofasciatus*) (Payne, 1909; Troedson, 1944; Manna 1950; Schreiber & Pellegrino, 1950; Barth, 1956; Rickeman, 1962; Ueshima, 1966; Schreiber et al., 1974). As espécies *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata* também possuem 22 cromossomos, com dez pares de autossomos e um par de heterocromossomos sexuais (20A + XY) (Azeredo-Oliveira, 1990; Pérez et al., 1992; Carcavallo et al., 1999).

Os estudos citogenéticos em triatomíneos tiveram início em 1948, quando Schreiber e Pellegrino estudaram o cariótipo de oito espécies de *Triatoma*, uma de *Panstrongylus*, uma de *Rhodnius* e uma de *Psammolestes*. Em *Triatoma infestans*, alguns estudos evidenciaram fenômenos heteropicnóticos em certos autossomos (Schreiber & Pellegrino, 1950; De Vaio et al., 1985). Ficou evidente a compactação dos três maiores autossomos, ligados aos cromossomos sexuais na diacinese, logo após o “estágio difuso” - prófase precedente à diacinese, com estrutura nuclear tipicamente interfásica, na qual somente o nucléolo e os heterocromossomos sexuais são

visíveis. Fenômenos análogos menos evidentes foram constatados em *T. platensis*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *T. nitida*. Para o *T. infestans*, também foi verificado o fato de que três cromossomos, de tamanho maior de que os demais aparecem nitidamente compactados e ligados ao grupo X e Y na fase inicial da diacinese, logo após o estágio difuso. É provável que esses três cromossomos diferenciados nessa espécie indicam a existência de um ciclo de replicação precoce em relação aos demais cromossomos sexuais com os quais parecem ligados por delgados filamentos.

Outros estudos dividem os autossomos quanto ao tamanho em: três grandes (A, B e C); dois médios (D e E) e cinco pequenos (F, G, H, I e K) (Barth, 1956). Ainda em relação aos autossomos A, B e C e o cromossomo Y, a técnica de bandamento C localizou blocos heterocromáticos nesses cromossomos (Solari, 1979; Mello & Recco-Pimentel, 1987). Os blocos heterocromáticos ocupam a mesma posição nos cromossomos de um cariótipo, e sua quantidade e posição diferem de espécie para espécie (Summer, 1990). A heterocromatina é muitas vezes completamente eliminada de células somáticas, mas sempre está conservada nas células germinativas (Summer, 1990), localizando-se, preferencialmente, nas extremidades dos cromossomos nos heterópteros (Camacho et al., 1985). Estudos com populações de *Triatoma infestans* do Uruguai mostraram variações intraespecíficas no número, posição e tamanho desses blocos dos cromossomos A, B e C, causadas, provavelmente, por adições ou deleções de heterocromatina constitutiva, indicando serem essas as principais variações cariotípicas na evolução desta espécie (Panzera et al., 1992).

Grande parte das publicações tem por objetivo a comparação por meio de coloração convencional dos cromossomos. Nesses trabalhos, são consideradas comparações quanto ao número e a morfologia dos cromossomos, bem como a disposição desses na placa metafásica. Esses dados nos dão suporte quanto à evolução cromossômica desses insetos (De Vaio et al., 1985).

Existem evidências de que algumas espécies vegetais e insetos heterópteros possuem cromossomos holocêntricos. Esses cromossomos são interpretados como tendo atividade cinetocórica difusa ou com inúmeros e discretos centrômeros. Ao microscópio de luz, as cromátides caracterizam-se por não apresentar constrições primárias e os cromossomos anafásicos migram paralelos uns aos outros e não em forma de V como fazem os monocêntricos.

Em análise ao microscópio eletrônico foi possível demonstrar a existência de várias placas cinetocóricas ou de uma única placa ao longo de quase toda a cromátide (Guerra, 1988).

Com os estudos realizados em heterópteros, o conceito de cromossomos com atividade centromérica difusa recebeu maior suporte. O cinetócoro envolve 75% da extensão cromossômica de *Oncopeltus fasciatus* durante a mitose, já, na meiose, os microtúbulos são observados ao longo de quase todo o cromossomo e a placa cinetocórica apresenta-se completamente perdida. Isto sugere que em organismos com cromossomos holocêntricos a formação do aparato cinetocórico meiótico deve ser suprimida para permitir a terminalização dos quiasmas. Todos os dados estão de acordo com o fato de que muitos organismos com esse tipo de cromossomo apresentam meiose invertida com divisão equacional ocorrendo na meiose I (MI) e a divisão reducional ocorrendo na meiose II (MII), com o desaparecimento da placa cinetocórica para que os cromossomos se auto-orientam na MI, devido à inserção de microtúbulos em todas as porções dos cromossomos (Severi-Aguiar & Azeredo Oliveira, 2002).

Certa restrição da atividade cinetocórica nas regiões terminais dos cromossomos foi observada em Heteroptera. Hughes-Schrader & Shrader (1961) sugerem que tal inibição seja temporária, mas há evidências indicando que esse fato ocorre na maior parte dos organismos com cinetócoro difuso. A atividade cinética restrita às regiões cromossômicas terminais e a ausência de estruturas cinetocóricas nessas regiões são consideradas características gerais da meiose em cromossomos holocinéticos (Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999a). É interessante o comportamento dos cromossomos meióticos de Heteroptera, onde ambas as extremidades dos cromossomos são capazes de mostrar atividade cinética e que as regiões terminais cineticamente ativas durante a primeira divisão meiótica são inativas na segunda divisão (Gonzalez-Garcia et al., 1996). Processos como *crossing-over*, terminalização de quiasmas e orientação de bivalentes na placa metafásica podem ser facilitados com essas características (Coming & Okada, 1972; Gonzales-Garcia et al., 1996).

Podemos observar durante a mitose de cromossomos com cinetócoros difusos a ausência de constrição primária e a migração uniforme de cromossomos inteiros em direção aos pólos. Nesses cromossomos as fibras do fuso parecem ser inseridas ao longo da maior parte do comprimento da cromátide, sugerindo a participação quase que total do cromossomo no arranjo das fibras do fuso e de seus próprios movimentos (Tavares, 1996).

Termos como pré-redução e pós-redução têm sido muito utilizados para a descrição do comportamento dos cromossomos sexuais durante a meiose. Pré-redução significa que os cromossomos segregam-se reducionalmente na primeira divisão. Pós-redução significa que a separação equacional dos cromossomos sexuais tem lugar na primeira anáfase e a segregação dos cromossomos sexuais tem lugar na segunda divisão (Tavares, 1996).

Essa seqüência invertida tem sido registrada em muitos organismos e é particularmente proeminente nos organismos com cromossomos holocêntricos. Nos heterópteros, a pós-redução dos cromossomos sexuais é predominante (Ueshima, 1979), embora sua alteração para o padrão pré-reducional tenha sido verificada em algumas famílias como Tigidae, o que torna incerto se a meiose pré-reducional representa um mecanismo original ou se foi uma adaptação secundária (Manna, 1950).

Panzer et al. (1992) descreveram variações intra-específicas em populações naturais de *Triatoma infestans* do Uruguai. Foram observadas variações no número, posição e tamanho das bandas-C heterocromáticas nos três maiores pares de autossomos da espécie. As variações foram atribuídas a possíveis adições ou deleções na heterocromatina constitutiva, que, provavelmente, representam as principais maneiras de alterações cariotípicas do processo evolutivo de *Triatoma infestans*.

Em 1995, Panzera e colaboradores publicaram um trabalho, no qual dados sobre o padrão de banda-C, conteúdo de DNA e o processo meiótico de machos de *Triatoma platensis* e *Triatoma delpontei* foram comparados com os de *Triatoma infestans*. Verificaram que apesar dessas espécies apresentarem certas características semelhantes, tais como, mesmo número diplóide de cromossomos, grandes blocos heterocromáticos autossômicos e cromocentros meióticos heterocromáticos, elas possuem diferenças quanto ao comportamento cromossomal meiótico, conteúdo de DNA, além de quantidade e localização específica da heterocromatina. A análise dos dados citogenéticos sugere que *T. infestans* e *T. platensis* são espécies mais relacionadas uma com a outra do que *T. delpontei*. Entretanto, as diferenças, a distribuição e a quantidade de heterocromatina não possuem um papel direto na especiação deste grupo (Tartarotti, 1998).

Tavares & Azeredo-Oliveira (1997a) analisaram cinco espécies de triatomíneos (*Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*) e sugeriram que as diferenças no conteúdo de DNA são principalmente devido a variações na quantidade de

heterocromatina-C, interpretada como perda ou ganho de regiões-C. Os autores acreditam que a presença de cromossomos meióticos e mitóticos facilitam a transferência de material C- positivo. Em *T. brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* foi observado que o núcleo no estágio difuso da prófase meiótica apresentava um simples cromocentro, formado exclusivamente pela heterocromatina associada aos cromossomos sexuais. Em *T. delpontei*, um grande cromocentro possivelmente originou-se por associação heteróloga das regiões heterocromáticas de todos bivalentes autossômicos e em ambos os cromossomos sexuais.

Aspectos como atividade nucleolar na intérfase e em células meióticas também foram analisadas nessas mesmas cinco espécies de triatomíneos. Vários blocos nucleolares foram observados nos núcleos poliplóides dos túbulos testiculares, enquanto somente um único corpo nucleolar foi evidente no estágio difuso de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia* e *T. rubrovaria*, sendo que em *T. sordida* foram observadas duas marcações nucleolares. O número de corpúsculos nucleolares presentes nas espermátides de cada espécie variou dentre as espécies, sugerindo uma adicional provisão de informação para a biossíntese de RNAr. É possível que o aumento no número de corpúsculos nucleolares presentes nos núcleos poliplóides esteja relacionado com o aumento na síntese de RNAr nestes núcleos. Além disso, o fato do núcleo espermatoγονial possuir vários blocos nucleolares, parece refletir tanto diferenças funcionais como metabólicas. No caso do núcleo espermatoγονial, uma reduzida necessidade faz com que um único nucléolo seja suficiente (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997b).

Para maior elucidação dos mecanismos que envolvem os fenômenos citogenéticos característicos dos triatomíneos durante a divisão celular (cromossomos holocêntricos; origem dos cromossomos sexuais; cromossomos sexuais aquiasmáticos e com segregação pós-reducional na meiose; atividade nucleolar, etc), serão necessárias novas abordagens em várias outras espécies utilizando técnicas citoquímicas clássicas e moleculares.

1.3- Aspectos biológicos de *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*

A espécie *Triatoma maculata* é freqüentemente domiciliar e habitualmente silvestre, sendo encontrada em ninhos de aves, palmeiras, bromélias epífitas e cavernas, com uma distribuição brasileira pelos estados de Alagoas, Bahia, Brasília (Distrito Federal), Ceará, Goiás, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Maranhão, Roraima e Rio Grande do Norte. Nos últimos 10 anos foi registrado um aumento de incidência da doença na região Amazônica e foi observado

que todos os elementos do ciclo de transmissão estão presentes nessa região. Estudos realizados no Estado de Roraima indicam que *T. maculata* deve ser considerada potencialmente vetor do *T. cruzi* por ter as seguintes características: capacidade de infestar ecótopos artificiais no peridomicílio; alimentação freqüente durante o período pré-ninfal; ciclo de desenvolvimento relativamente curto com 2,9 gerações/ano; hábitos ecléticos de alimentação; defecação imediata após hematofagia quando ainda no hospedeiro e, também, devido ao fato de ter sido encontrada infectada pelo protozoário. Os hábitos alimentares silvestres de *T. maculata* incluem: aves, roedores, gambás e répteis; no ambiente domiciliar e peridomiciliar as fontes são animais domésticos e o próprio homem. Nas Américas a distribuição inclui a Venezuela, Colômbia, Suriname, Guiana Francesa, Aruba, Bonaire e Curaçao. Particularmente na Venezuela, *T. maculata* foi encontrado infestando domicílios em áreas endêmicas, sendo que nestas áreas os espécimes estavam naturalmente infectados pelo *T. cruzi*.

A espécie *Triatoma pseudomaculata* é ocasionalmente domiciliar ou peridomiciliar e pode ser encontrada no ambiente silvestre, provavelmente em esconderijos de roedores e marsupiais, ocos de árvores, currais, galinheiros, estábulos, mas sem colonização, e, às vezes, dentro das casas. Em algumas áreas essas espécies podem ser consideradas como vetores de importância secundária (Carcavallo, 1999), apresentando baixa taxa de infecção por *Trypanosoma cruzi* (Freitas, et al., 2005). No Brasil, *T. pseudomaculata* é tipicamente encontrado na região Nordeste e é considerado um dos cinco mais importantes transmissores do *Trypanosoma cruzi* (Vitta, 2002).

Lenta e progressivamente, *T. pseudomaculata* vem se instalando nos ecótopos artificiais, alcançando certo grau de antropofilia e aumentando suas taxas de colonização no peridomicílio em vários estados, tornando-se, assim, uma espécie em transição (Dias et al., 2000). Dias (1991) comenta sobre a dificuldade da erradicação do *Triatoma pseudomaculata*, pois trata-se de uma espécie nativa, ubiquista que ocorre em grandes quantidades no meio extradomiciliar, especialmente em regiões pobres e isoladas da área endêmica. Forattini e colaboradores (1981) classificaram-na como de moderada tendência à domiciliação mas com elevada ornitofilia, embora o estudo da preferência alimentar tenha atribuído a essa espécie um ecletismo alimentar. Apesar de incluída entre as cinco espécies mais importantes pela transmissão da doença de Chagas no Brasil, não há muitos estudos a respeito da sua biologia (Heitzmann-Fontenelle, 1972; Perlowagora-Szumlewezc, 1976). Gonçalves e colaboradores (1997) relatam que *T.*

pseudomaculata utiliza a ave como fonte alimentar. Nesse trabalho esses autores verificaram não só a ornitofilia já observada por Forattini et al. (1981), mas também evidenciaram as modificações dos parâmetros fisiológicos ocasionadas por alimentação artificial (De Isola et al. 1980). Comparando com os resultados obtidos com outras espécies (Zeledón et al. 1970), *T. pseudomaculata* ingere uma menor quantidade de sangue, demonstrando não ser uma espécie espoliativa, o que não interfere na capacidade de adquirir a infecção (Perlowagora-Szumlewicz & Mullerr, 1982). Não foi observada diferença na quantidade de sangue ingerida entre as ninfas que evoluíram para adulto (machos e fêmeas), discordando dos resultados obtidos para *T. infestans* (Perlowagora-Szumlewicz, 1976 ; Tolezano et al., 1984; Gonçalves et al., 1997).

Heitzmann-Fontenelle (1972) verificou que *T. pseudomaculata* só defeca sobre o hospedeiro quando atinge a repleção e, quando o faz gira o corpo 80°, eliminando as fezes próximas ao local da picada, aumentando, dessa forma, a chance de transmissão do *T. cruzi*. Segundo Gonçalves e colaboradores (1997), quanto mais jovem for a fase do inseto, maior o número de defecações, assim, as chances de adquirir e transmitir a infecção são menores (Torres, 1915).

A alta temperatura acelera o processo de alimentação (Wood, 1951) e de defecação (Maddrell, 1964), que são fatores de extrema importância do ponto de vista epidemiológico. Tendo em vista que *T. pseudomaculata* tem sua ocorrência assinalada em áreas de clima quente, possivelmente, na natureza, o seu comportamento frente a esses parâmetros apresente algumas diferenças (Gonçalves et al.; 1997).

Apesar dos conhecimentos relatados sobre os aspectos biológicos comportamentais e ecológicos das espécies *Triatoma maculata* e *T. pseudomaculata*, pouco se conhece sobre as características citogenéticas, bioquímicas, moleculares e taxonômicas desses insetos hematófagos, excetuando-se alguns trabalhos (Schofield, 1988; Perez et al., 1992; Carcavallo et al., 2000; Santos et al., 2007). O conhecimento de outros parâmetros citogenéticos será importante para reconhecer a diferenciação entre essas espécies de triatomíneos, cujas características são semelhantes.

2- Objetivos

No presente trabalho foi realizado um estudo comparativo entre as espécies *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*, com base no uso de técnicas citogenéticas convencionais, dando ênfase aos seguintes aspectos:

- 2.1- Análise da espermatogênese e da estrutura cromatínica;
- 2.2- Caracterização da estrutura dos cromossomos meióticos;
- 2.3- Acompanhamento do ciclo nucleolar na espermatogênese;

3- Material e Método

3.1- Obtenção dos insetos

As espécies *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata* foram fornecidas pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. A espécie *T. maculata* foi originada geograficamente do nordeste do Brasil (Pernambuco, Rio Grande do Norte e Pará) e a espécie *T. pseudomaculata* foi procedente do Brasil (Pernambuco) e da Venezuela. Para as análises citogenéticas foram utilizados 23 indivíduos da espécie *T. maculata* e 19 indivíduos de *T. pseudomaculata*.

3.2- Órgãos analisados

No presente trabalho foram utilizados os testículos dos insetos hematófagos (machos adultos) das espécies *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

3.3- Dissecção dos insetos

Os insetos foram eterizados e depositados sobre uma placa de Petri contendo parafina sólida e, depois, foram fixados com alfinetes, espetados na região posterior do cefalotórax e, em seguida, patas e asas foram retiradas. Com o uso de uma tesoura pequena e pontiaguda, as laterais do abdômen (região quitinosa), foram cortadas e, nesse momento, foi gotejada a solução fisiológica (Demerec). Sob o microscópio estereoscópio foi feito um corte transversal na região anterodorsal no exoesqueleto abdominal, que foi rebatido para trás e preso com alfinete, expondo internamente toda região abdominal.

Os testículos estão localizados na porção anterior do hemocelo envoltos por uma membrana clara e leitosa. Essa membrana foi retirada e os túbulos seminíferos foram expostos e colocados sobre uma lâmina para serem separados.

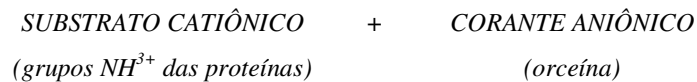
3.4- Preparações citológicas

3.4.1- Coloração Padrão: Orceína Lacto – Acética (De Vaio et al., 1985, com modificações)

- a. Dissecar o inseto adulto em solução fisiológica de Demerec;
- b. Depositar o órgão em solução aquosa de ácido acético a 45%, por um minuto;

- c. Transportar o material para uma orceína lacto-acética 2%, por 10 minutos;
- d. Cobrir o material com uma lamínula e efetuar o esmagamento.

Mecanismo: Esta técnica citoquímica destaca a eucromatina da heterocromatina, corando a segunda mais fortemente que a primeira. Isto ocorre porque na heterocromatina, além de se encontrar maior compactação, a quantidade de proteínas é bem maior que na eucromatina (Vidal & Mello, 1987). O mecanismo dessa coloração compreende, de forma simplificada, a ligação das moléculas dos substratos carregados positivamente (catiônicas) dos grupos amina de resíduos protéicos ($-NH^{3+}$), com as moléculas do corante (orceína) que possuem cargas negativas (aniônicas). A ligação pode ser esquematizada como:



3.4.2- Tratamento e Colorações Específicas

3.4.2.1- Preparações Citológicas para Coloração

- a. Dissecar o inseto em solução fisiológica Demerec;
- b. Transportar o órgão para uma solução aquosa de ácido acético a 45%, por um minuto;
- c. Transportar o órgão para solução aquosa de ácido láctico a 50%, por 5 minutos;
- d. Cobrir o material com uma lamínula e esmagar em ácido acético a 45%;
- e. Depositar as lâminas em câmara úmida por aproximadamente 10 minutos;
- f. Retirar a lamínula com auxílio de nitrogênio líquido. As lâminas secas podem ser guardadas no freezer por vários dias e a coloração específica processada posteriormente;

3.4.2.1.1- Impregnação com Nitrato de Prata (Howell & Black, 1980, com modificações)

- a. Tratar a lâmina com o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%; acrescida de 0,5 ml ácido fórmico);
- b. Adicionar sobre esta, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las;
- c. Cobrir com lamínula;
- d. Colocar as lâminas em placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água deionizada, e incubar em estufa a $\pm 70^{\circ}$ C, até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada, cerca de 8 - 11 minutos;

- e. Lavar a lâmina em água deionizada até que a lamínula desprenda-se, deixar secar ao ar e montar em verniz para observação ao microscópio.

Mecanismo: A técnica de impregnação por íons prata é um dos métodos clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), nos cromossomos metafásicos, e das áreas nucleolares, nos núcleos interfásicos. Duas proteínas nucleolares podem ser reduzidas por íons prata: C23 (nucleolina) e B23 (numatrina). Dessas proteínas, somente a C23 está associada ao DNAr, sugerindo ser a “verdadeira proteína AgNOR”. O padrão de marcação por íons prata sugere que essas duas proteínas ácidas sejam responsáveis pela impregnação nucleolar: a C23 indica a presença da cromatina descondensada ligada à RON e a B23 indica a localização dos precursores ribossomais (Osch & Bush, 1984; Casseb-Hassan & Azeredo-Oliveira, 1999).

3.4.2.1.2- Bandamento – C (Sumner, 1972, com algumas modificações)

- a. Tratar a preparação citológica com HCL 0,2N à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), por 10 minutos;
- b. Lavar uma vez, rapidamente, em água deionizada gelada;
- c. Lavar uma vez em água deionizada à temperatura ambiente;
- d. Secar ao ar;
- e. Tratar com hidróxido de Bário a 5% (pré - aquecido), filtrado, por 15 minutos à temperatura de 60°C;
- f. Lavar em água deionizada gelada;
- g. Lavar rapidamente em água deionizada contendo 2 a 3 mL de ácido acético (3%);
- h. Dar dois banhos em água deionizada, 5 minutos cada;
- i. Secar ao ar;
- j. Incubar em 2XSSC à temperatura ambiente por 10 minutos;
- k. Incubar em 2XSSC a 60°C, por uma hora;
- l. Lavar em água deionizada gelada;
- m. Mergulhar em álcool 70% e 90%, 5 minutos cada;
- n. Corar com Giemsa a 4% em tampão fosfato, pH 6.8, por 20 minutos;
- o. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
- p. montar em verniz cristal para observação ao microscópio.

Mecanismo: Na técnica de bandamento – C, o tratamento com solução básica de hidróxido de bário e solução salina, à temperatura elevada, leva à fragmentação e posterior eliminação do DNA do material biológico. No entanto, o DNA da heterocromatina constitutiva não é totalmente extraído, uma vez que sua associação com as proteínas, nesta estrutura, é mais resistente que na eucromatina. Como resultado desse processo, as regiões heterocromáticas coram-se mais fortemente pelo Giemsa, sendo visualizadas ao microscópio de luz, como blocos escuros de cor roxa. Segundo GUERRA (1988), o corante Giemsa cora todo o material cromatínico mesmo quando este apresenta pouca quantidade de DNA.

3.4.2.1.3- Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) (Mello et al., 1993)

- a. Corar com Azul de Toluidina a 0,025% - diluído em tampão MacIrvine (pH 4,0), por 15 - 20 minutos;
- b. Lavar em água destilada;
- c. Mergulhar o material em solução de $MgCl_2$ a 0,05M: o tempo deve ser controlado até que o DNA (cromatina) esteja corado em verde e o RNA (nucleolar e citoplasmático) em azul (aproximadamente de 1 a 3 minutos).
- d. Lavar rapidamente em água destilada;
- e. Secar ao ar;
- f. Montar em verniz cristal.

Para o controle da reação, o material não deve ser tratado com a solução de $MgCl_2$, apenas corado com Azul de Toluidina.

Mecanismo: A coloração que se observa com esta técnica é devida ao fenômeno de basofilia, definido por VIDAL & MELLO (1987) como sendo a reação de ligação de uma substância de caráter aniônico (ácida) com uma molécula de natureza catiônica (básica). Neste presente estudo o corante catiônico foi o azul de toluidina (AT) a pH 4,0, que se liga eletrostaticamente aos grupamentos fosfatos (componentes aniônicos) dos ácidos nucleicos. Dessa forma DNA e RNA coram-se em violeta (metacromático). Entretanto, quando o material é tratado com solução de cloreto de magnésio, esses íons inorgânicos competem com as moléculas catiônicas do corante pelas cargas negativas dos fosfatos livres do DNA. Dessa forma, a metacromasia do RNA é mantida, mas a do DNA é totalmente abolida, exibindo a cor verde. Assim, é possível evidenciar e distinguir complexos de DNA/proteínas (tonalidades esverdeadas) dos RNA/proteínas (colorações violetas).

3.5- Fotomicrografias

Parte das fotomicrografias foram obtidas no microscópio Zeiss Jeneval, com sistema fotográfico acoplado, utilizando-se filmes coloridos Kodak Gold 400 ASA. As revelações foram realizadas em laboratórios fotográficos especializados. A ampliação final (AF) das fotomicrografias foi calculada da seguinte forma:

AF =	objetiva	X	optovar	X	Ocular projetiva	X	ampliação	
Ocular projetiva (2:1) - AF =	100	X	1	X	3,2	X	4,2 =	1344X
Ocular projetiva (4:1) - AF =	100	X	1	X	3,7	X	4,2 =	1554X

As lâminas também foram analisadas em microscópio Olympus BX40, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows.

4- Resultados

4.1- *Triatoma maculata*

4.1.1- Orceína Lacto - Acética

O Cariograma de *Triatoma maculata* (figura 1a), baseado na metáfase I, apresentou 10 pares de cromossomos autossomos, sendo um deles de tamanho maior, e um par de cromossomos sexuais (heterocromossomos - XY) (figura 1b, c). Os núcleos poliplóides da parede do túbulo seminífero apresentaram uma massa cromocêntrica heteropicnótica descontínua (figura 2a). Na prófase I (estágio difuso) foi possível observar diferentes graus de compactação dos cromossomos; estágio difuso inicial (figura 2b); estágio difuso médio (figura 2c) e estágio difuso final (diplóteno – diacinese) (figura 2d). O cromocentro heteropicnótico apresentou-se único (figura 2b) ou tripartido (figura 2c). Na metáfase I, os 10 pares de autossomos e o par de cromossomos sexuais foram observados em organização frontal (figura 3a - c) ou lateral (figura 3d). As metáfases frontais apresentaram os heterocromossomos algumas vezes no centro do anel dos cromossomos autossômicos (figura 3a, c). Os heterocromossomos apresentaram-se individualizados na maior parte das metáfases observadas (figura 3a - d). Durante as fases de diferenciação de espermatídes a espermatozóides (figura 4a - c) foi observado um corpúsculo heteropicnótico nas espermatídes iniciais (redondas) (figura 4a) e em alongamento (figura 4b). Nos espermatozóides foi constatado um filamento denso ao longo da peça intermediária e do flagelo (figura 4c).

4.1.2- Impregnação por íons prata

A impregnação argêntica foi constatada na região do cromocentro do núcleo poliplóide (figura 5a) e nos nucléolos dos núcleos nas diferentes fases do estágio difuso (figura 5b, c, d), associados às regiões cromossômicas organizadoras dessa organela (Regiões Organizadoras Nucleolares – RONS). Nas metáfases não foi possível identificar as RONS nos cromossomos. No entanto, alguns corpúsculos nucleolares foram destacados dispersos ao redor das metáfases (figura 5e, f). Ao longo do processo de diferenciação das espermatídes foi verificado um corpúsculo fortemente impregnado pelos íons prata, tanto na fase inicial (espermátide redonda) (figura 6a, b), como na fase de alongamento (figura 6c).

4.1.3- Bandamento – C

Os núcleos poliplóides da parede do túbulo seminífero de *Triatoma maculata* apresentaram o cromocentro heterocromático (figura 7a, b). Nos núcleos do estágio difuso foi verificado um bloco heterocromático mais destacado e diversas regiões cromossômicas autossômicas também apresentaram-se heterocromáticas (banda - C⁺) (figura 7c, d). Nas metáfases I (figura 8a – d) apenas um dos sexuais (Y) apresentou banda – C⁺, e os demais cromossomos mostraram coloração homogênea.

As espermátides na fase precoce de diferenciação (espermátide redonda) apresentaram um corpúsculo heterocromático C⁺ (figura 9a, b) e na fase de alongamento verificou-se uma marcação heterocromática (figura 9c, d).

4.1.4- Variante da técnica de CEC

Os núcleos poliplóides das células dos túbulos seminíferos tiveram a região nucleolar destacada metacromaticamente (azul), sendo que o restante da cromatina apresentou a coloração esverdeada (figura 10a, b). No estágio difuso inicial (figura 10c), os nucléolos (metacromáticos) também foram destacados do material cromossômico (esverdeado).

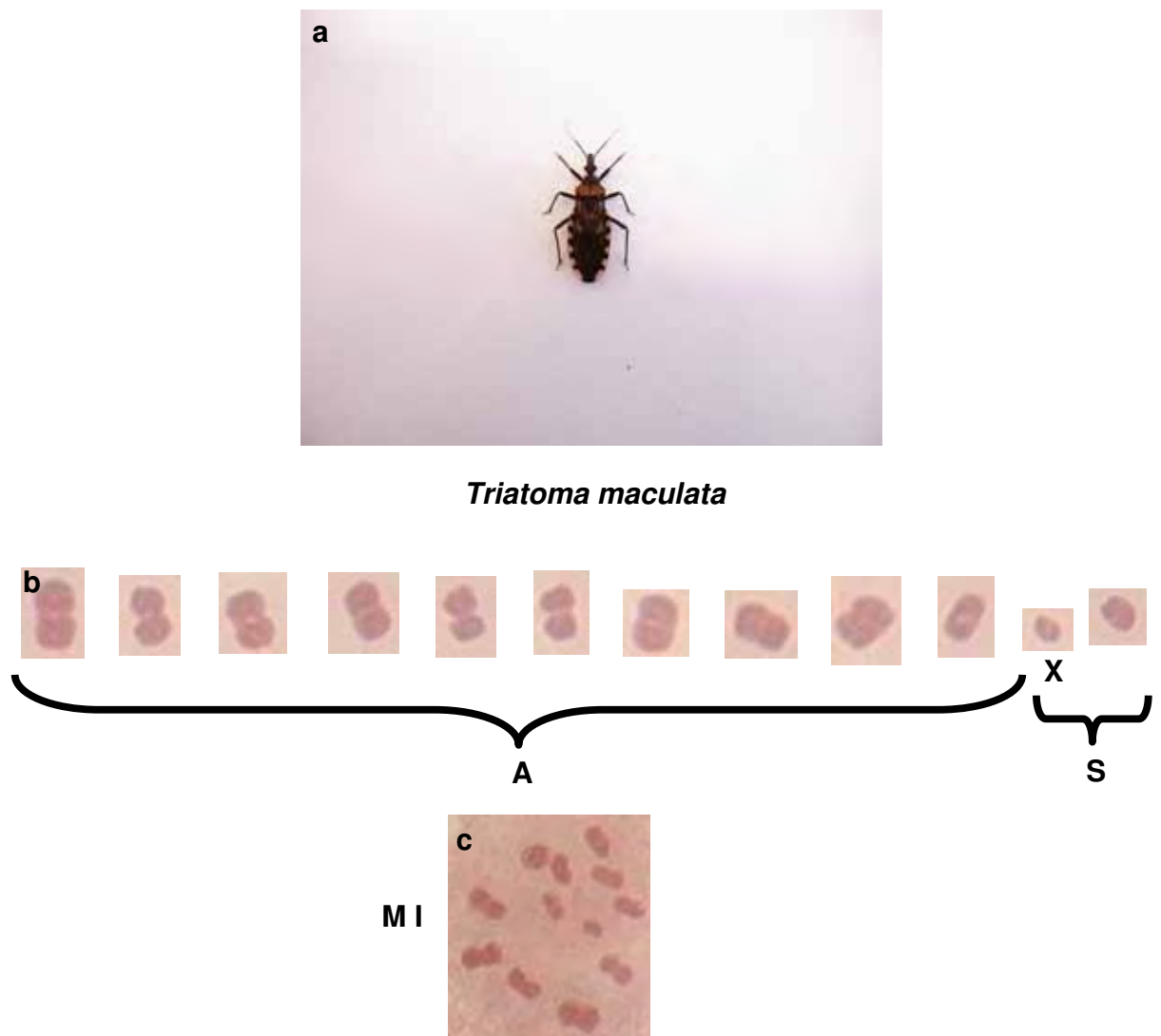


Figura 1. *Triatoma maculata*: (a) Macho adulto. (b) Cariograma baseado em metáfase I (A: autossomos; S: sexuais); (c) metáfase I. Aumentos: (b) 1554X; (c) 1344X.

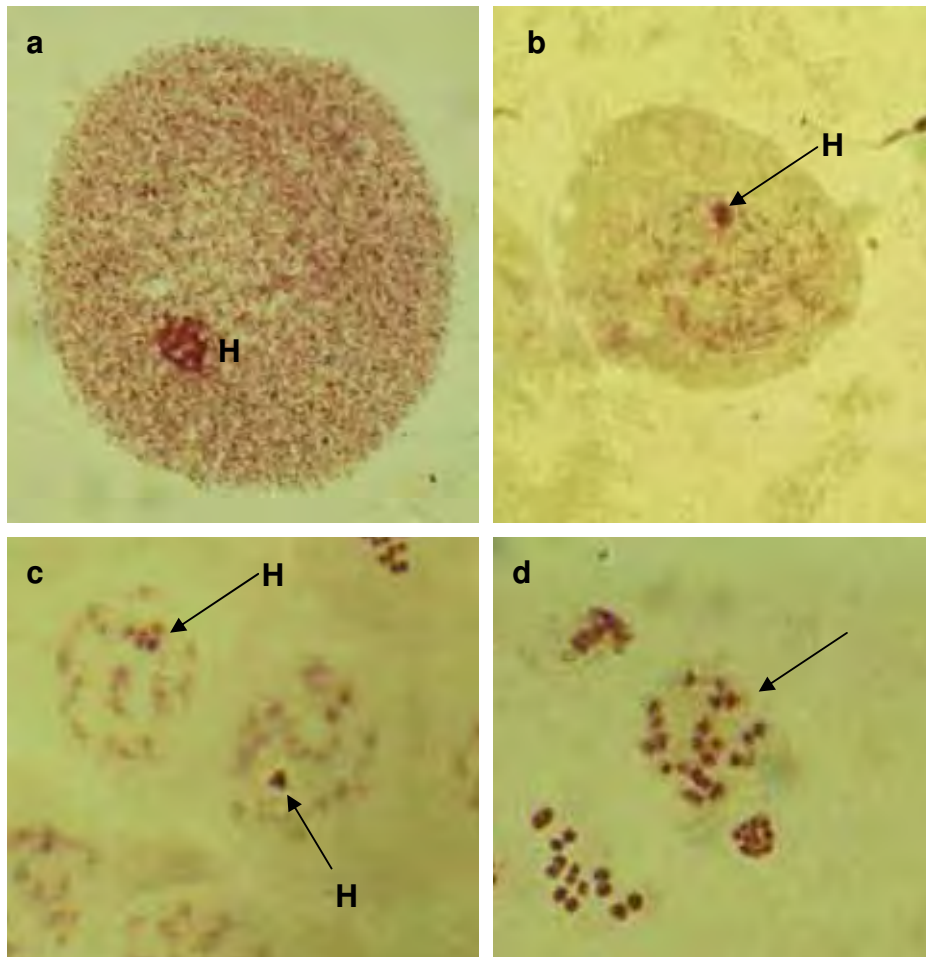


Figura 2. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a) Núcleo poliplóide. (b) Estágio difuso inicial. (c) Estágio difuso médio. (d) Estágio difuso final (diplóteno - diacinese) (seta). H: cromocentro heteropicnótico. Aumento: 1344X.

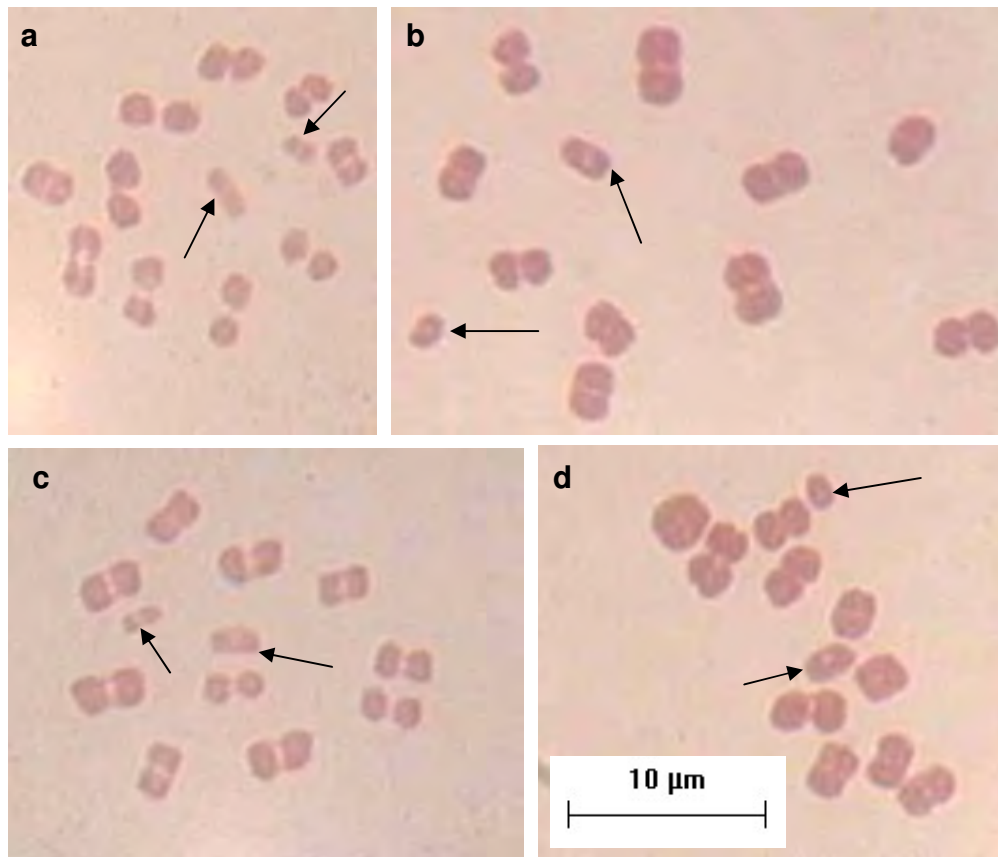


Figura 3. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a, b, c, d) Metáfase I. (setas: cromossomos sexuais).

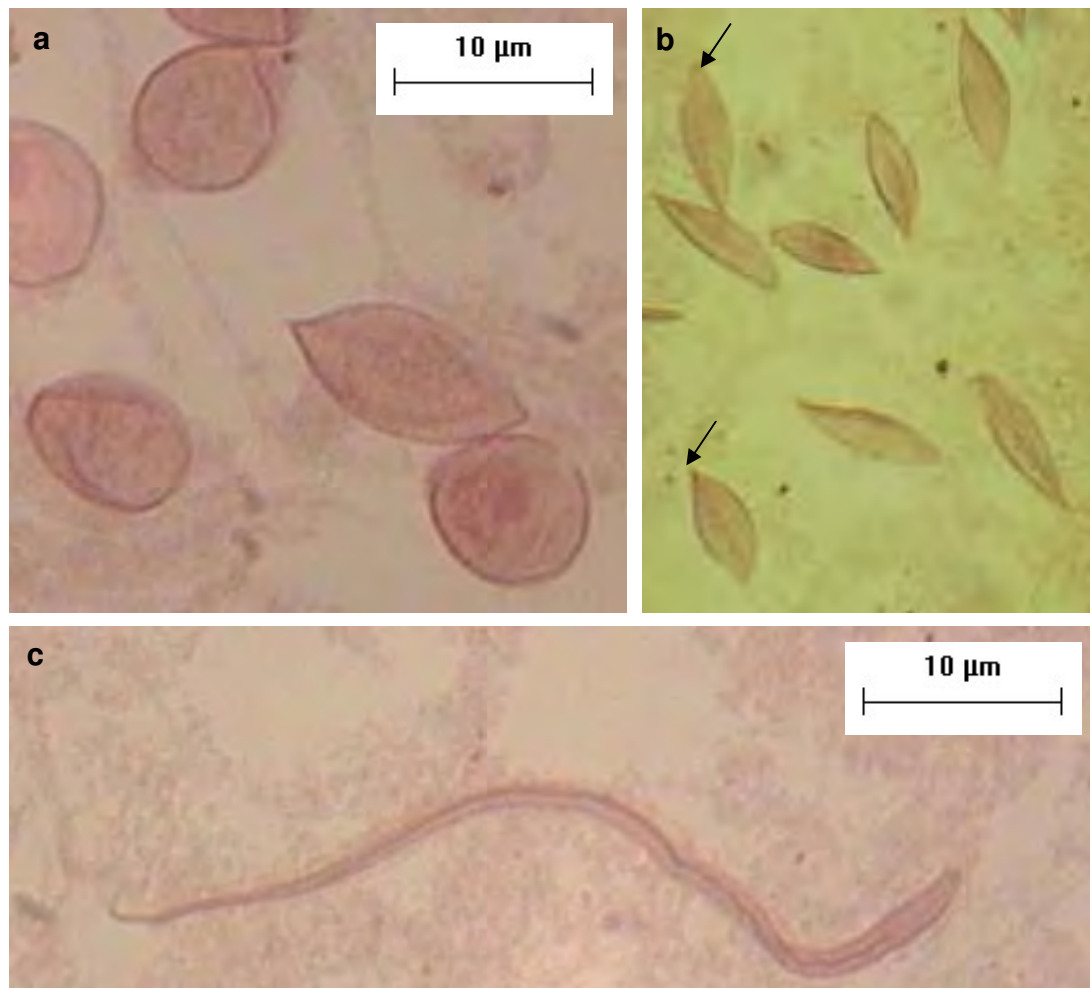


Figura 4. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a, b, c). Fases da espermiogênese. (a): Espermátides iniciais redondas; (b): Espermátides em fase de alongamento; (c): Espermatozóide. (setas: Corpúsculos heterocromáticos). Aumentos: (a, c): Barra = 10µm; (b): 1344X.

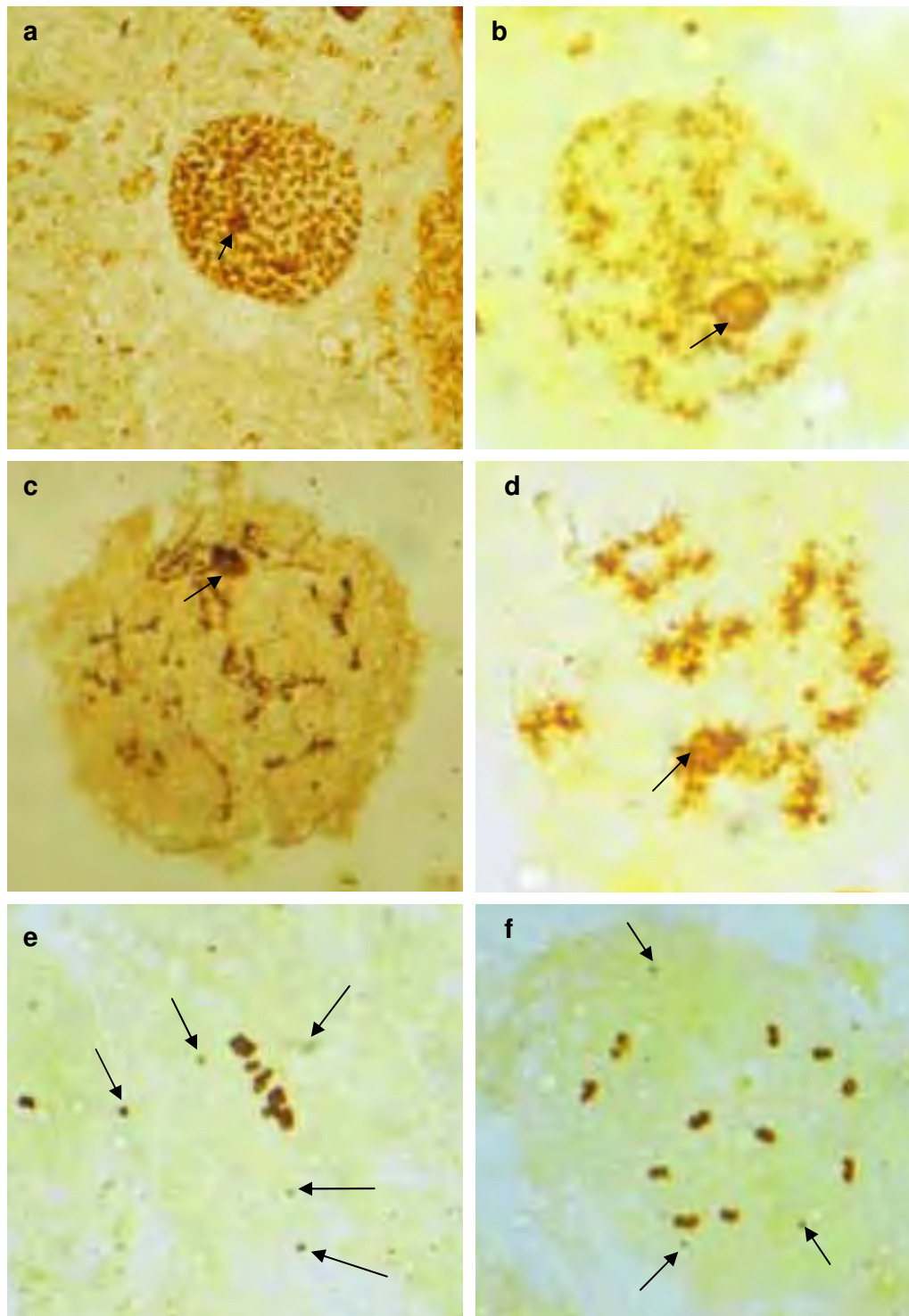


Figura 5. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a) Núcleo poliplóide. (b) Estágio difuso inicial. (c) Estágio difuso médio. (d) Estágio difuso final. (e) Metáfase I lateral. (f) Metáfase I frontal. Observar os corpúsculos nucleolares (setas). Aumentos: (a): 1344X; (b - f): 1554X.

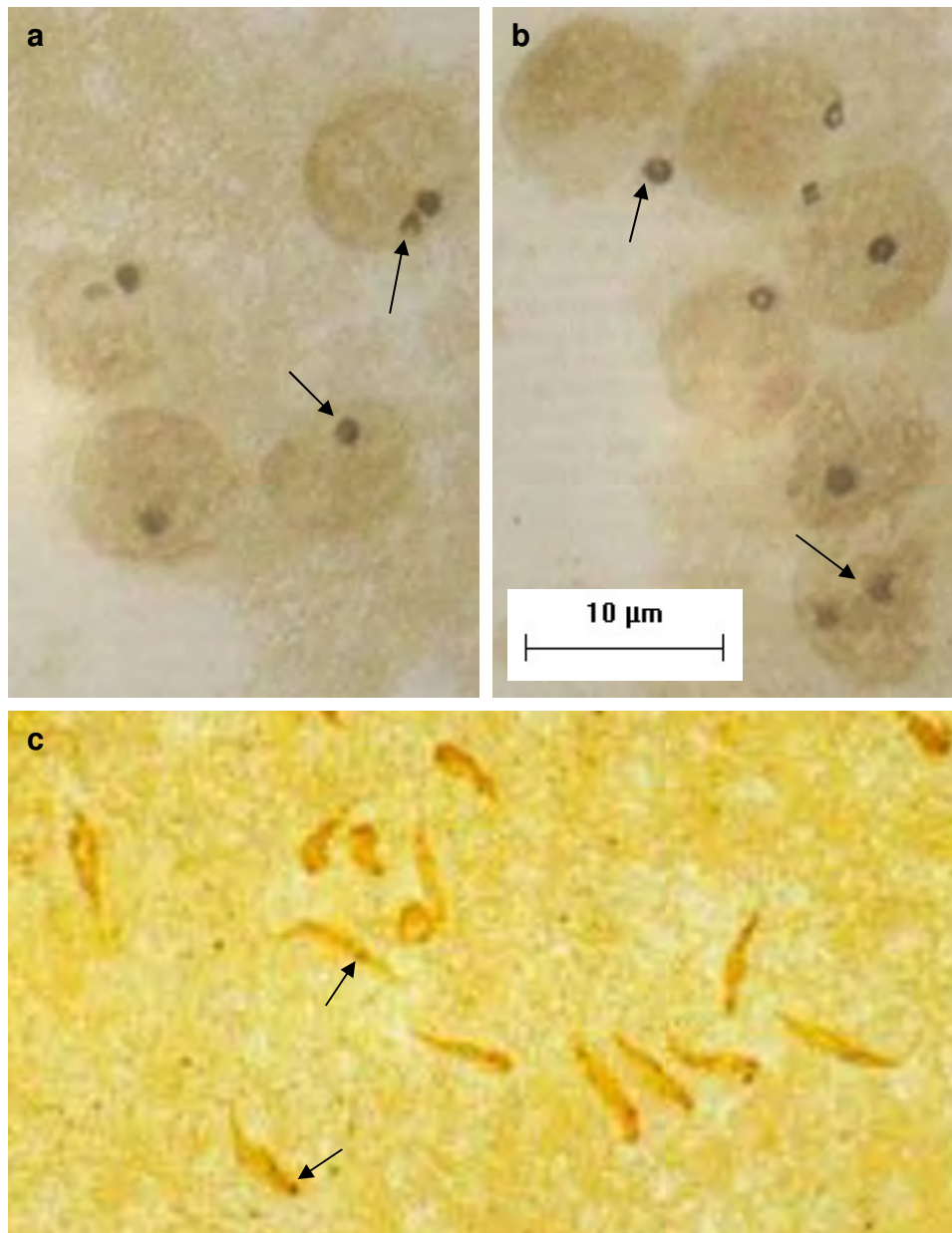


Figura 6. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a, b, c): Fases da espermiogênese. (a, b): Espermatídes redondas; (c): Espermatídes em fase de alongamento. Observar marcação nucleolar (setas). Aumentos: (a, b): Barra = 10µm; (c): 1554X.

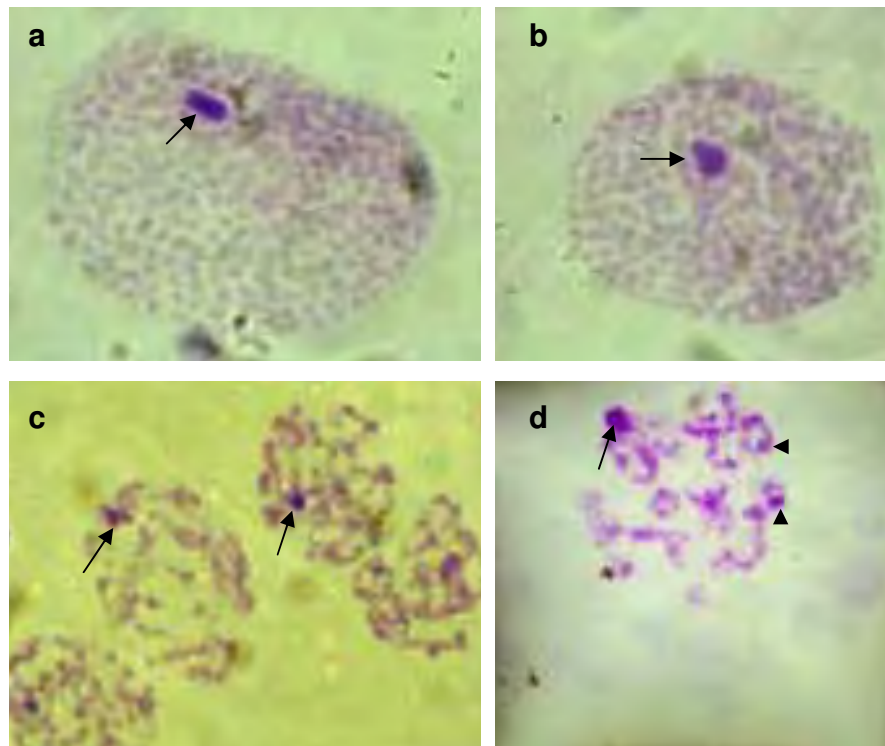


Figura 7. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de bandamento - C. (a, b) Núcleo poliplóide. (c, d) Estágio difuso. Cromocentro heterocromático (setas); regiões heterocromáticas (banda - C⁺) nos autossomos (cabeça de setas). Aumento: 1344X.

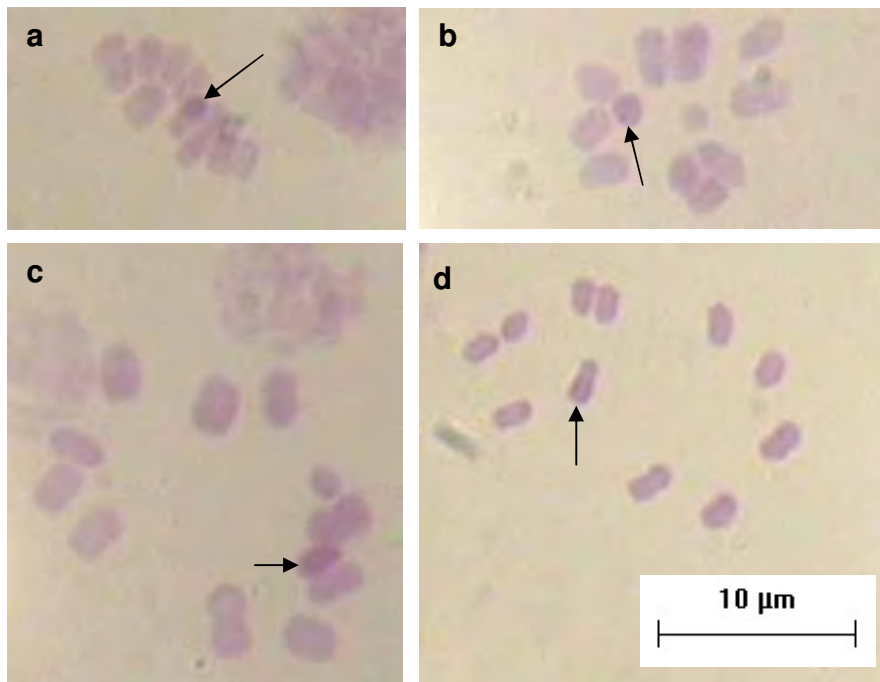


Figura 8. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de bandamento - C. (a, b, c, d) Metáfases I: (a) vista lateral; (b, c, d) Metáfase I: vista frontal. Cromossomo heterocromático (seta).

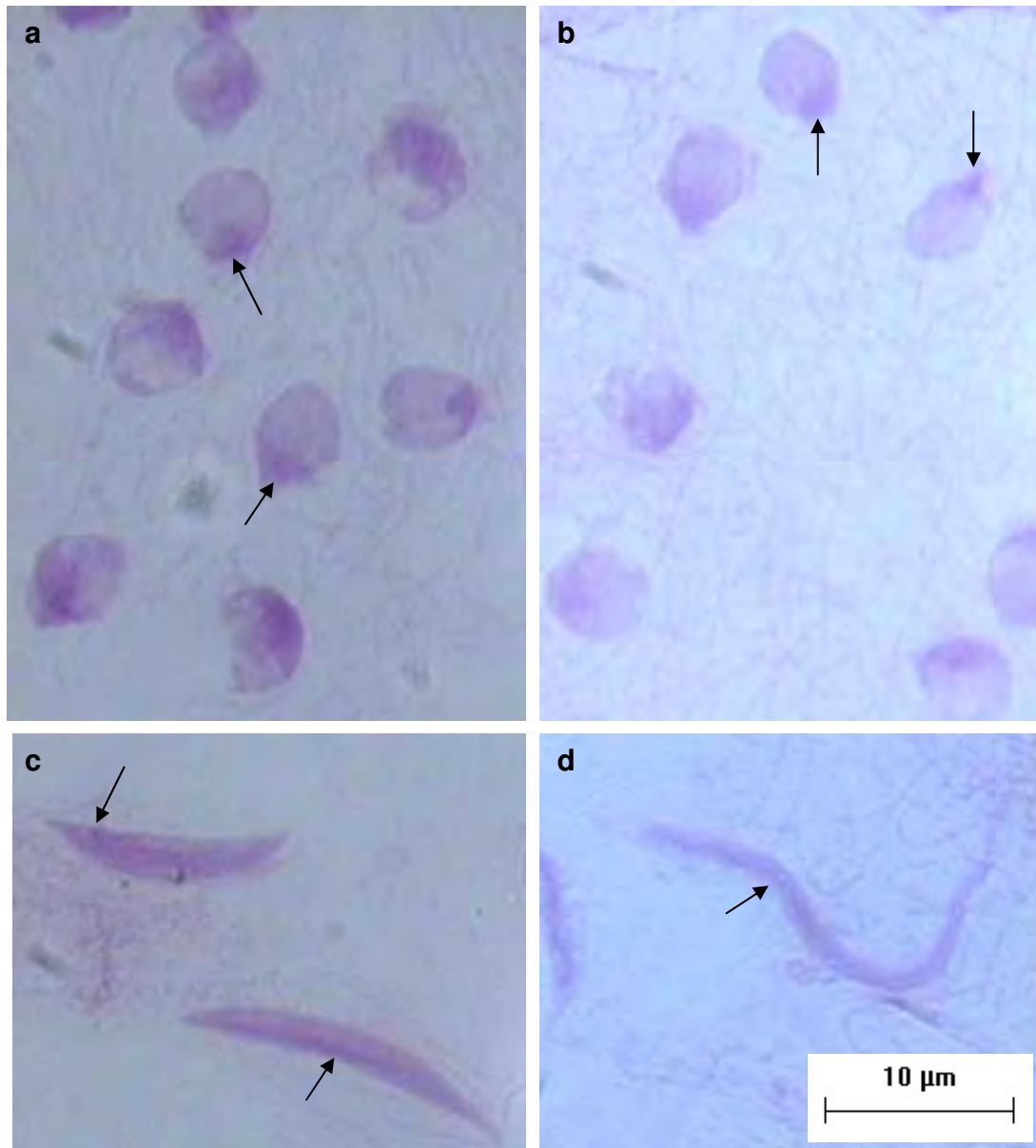


Figura 9. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de bandamento - C. (a, b, c, d) Fases da espermiogênese. (a, b) Espermátides iniciais (redondas); (c, d) Espermátides em fase de alongamento. Corpúsculos heterocromáticos (setas).

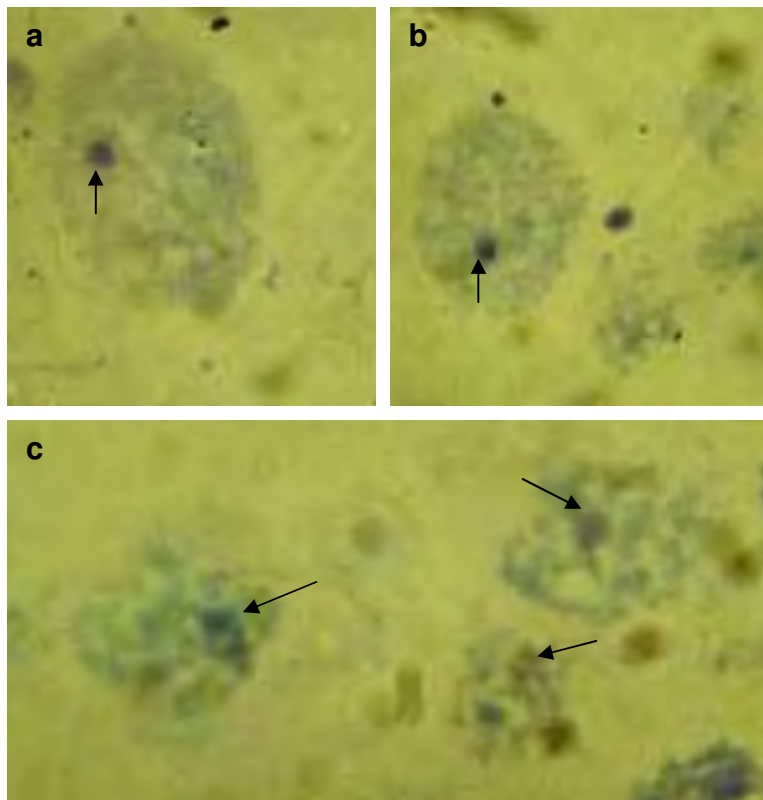


Figura 10. Túbulos seminíferos de *T. maculata* submetidos à técnica de Variante de CEC. (a, b) Núcleo poliplóide. (c) Prófase I: estágio difuso. Corpúsculos nucleolares metacromáticos (setas). Observar cromatina e cromossomos profásicos esverdeados. Aumento: 1344X.

4.2- *Triatoma pseudomaculata*

4.2.1- Orceína Lacto-Acética

O cariograma de *T. pseudomaculata* (figura 11a), baseado na metáfase I, apresentou 10 pares de cromossomos autossomos, sendo um deles de tamanho maior e um par de cromossomos sexuais (heterocromossomos - XY) (figura 11b, c). Os núcleos poliplóides da parede do túbulo seminífero apresentaram uma massa cromocêntrica heteropicnótica compacta (figura 12a). Na prófase I (estágio difuso) o cromocentro heteropicnótico algumas vezes permanecia associado em um único bloco, outras vezes bipartido (figura 12b, c). Na fase final do estágio difuso (diplóteno-diacinese) um dos heterocromossomos e um a três autossomos apresentam-se heteropicnóticos (figura 12d). Nas metáfases I os heterocromossomos apresentam-se individualizados, sendo o cromossomo Y maior que o X (figura 13a – d). As espermatídes iniciais (redondas) apresentaram um corpúsculo heteropicnótico (figura 14a). Nas espermatídes em fase de alongamento e nos espermatozóides foi constatado um filamento heteropicnótico (figura 14c, d).

4.2.2- Impregnação por íons prata

As células meióticas da prófase I (estágio difuso) submetidas à impregnação por íons prata tiveram os nucléolos nitidamente destacados (figura 15a – f). Nas diversas subfases desse estágio (inicial, médio, final) pode ser notado que os nucléolos estavam associados à cromatina ainda descondensada das regiões organizadoras nucleolares (RONs) (figura 15a, b, c, d). Nas fases precoces de condensação cromossômica (diplóteno-diacinese) os nucléolos estavam associados aos cromossomos (figura 15e, f). As metáfases I apresentaram tênues marcações cromossômicas, indicativas de regiões organizadoras nucleolares (RONs) (figura 16a – d). Nas espermatídes em diferentes fases de diferenciação foram observadas marcações nucleolares (células redondas) e impregnações argênticas (células em alongamento) (figura 17a - c).

4.2.3- Bandamento – C

As células dos túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidas à técnica de bandamento – C apresentaram, na prófase I (estágio difuso) um corpúsculo heterocromático diferenciado (figura 18a – c), em algumas regiões cromossômicas autossômicas foram observados poucos pontos heterocromáticos (Banda – C⁺). Nas metáfases I (figura 19a – h) em vista lateral (figura 19a – d) ou frontal (figura 19e – h), apenas um dos cromossomos sexuais (Y)

apresentou banda C⁺. Os demais cromossomos mostraram coloração homogênea. As espermátides iniciais (redondas) apresentaram um corpúsculo heterocromático (figura 20a). Nas espermátides em fase de alongamento não foi possível observar marcação heterocromática (figura 20b, c).

4.2.4- Variante da técnica de CEC

A técnica variante de CEC destacou metacromaticamente os nucléolos (azul) do restante dos cromossomos (coloração esverdeada) nas células do início da prófase I (estágio difuso) (figuras 21a - d).

No quadro I encontram-se resumidos os principais resultados oriundos da análise das lâminas dos túbulos seminíferos, submetidos a todas técnicas citoquímicas (orceína lacto – acética; impregnação por íons prata; bandamento – C; variante de CEC), das duas espécies (*T. maculata* e *T. pseudomaculata*) estudadas no presente trabalho.

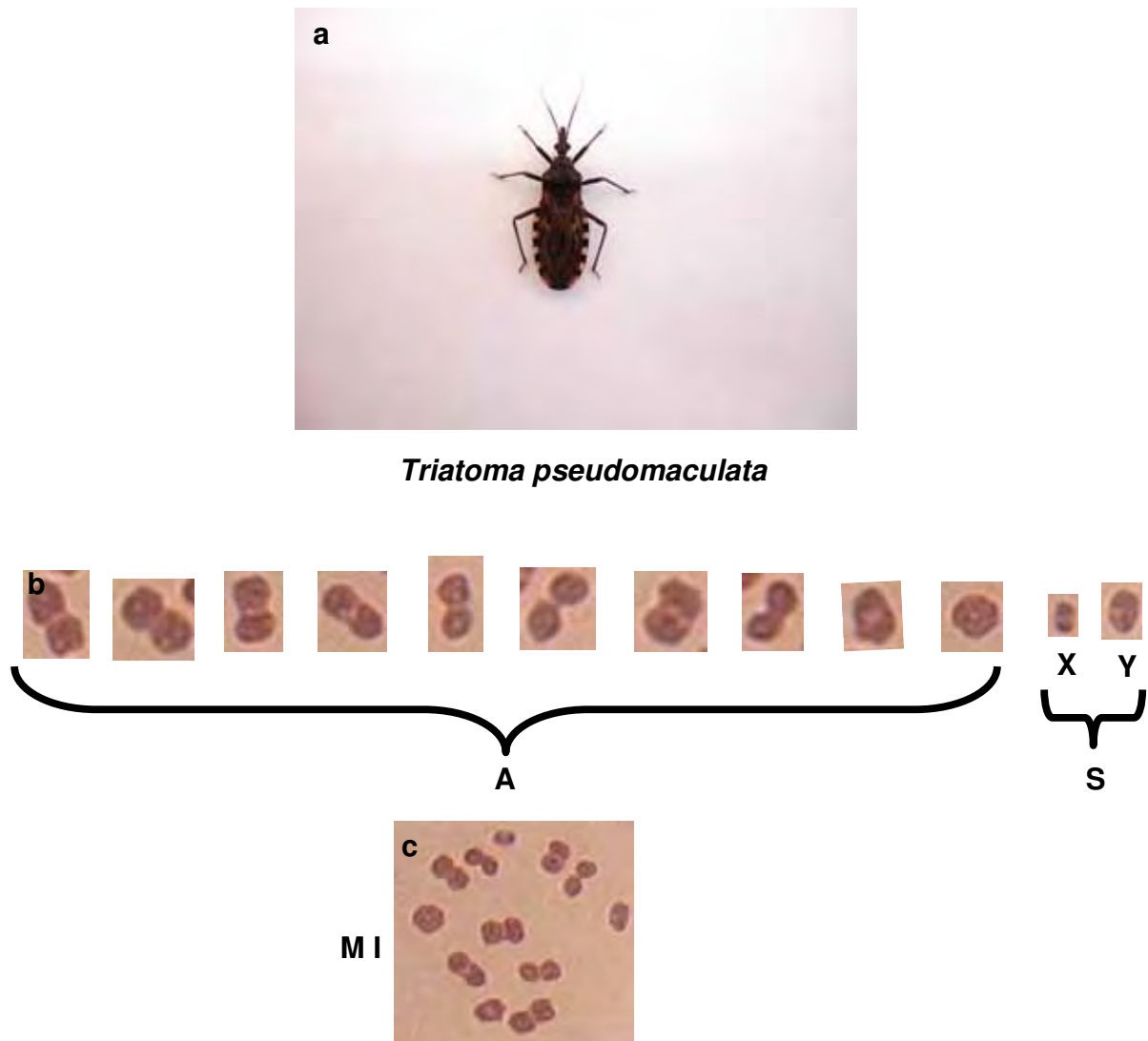


Figura 11. *T. pseudomaculata*: (a) Macho adulto. (b) Cariograma baseado em metáfase I (A: autossomos; S: sexuais); (c) metáfase I. Aumentos: (b) 1554X; (c) 1344X.

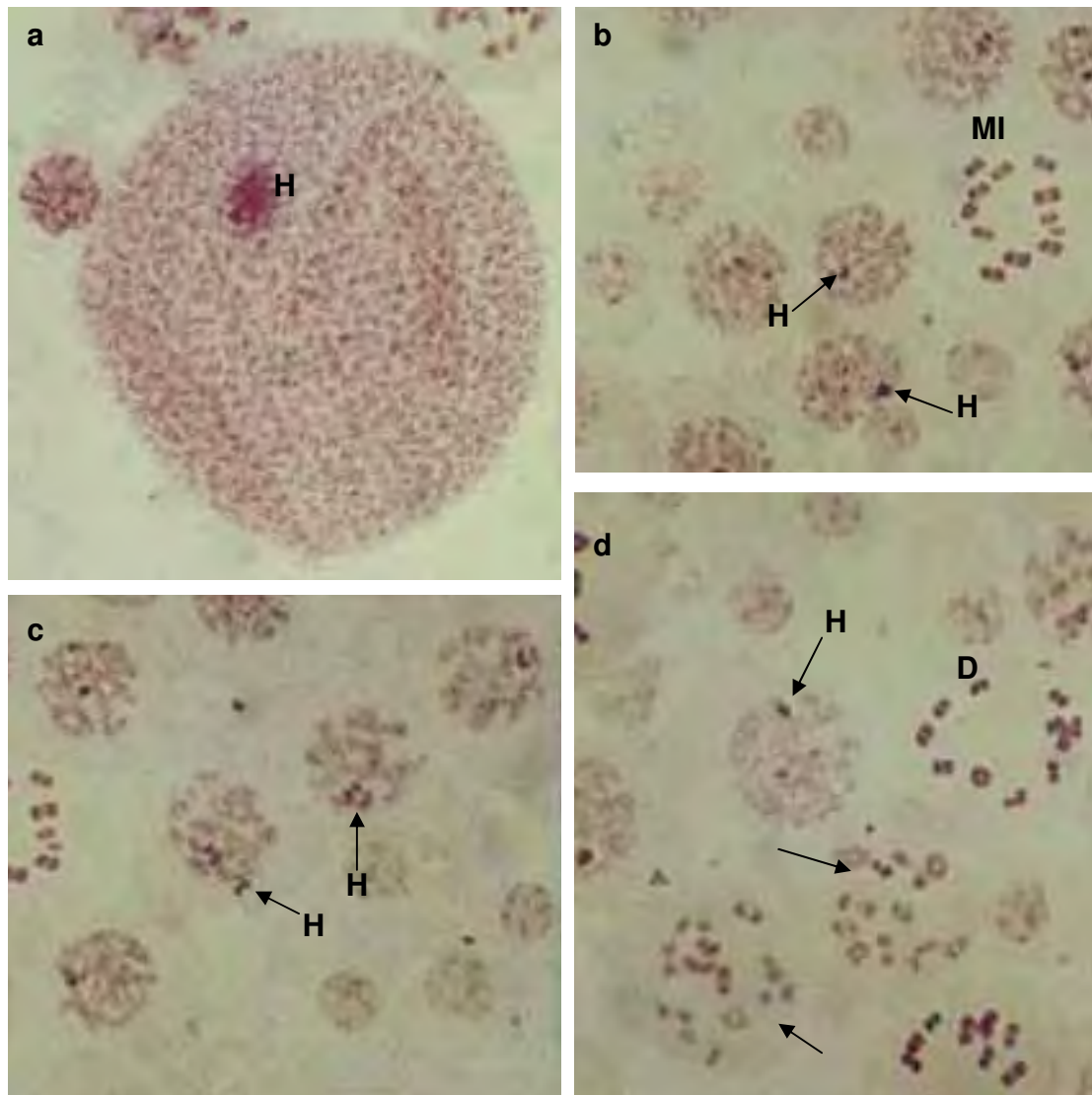


Figura 12. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a) Núcleo poliplóide. (b) Estágio difuso inicial (setas). (c) Estágio difuso médio (setas). (d) Estágio difuso final (diplóteno – diacinese) (setas). H: cromocentro heteroploidic; D: diacinese; MI: metáfase I. Aumento: 1344X.

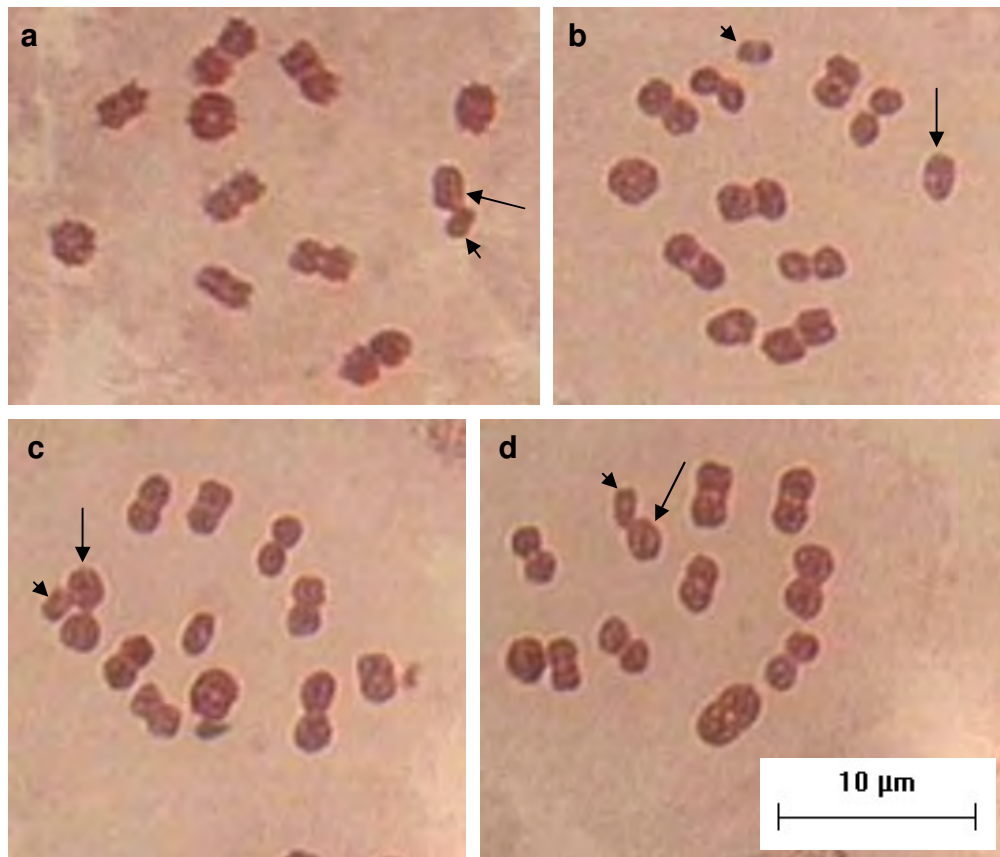


Figura 13. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a, b, c, d) Metáfase I. (seta: cromossomo Y; cabeça de seta: cromossomo X).

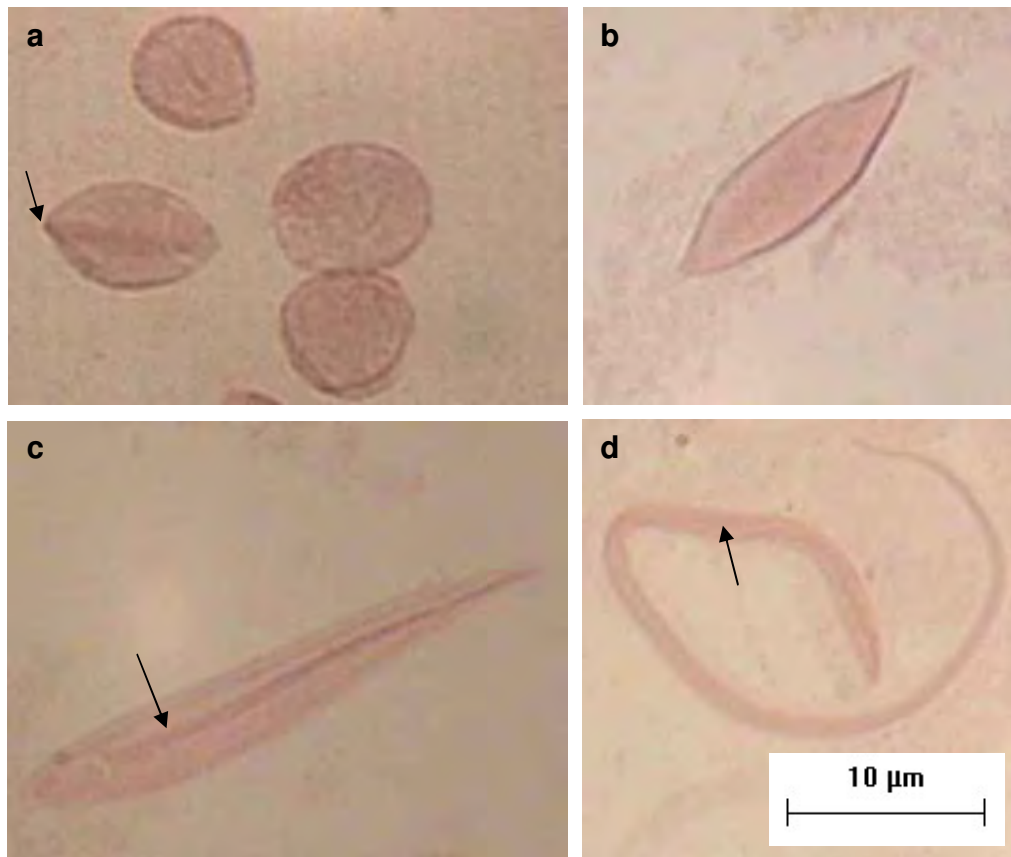


Figura 14. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. (a, b, c, d) Fases da espermiogênese. (a): Espermátide inicial; (b, c): Espermátides em fase de alongamento. (d): Espermatozóide.

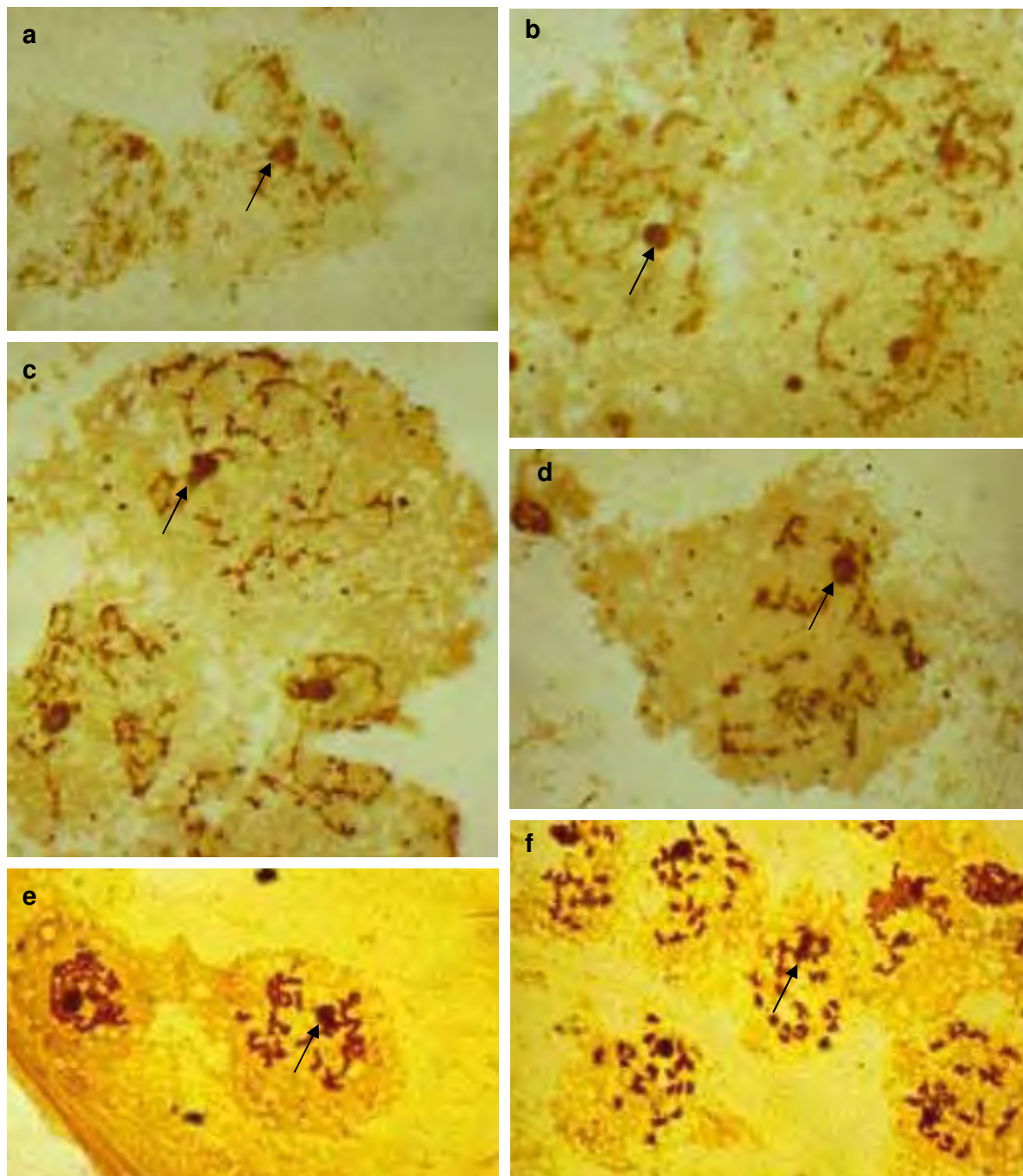


Figura 15. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-f) Prófase I: estágio difuso. (a, b, c): inicial; (d,e): médio; (f): final. Nucléolo (setas). Notar corpúsculos nucleolares dispersos no citoplasma (b, c, d). Aumento: 1554x.

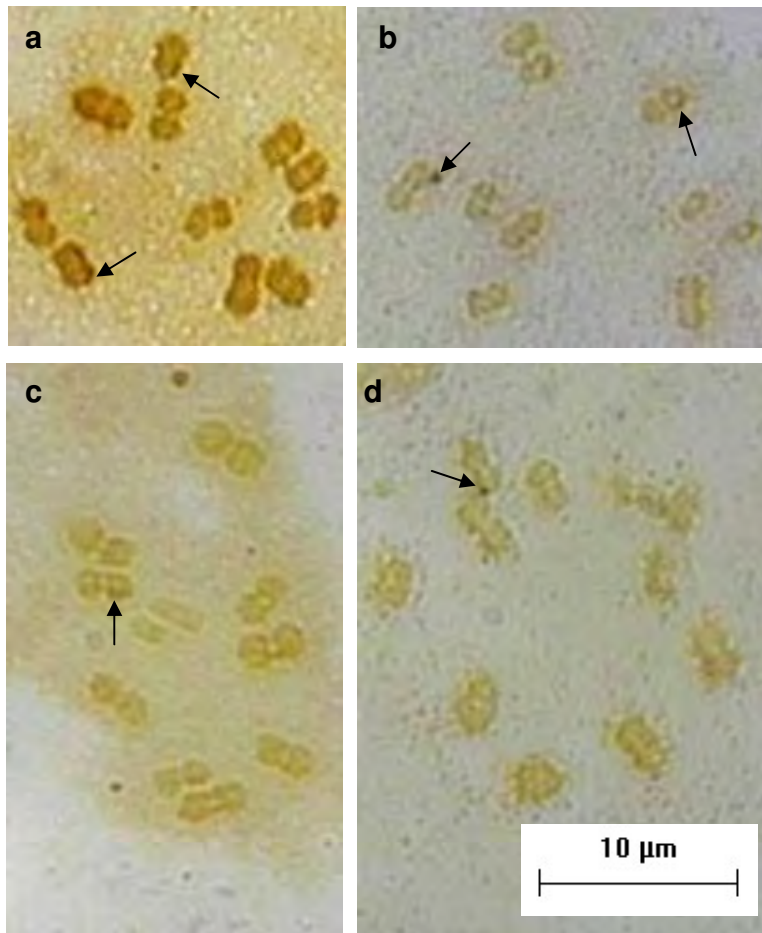


Figura 16. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a - d) Metáfases I. As setas indicam regiões cromossômicas impregnadas pelos íons prata (RONs).

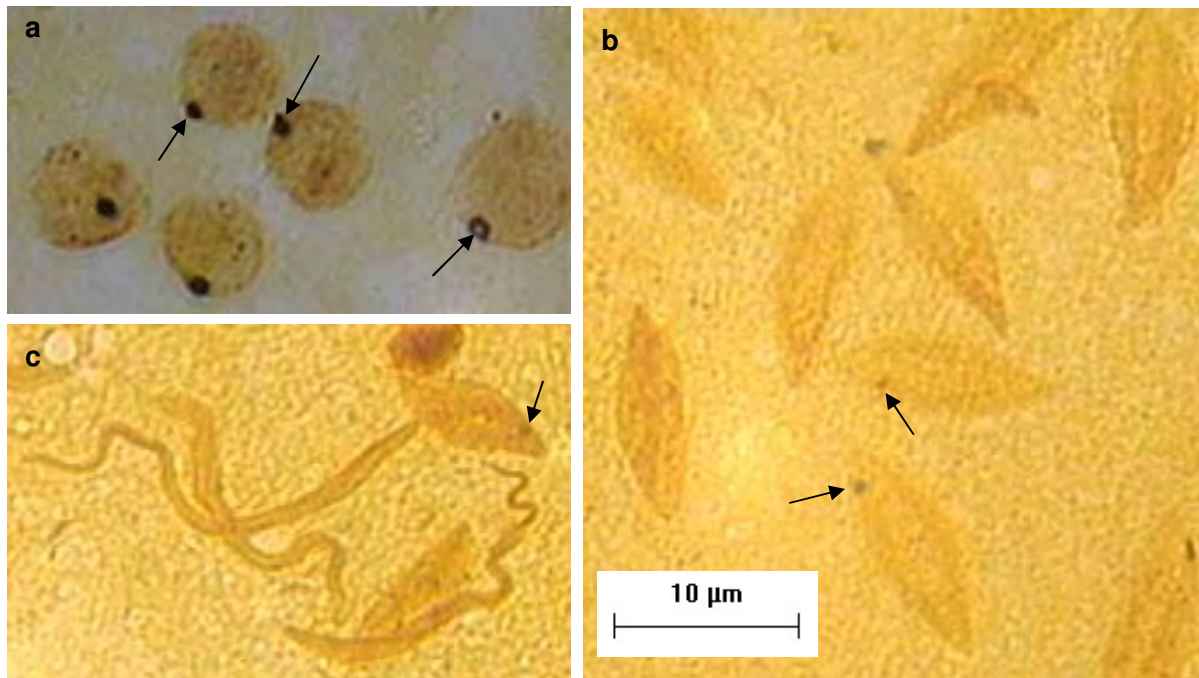


Figura 17. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de impregnação por íons prata. (a-c) Fases da espermiogênese. (a): Espermatíde inicial; (b): Espermatíde em fase de alongamento; (c): Espermatíde em fase final de diferenciação. Observar marcação nucleolar (setas).

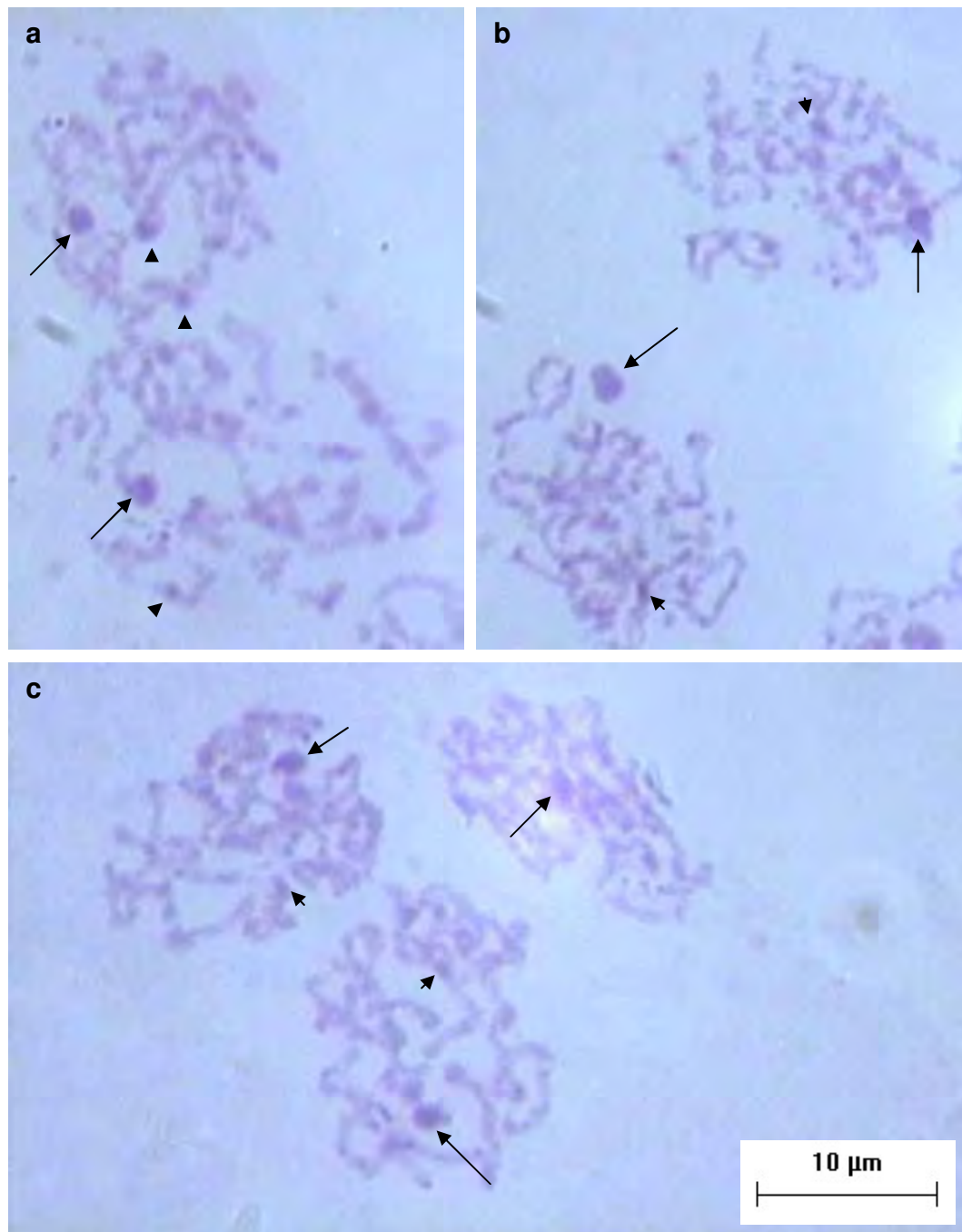


Figura 18. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de bandamento – C. (a, b, c) Prófase I: estágio difuso. Corpúsculos heterocromáticos (setas); regiões heterocromáticas (banda – C⁺) nos autossomos (cabeça de setas).

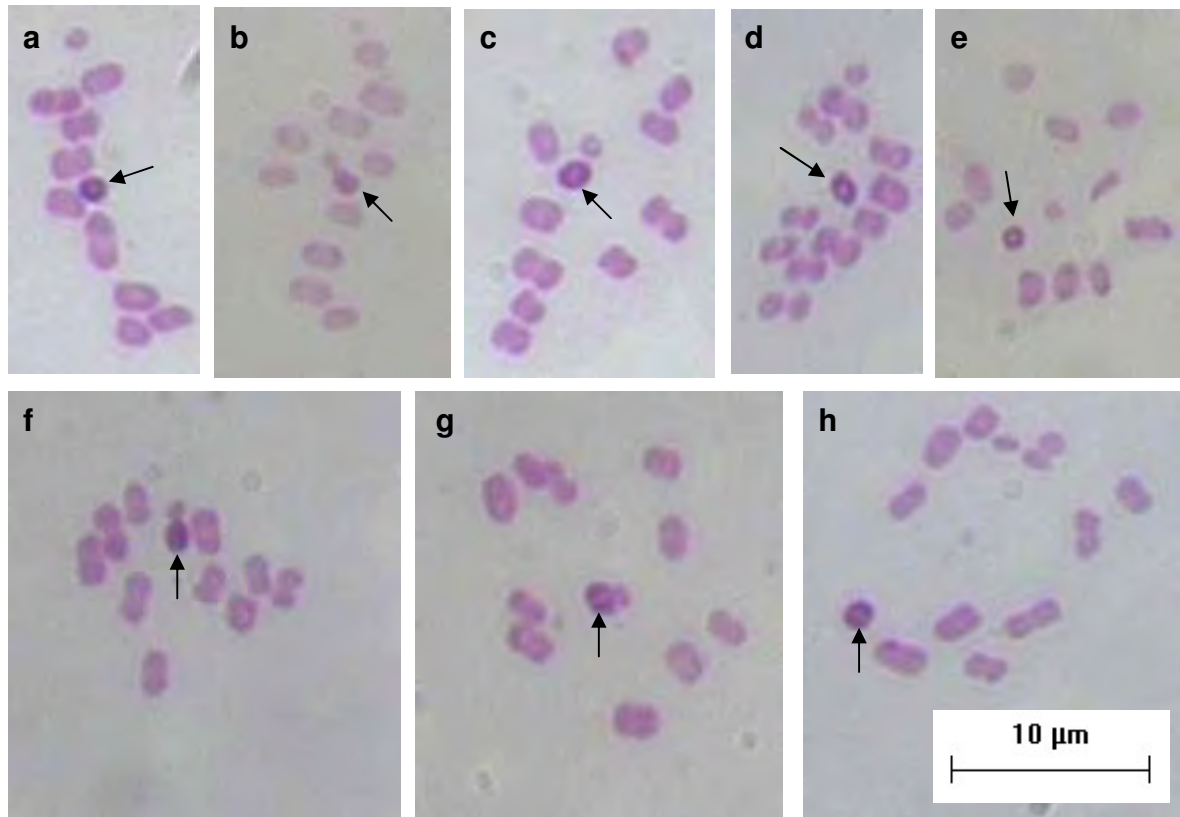


Figura 19. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de bandamento – C. (a - h) Metáfases I (lateral: a-d; frontal: e-h). As setas indicam o cromossomo Y heterocromático (banda C⁺).

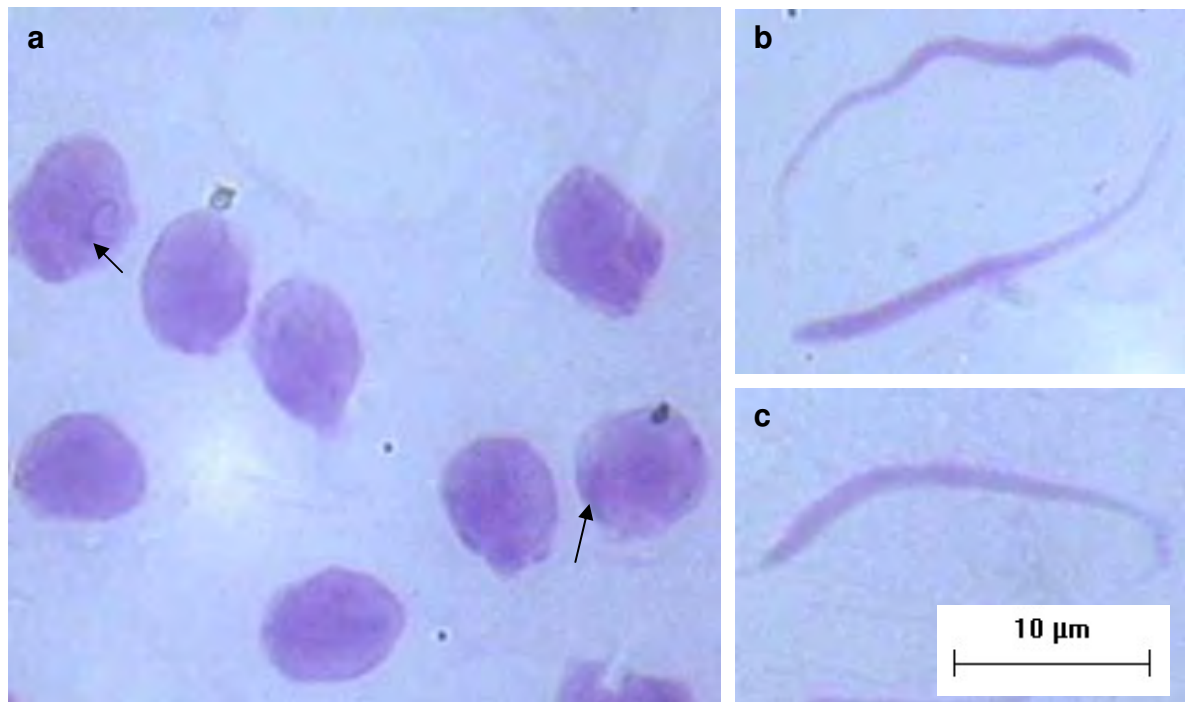


Figura 20. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de bandamento - C. (a, b, c) Fases da espermiogênese. (a): Espermatídes iniciais (redondas); (b, c): Espermatídes em fase de alongamento. Corpúsculos heterocromáticos (setas).

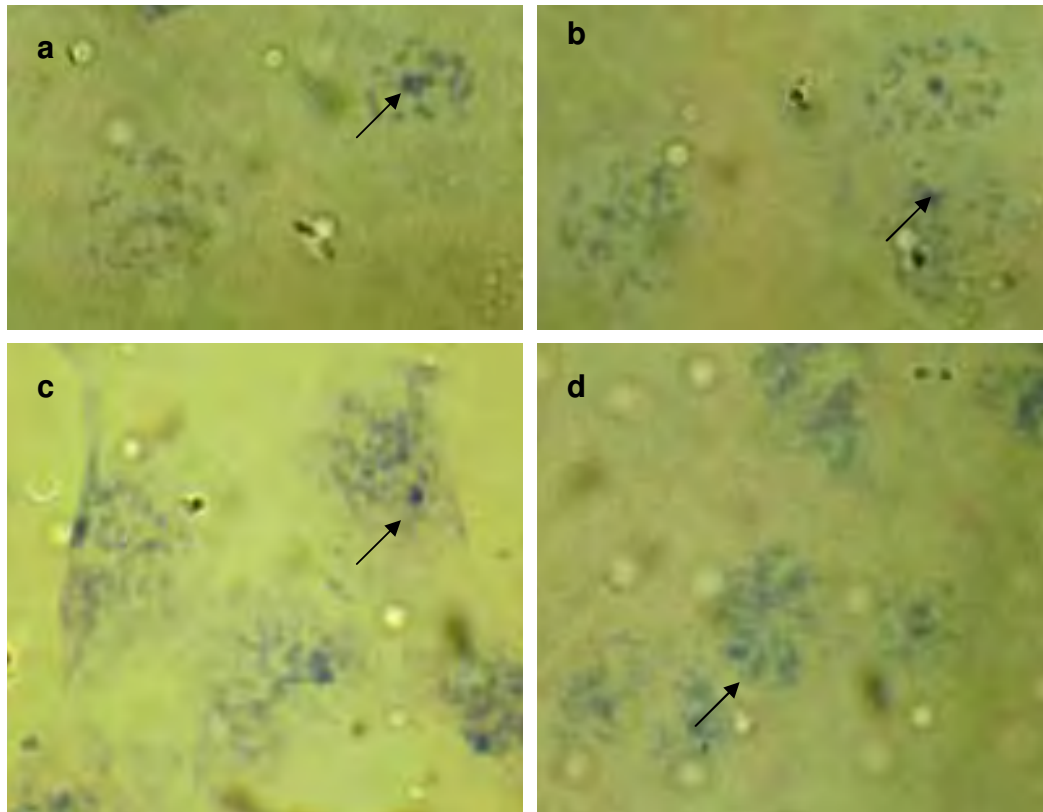


Figura 21. Túbulos seminíferos de *T. pseudomaculata* submetidos à técnica de Variante de CEC. (a-d) Prófase I: estágio difuso. Corpúsculos nucleolares metacromáticos (setas). Observar cromossomos profásicos esverdeados. Aumento: 1344X.

Quadro I - Resumo de algumas características da espermatogênese de *Triatoma maculata* e *Triatoma pseudomaculata*, com base na análise parcial dos túbulos seminíferos submetidos às técnicas: orceína lacto – acética; impregnação por íons prata; bandamento – C e variante de CEC.

	<i>T. maculata/T.pseudomaculata</i>
Núcleos poliplóides	- Presença de um único cromocentro associado ao nucléolo
Prófase I (estágio difuso) (inicial)	- Presença de um bloco heteropicnótico único, bi ou tripartido
Prófase I (estágio difuso) (médio)	- Presença de nucléolo associado aos cromossomos heterocromáticos (sexuais) que formam um bloco
Prófase I (diplóteno/diacinese)	- Bloco dos cromossomos sexuais: heterocromático e impregnado por íons prata
Metáfase I	<ul style="list-style-type: none"> - 10 autossomos com pequenas regiões heterocromáticas. A espécie <i>T. maculata</i> apresenta um maior número de regiões heterocromáticas - 1 par de cromossomos sexuais (XY). Apenas o cromossomo Y é heterocromático - Não há ordenação na disposição dos cromossomos: os sexuais aparecem periféricos ou centrais - Tamanho dos cromossomos: autossomos maiores que os sexuais, sendo que apenas um par de autossomos é maior que os demais. O cromossomo sexual Y (heterocromático – banda – C⁺) é maior que o X (banda – C⁻) - Fragmentação nucleolar
Espermio gênese	<ul style="list-style-type: none"> - Presença de um corpúsculo nucleolar nas fases iniciais da espermatogênese (central ou periférica) - Presença de material nucleolar na fase de alongamento das espermátides - Presença de um corpúsculo heterocromático nas espermátides (redondas e em alongamento) - Presença de um filamento denso nos espermatozóides (peça intermediária e flagelo)

5- Discussão

A análise geral dos resultados obtidos sobre o estudo da espermatogênese em duas espécies de insetos hematófagos do gênero *Triatoma* (*T. maculata* e *T. pseudomaculata*), com base nas técnicas deorceína lacto - acética, impregnação por íons prata, bandamento – C e variante de CEC, permitiu-nos levantar alguns aspectos relevantes:

5.1- Mecanismos da meiose em triatomíneos

Após análise da clássica coloração com orceína lacto-acética podem ser corroborados alguns aspectos interessantes sobre o comportamento cromossômico nesses insetos. Os cromossomos das duas espécies estudadas comportam-se como holocêntricos, pois não mostraram constrição primária e, nem tampouco, a tradicional figura na forma de “V” durante a metáfase meiótica assemelhando-se à pequenas estruturas arredondadas. Os cromossomos nas metáfases I dispõem-se aleatoriamente na placa metafásica. Às vezes pode ser notado que os autossomos permaneciam na periferia da placa metafásica e os sexuais apresentavam-se no centro.

As duas espécies analisadas (*T. maculata* e *T. pseudomaculata*) mostraram a presença de núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular exibindo um cromocentro heteropicnótico que respondeu positivamente à técnica de bandamento – C. Tais núcleos parecem refletir a alta taxa metabólica necessária para a manutenção das células em divisão (De Vaio et al., 1985; Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira, 2003).

Os cromossomos de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* comportam-se como o dos demais Heteroptera (Ueshima, 1966). Os cromossomos sexuais formam um corpúsculo que pode ser bipartido (*T. pseudomaculata*) ou tripartido (*T. maculata*) caracterizando os núcleos em estágio difuso. Durante a segunda divisão meiótica, embora não representado nas fotomicrografias deste presente trabalho, os autossomos dispõem-se radialmente na periferia da placa metafásica e os sexuais no centro do anel. Essa disposição corrobora os dados citogenéticos da espécie *T. pseudomaculata* discutidos por Perez e colaboradores (1992).

A análise convencional pela técnica de coloração com orceína lacto-acética permitiu identificar os cariótipos 20 + XY (10 bivalentes autossômicos e um par de cromossomos sexuais XY) de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, confirmando os dados citogenéticos da literatura (Azeredo-Oliveira, 1990; Pérez et al., 1992; Carcavallo et al., 1999).

Esses cariótipos são equivalentes ao número modal dos cromossomos para a subfamília Triatominae (Ueshima, 1966).

5.2- Relação entre as regiões heterocromáticas e nucléolo

A constatação da íntima relação entre as regiões heterocromáticas e os nucléolos, nos núcleos interfásicos, e entre essas e as Regiões Organizadoras Nucleolares, nos cromossomos profásicos ficou bastante consistente, após a análise geral dos dados com as diferentes técnicas citoquímicas empregadas.

Os núcleos poliplóides das células nutritivas do túbulo seminífero e os núcleos em prófase I (estágio difuso) mostraram uma próxima relação entre os corpúsculos heterocromáticos - destacados pela orceína e bandamento - C, e a presença dos corpúsculos nucleolares marcados com nitrato de prata. Essa relação, entre heterocromatina e nucléolo, já foi observada em túbulos de Malpighi e glândulas salivares desses insetos (Azeredo-Oliveira & Mello 1986, 1997, 1998, Azeredo-Oliveira, 1990). Portanto, os dados obtidos do estudo das células testiculares neste trabalho, nas duas espécies estudadas, confirmam a relação funcional e estrutural que ocorre entre esses dois domínios nucleares.

Nas fases da prófase I (estágio difuso) da meiose, pode ser observada uma clara associação entre o bloco heteropicnótico dos cromossomos sexuais e a impregnação pelos íons prata. A presença de marcação pela prata, no bloco heterocromático foi muito evidente na prófase da primeira divisão meiótica, especificamente na “fase difusa”, no diplóteno e na diacinese. A natureza heterocromática dessas marcações foi confirmada pela técnica de Bandamento - C.

5.3- Diferenciação estrutural da heterocromatina nos cromossomos holocêntricos dos triatomíneos

O impacto das técnicas de bandamento, revelando uma diferenciação longitudinal dos cromossomos, foi expressivo para a maioria dos eucariotos. Todavia, enquanto os cromossomos de vertebrados superiores apresentam bandas G características ou bandas equivalentes (Q e R), padrões de bandamento semelhante não são obtidos em invertebrados e vertebrados inferiores. Para que se consiga banda G de qualidade é necessário que os cromossomos estejam livres de material citoplasmático circundante, o que é quase sempre inevitável, uma vez que, em se

tratando de insetos, os cromossomos são obtidos, geralmente, por esmagamento (Severi-Aguiar, 2001).

As pesquisas nesse grupo de animais, envolviam, até bem pouco tempo apenas a heterocromatina, que permanece condensada durante todo o ciclo celular, sendo visível até a telófase, ao contrário da eucromatina. O advento das técnicas de citogenética molecular começa a fornecer informações sobre a constituição da cromatina dos invertebrados e, portanto, os dados da literatura são ainda incipientes, apresentando demonstrações em maior número, em peixes e outros vertebrados (Severi-Aguiar, 2001).

Os resultados do presente estudo, que aplicou a técnica de bandamento – C aos cromossomos de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, corroboram evidências de que os cromossomos de Heteroptera apresentam pequenas quantidades de heterocromatina constitutiva, localizadas, preferencialmente, no caso dessas espécies, no cromossomo sexual Y e nas extremidades dos cromossomos autossomos (Camacho et al., 1985; Santos et al., 2007).

O bandamento – C pode ser usado para estudo da evolução cromossômica de várias formas, como por exemplo, a diferenciação entre espécies relacionadas. Diferenças em quantidade, posição e tipo de heterocromatina são extremamente comuns. Espécies relacionadas podem diferir, não somente na quantidade de heterocromatina de seu genoma, mas, também, no número de bandas, na localização e em suas propriedades de coloração (Summer, 1990; Warchalowska-Sliwa et al., 1994). O padrão heterocromático em triatomíneos de duas espécies do gênero *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreri*), analisado na espermatogênese por bandamento – C, indicou que ambas as espécies revelaram bandas intersticiais e terminais nos autossomos. As bandas terminais corroboraram a hipótese que nos cromossomos holocêntricos a heterocromatina é preferencialmente localizada no telômero. Os cromossomos sexuais (X, Y) em *P. herreri* foram totalmente heterocromáticos e em *P. megistus* somente o cromossomo Y apresentou-se heterocromático, sendo que o X em alguns núcleos era banda C⁺ e em outros banda C⁻ (Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999c).

No presente trabalho a análise citogenética possibilitou a verificação de uma distribuição da heterocromatina semelhante nas duas espécies estudadas, apenas em relação aos cromossomos sexuais. No entanto, a espécie *T. maculata* apresentou, em relação aos cromossomos autossomos, uma maior quantidade de regiões heterocromáticas (Banda C⁺) do que a espécie *T. pseudomaculata*. Essa mesma característica heterocromática foi verificada, recentemente, por

Santos e colaboradores (2007), que também realizaram outras comparações enzimáticas e morfométricas. Os resultados obtidos por esses pesquisadores indicaram que as diferenças genéticas reveladas entre essas espécies fornecem suporte para uma divergência evolutiva. No presente estudo as semelhanças e divergências da distribuição e quantidade das regiões heterocromáticas corroboram as diferenças citogenéticas entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*.

5.4- Atividade nucleolar na meiose dos triatomíneos

Os túbulos seminíferos das duas espécies de hematófagos do gênero *Triatoma*, submetidos à impregnação por íons prata e à técnica de variante de CEC revelaram o nucléolo das células nas diversas subfases do estágio difuso, como um bloco coeso, ligado à algumas regiões específicas dos cromossomos.

Nos cromossomos metafásicos não houve marcações específicas indicativas de regiões organizadoras nucleolares (RONs), no entanto, pode ser observada a fragmentação do nucléolo, representada por pequenos pontos argênticos destacados ao redor dos cromossomos, tanto nas placas laterais como nas frontais.

Durante as fases de diferenciação das espermatídes (iniciais e de alongamento) foi constatada a presença de um pequeno corpúsculo impregnado por íons prata.

Sabe-se que os íons prata ligam-se a um grupo especial de proteínas ácidas existentes no nucléolo (C23 e B23). É conhecido que o nucléolo possui um ciclo de desagregação e reorganização, isto é, desagregação durante a prófase tardia e reorganização no início da telófase (Ashraf & Godward, 1980). No entanto, vários exemplos, em diferentes espécies animais e vegetais, mostram evidências de que o material fibrilar, principalmente, e algumas vezes, o granular, podem persistir durante todas as fases do ciclo celular, incluindo a metáfase e a anáfase. Essas evidências suportaram a possibilidade de que o material nucleolar não seja totalmente originado na região cromossômica do organizador nucleolar, mas um material pré-existente seja também necessário e utilizado (Ashraf & Godwar, 1988).

Os resultados observados nesse trabalho, somente pela impregnação por prata, estão de acordo com a persistência nucleolar no ciclo celular meiótico, pois os corpúsculos pré-nucleolares podem ser observados em vários estágios durante a divisão celular. Esses corpúsculos pré-nucleolares permanecem na célula, após a prófase, durante o ciclo, até a telófase. Os mesmos aspectos foram verificados na espermatogênese de outros triatomíneos do gênero *Triatoma*

(Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997b; Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira, 2005a; Severi-Aguiar et al., 2006) *Panstrongylus* (Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999b) e *Rhodnius* (Morielle & Azeredo-Oliveira, 2004; 2007a, b).

Por outro lado, outros resultados obtidos sobre a espermatogênese desses insetos, com base em bandamento fluorescente e hibridações *in situ* fluorescentes (FISH), não detectaram a presença desses corpúsculos durante as divisões celulares meióticas, nem nas espermátides. Tais corpúsculos foram, então, corados tanto pela orceína como pelos íons prata, mas não foram detectados por fluorocromos e por FISH (Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira, 2005a, b; Severi-Aguiar et al., 2006).

Portanto, a natureza citoquímica desses corpúsculos, detectados também na espermatogênese de *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, durante as fases da meiose até as fases iniciais das espermátides, sugere que os mesmos representem uma fonte de RNAs associados à proteínas específicas, constituindo complexos de ribonucleoproteínas (RNPs). Essa fonte de RNPs é muito importante nas fases iniciais da espermatogênese quando ocorre uma série sucessiva de eventos, nos quais as células haplóides sofrem transformações nucleares e condensação da cromatina, desenvolvendo estruturas especiais como o acrossomo e o flagelo (Parvinen et al., 1986). Durante esse padrão de diferenciação, a célula, momentaneamente, diminui a síntese de proteína (Mirre & Knibiehler, 1985). Os achados em triatomíneos, podem indicar que suprimentos de RNPs são necessários à síntese protéica da espermátide. Os pequenos pontos vistos nas espermátides desses insetos, tanto por meio da coloração pela orceína como pela impregnação pela prata, evidenciam a presença desses corpúsculos de RNPs, já que os mecanismos dessas técnicas, por acidofilia e por ligação dos íons prata, indicam que apenas as proteínas são marcadas.

Durante a espermatogênese de mamíferos e de outros vertebrados há evidências sobre a síntese celular de RNA e, simultaneamente, aparece uma organela característica – o “corpo cromatóide” – que apresenta típica forma lobulada. Estudos com radioatividade, derivada de uridina tritiada, e estudos imunohistoquímicos de alta resolução indicaram a presença de actina e RNA no “corpo cromatóide”. O “corpo cromatóide” tem várias funções durante a espermiogênese, por exemplo, relacionadas à formação do sistema acrossômico. A mais interessante das funções propostas para o “corpo cromatóide” é sua participação no metabolismo de RNA das células espermatogênicas. Há evidências de que uma considerável proporção de

RNA sintetizado nos espermatócitos, em paquíteno, seja preservada durante a diferenciação da espermatíde até estágios tardios da espermiogênese. Foi sugerido, também, que o “corpo cromatóide” deva ser uma organela de estocagem desses RNA tipo “longa-vida” assegurando, assim, a síntese protéica durante o final da espermatogênese, quando o genoma da espermatíde está inativo. É, ainda, possível, que proteínas pré-sintetizadas sejam estocadas no “corpo cromatóide” para que, no momento apropriado, sejam transformadas em estruturas próprias da espermatíde (Parvinen et al., 1986). Em túbulos seminíferos de roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*), analisados com técnicas citoquímicas e ultra-estruturais, foi constatada a participação desses “corpos cromatóides” na série sucessiva de eventos característicos que ocorre durante a diferenciação de espermatíde a espermatozóide, como por exemplo, a formação do acrossomo e do flagelo (Peruquetti et al., 2007).

Sendo assim, considerando a variação, durante a meiose do padrão de impregnação por íons prata, sugerimos que tais corpúsculos, visíveis da diacinese até às espermatídes, durante a espermatogênese dos triatomíneos, sejam semelhantes ao “corpo cromatóide” detectado em mamíferos e desempenhe função análoga, com ênfase ao metabolismo de RNA.

6- Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo sobre a espermatogênese de duas espécies do gênero *Triatoma* (*T. maculata* e *T. pseudomaculata*) por meio de técnicas citoquímicas clássicas, corroboraram e ampliaram os conhecimentos sobre a citogenética desses insetos hematófagos, vetores da Doença de Chagas.

Em relação à contribuição científica desse estudo, podem ser destacados, principalmente, os seguintes aspectos:

1. Nas duas espécies foi observada uma associação entre nucléolo e regiões heterocromáticas, nas células interfásicas somáticas e nas da linhagem germinativa. A localização coincidente dessas regiões específicas evidenciou, mais uma vez, a íntima relação funcional entre essas estruturas.

2. A diferenciação estrutural das regiões heterocromáticas, tanto na cromatina dos núcleos interfásicos quanto nos cromossomos já condensados, com base na técnica de bandamento – C, indicou que a localização dessas regiões cromossômicas é semelhante em relação aos cromossomos sexuais, sendo que nas duas espécies analisadas o cromossomo Y apresentou-se heterocromático (banda-C⁺). A espécie *T. maculata* apresentou um maior número de marcações heterocromáticas nos autossomos em relação à espécie *T. pseudomaculata*.

3. A atividade nucleolar persiste até o final da prófase I (diplóteno-diacinese) quando, então, verificou-se a fragmentação dessa organela em pequenos corpúsculos (partículas de ribonucleoproteínas – RNPs).

4. Nas fases iniciais da espermatogênese até a fase de alongação das espermátides, foi visível um corpúsculo de RNP análogo ao mesmo “corpo cromatóide” verificado na espermatogênese de vertebrados. Esses complexos de RNA + proteínas (RNPs) que formam este corpúsculo, são necessários para o metabolismo celular durante a série sucessiva de eventos característicos que ocorre durante a diferenciação de espermátide à espermatozóide: compactação da cromatina; substituição das proteínas histônicas complexadas ao DNA, por protamina; formação do acrossomo; formação do flagelo.

5. As espécies *T. maculata* e *T. pseudomaculata* não devem ser consideradas espécies intimamente relacionadas, de acordo com as semelhanças e divergências reveladas pelas técnicas citogenéticas.

6. As características citogenéticas com ênfase à distribuição das regiões heterocromáticas e a localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) são importantes ferramentas para o entendimento dos mecanismos adaptativos e de diferenciação que ocorreram ao longo da evolução desses insetos hematófagos.

7- Referências Bibliográficas

ASHRAF, M., GODWARD, M. B. E. The nucleolus in telophase, interphases and profase. *Journal of Cel. Scienci*, v. 41, p. 321-29, 1980.

ASHRAF, M., GODWARD, M. B. E. Ultrastructural study of nucleolus reorganization in telophase in a green alga. *Cytologia* v. 53, p. 447-456, 1988.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic study in the malpighian tubules, salivary glands and testes of triatomines (Triatominae, Heteroptera). Thesis Abstracts. *Brazilian Journal Genetics*, v. 13, p. 640-642, 1990.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Mg²⁺ - dependent ATPase activity investigated in heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. *Brazilian Journal. Genetics*, v. IX, p. 223-229, 1986.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, v. 92, p. 23-28, 1997.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, v. 93, p.33-42, 1998.

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

CAMACHO, J. P.; BELDA, J. CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analyzed by C-banding and silver impregnation. *Cancer Journal Gentics Cytologics*, v. 27, p. 491-497, 1985.

CASSEB-HASSAN, P. M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. *HB Científica*, v. 6, n.3, p. 173-178, 1999.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the triatominae. In: *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas*. Chapter 21, p. 569-925, 1999.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H; Noireau, F; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatomine (Hemíptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol*, v. 7, p. 1-99, 2000.

COMINGS, D. E.; OKADA, T. A. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: Kinetochore plates are presents in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma*, v. 37, p. 177-192, 1972.

DE ISOLA, E. D.; SANCHEZ, D.; KATZIN, V. *Triatoma infestans*: influencia de la alimentacion artificial sobre su ciclo de vida. *Medicina*, v. 40 (1), p. 207-212, 1980.

DE VAIO, E. S.; CRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M.; FRANÇA, M. E.; MARTINEZ, M. E. Meiotic differences between three triatomine species (Heteroptera, Reduviidae). *Genetica*, v. 67, p. 185-191, 1985.

DIAS, J. P. C.; MACHADO, E. M. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C. Esboço geral e perspectiva da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, p. 13-34, 2000.

DIAS, J. P. C. O controle da doença de Chagas no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 24 (II): p. 201-202, 1991.

FORRATTINI, O. P.; BARATA, J. M. S.; SANTOS, J. L. F.; SILVEIRA, A. C. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliares na região nordeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v. 15, p. 113-164, 1981.

FREITAS, S. P. C; LOROSA, E. S; RODRIGUES, D. C. S; FREITAS, A. L. C; GONÇALVES, T. C. M. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39(1), p. 27-32, 2005.

GUERRA, M. *Introdução à Citogenética Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.

GONÇALVES, T. C. M; CUNHA, V. OLIVEIRA, Edson; JURBERG, José. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola) 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92 (2), p. 275-280, 1997.

GONZÁLES-GARCIA, J. M.; ANTÔNIO, C.; SUJA J.; RUFAS, J. S. Meiosis in holocentric chromosomes: Kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Gramphosoma italium* (Heteroptera). *Chromosome Research.*, v. 4, p. 124-132, 1996.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínula, em laboratório. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 36, p. 251-262, 1972.

HOWELL, W; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1 – estep method. *Experientia*, v. 36, p. 1014 – 1015, 1980.

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

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their signnificance as vectors of Chagas' Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, v. 163, n. 3, 1979.

MADDRELL, S. H. P. Excretion inn the blood – sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stal. II. The normal course of diuresis and the effect of temperature. *Journal of Experimental Biology*, v. 41, p. 163-176, 1964.

MANNA, G. K. Multiple sex chromosome mechanis in a reduviid bug, *Conorhinus rubrofasciata*, (De Geer). *Proceedings of the Zoological Society Beng.*, v. 3, p. 155-161, 1950.

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

MELLO, M. L. S; RECCO-PIMENTEL, S. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios*, v. 52, p. 175-184, 1987.

MIRRE, C. KNIBIEHLER, B. Ultrastructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermiogenesis in the mouse. *Cell Differentiation*, v. 16, p. 51-61, 1985.

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

MORIELLE, A; AZEREDO-OLIVEIRA, A. T. V. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genetics and Molecular Research*, 2007a (in press).

MORIELLE, A; AZEREDO-OLIVEIRA, A. T. V. Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Micron*, 2007b (submitted).

NEVES, D. P. *Trypanosoma cruzi*. In: *Parasitologia médica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 10, p. 59-95.

OCHS, R. L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110kd/p15, I) is the nucleolar silver staining protein. *Experimental Cell Research*, v. 152, p. 260-265, 1984.

PANZERA, F.; ALVAREZ, F.; SANCHEZ-RUFAS, J.; PEREZ, R.; SUJA, J. A.; SCVORTZOFF, E.; DUJARDIN, J. P.; ESTRAMIL, E.; SALVATELLA, R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Genome*, v. 35, p. 1068-1074, 1992.

PANZERA, F; PEREZ, R; PANZERA, Y; ALVAREZ, F; SCVOTZOFF, E; SALVATELLA, R. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Chromosome Research*, v. 3, p. 143 – 150, 1995.

PARVINEN, M., VIHKO, K. K., TOPPARI, J. Cell Interactions during the seminiferous epithelial cycle. In: *Cytology: A survey of cell biology*. 3.ed. New York: Academic Press, 1986. v. 104, p.115-151.

PAYNE, F. Some new types of chromosomes distribution and their relation of sex. *Biological Bulletin*, v. 16, p. 119-166, 1909.

PÉREZ, R; PANZERA, Y; SCAFIEZZO, S; MAZZELLA, M. C; PANZERA, F; DUJARDIN, J. P; SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for triatominae species distinction (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87 (3): p. 353-361, 1992.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MULLER, C. A. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas disease. 1- Comparative xenodiagnosis with nine triatomines species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 77, p. 37-53, 1982.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. Laboratory colonies of Triatominae, biology and population dynamics, *Science Public PAHO*, v. 318, p. 63-82, 1976.

PERUQUETTI, R. L.; ASSIS, I. M.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* (2007), doi: 10.1016/j. micron. 2007.02.009.

- RICKEMAN, R. E. Biosystematics and host of the *Triatoma protracta complex* in North America (Heteroptera, Reduviidae) (Rodentia, Cricetidae). *Univ. Calif. Publs. Ent.*, v. 27, p. 93-240, 1962.
- SANTOS, S. M; LOPES, C. M; DUJARDIN, J. P; PANZERA, F; PÉREZ, R; CARBAJAL DE LA FUENTE, A. L; PACHECO, R. S; NOIREAU, F. Evolucionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 7, p. 469-475, 2007.
- SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of Triatominae. *Biosystematic of Haematophagous Insects*, v. 37, p. 287-312., 1988.
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J. and SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Science Direct-Trends in Parasitology*. v. 22, n. 12, p. 538-588, 2006.
- SCHRADER, F. The role of the Kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. *Evolution*, v. 1, n. 3, p. 134-142, 1947.
- SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Scienza Genética*, v. 3, p. 215-226, 1950.
- SCHEREIBER, G; ALENCAR, L. G; BOGLIOLO, A. R; CARVALHO, C. H; CAVENACH, C, M. T; ESPINOLA, N. H; GODOY, Jr, T. L; PARENTONI, M. R; PELLEGRINO, J; PINHO, C. A; REZENDE, E. S; SALGADO, A.A & SILVA, P.F. Vinte e cinco anos de citogenética dos Triatominae. *Rervista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 8, n. 2, p. 123-127, 1974.
- SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cromossomos Holocêntricos. *Naturalia*, v. 27, p. 11-26, 2002.

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

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of Triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genetics and Molecular Research*, v. 4, p. 704-709, 2005b.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic Study of Holocentric Chromosomes in Three Species of Triatomines (Heteroptera, Reduviidae). *Cytologia*, v. 69 (1), p. 53-57, 2003.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C. Estudo citogenético em espécies do gênero *Triatoma* (Heteroptera, Reduviidae) com ênfase à heterocromatina e às regiões organizadoras nucleolares. São José do Rio Preto, 2001. 191p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

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

SILVEIRA, C. A. Epidemiologia e controle da doença de Chagas. *A saúde no Brasil*, v. 1, n. 4, p. 212-218, 1983.

SOLARI, A. J. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae). *Chromosoma*, v. 72, p. 225-240, 1979.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Res.*, v. 75, p. 305-306, 1972.

SUMMER, A. T. Banding with nucleases. In: *Chromosome banding*. Boston: Unwin Hyman, 1990. cap. 12, p. 253-271.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., CERON, C. R. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, n.2b, p. 29-41, 2006.

TARTAROTTI, E. *Estudo Citogenético em Triatomíneos do gênero Panstrongylus* (Triatominae, Heteroptera). São José do Rio Preto, 1998. 189p. Dissertação (mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia*, v. 64, p. 235-240, 1999a.

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

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios*, v. 99, p. 113-122, 1999c.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Aspectos biológicos e médico-sanitários dos Triatomíneos. *HB Científica*, v. 3, n. 2, p. 137-144, 1996.

TAVARES, M. G. *Estudo Citogenético em espécies do gênero Triatoma, com ênfase à estrutura dos cromossomos e região organizadora nucleolar*. São José do Rio Preto, 1996. 164p. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas: Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

TAVARES, M. G; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic studies on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera : Reduviidae). *Cytobios*, v. 89, p. 51-61, 1997a.

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, 1997b.

TOLEZANO, J. E; CHIEFF, P. P; ARAUJO, M. F. L. DE; VALENTIM, A. M; RIBEIRO, S. S. Variáveis relacionadas ao desenvolvimento de *Triatoma infestans* Klug, em condições de laboratório. 1- Relação entre repasto sangüíneo e desenvolvimento. *Revista Instituto Adolpho Lutz*, v. 44. p. 73-79, 1984.

TORRES, M. Alguns fatos que interessam à epidemiologia da moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 7, p. 120, 1915.

TROEDSON, P. H. The behavior of the compound sex chromosomes in the females of certain Hemiptera-Heteroptera. *Journal of Morphology*, v. 75, p. 103-147, 1944.

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

UESHIMA, N. Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal cytogenetics*. Berlim: Gebruder Borntraeger. 1979, v. 3, Insecta, v. 6, p. 1-117.

VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Atheneu. 1987p.

VITTA, A. C. R.; FIGUEIRAS, A. N. L.; LOZZANI, C. R.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M. G. Agregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6: p. 865-867, 2002.

WARCZALOWSKA-SLIWA, E., BUGROV, A. G., NADACHOWSKA, M. Karyotypes, C-banding pattern and NORs of the genus *Montana zeuner* 1941 (Orthoptera, Tettigonioidae, Decticinae). *Folia Biologica* (Kraków) 42, 1994.

WOOD S. F. Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas disease. *Journal Economic Entomology*, v. 44, p. 52-54, 1951.

ZELEDÓN, R.; GUARDIA, V. M.; ZÚNIGA, A.; SWATZWELDER, J. C. Biology and entomology of *Triatoma maculata* (Latreille, 1811). I- Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. *Journal of Medical Entomology*, v. 7, p. 313-319, 1970.

8- Bibliografia Consultada

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Informação e Documentação – Referências –
Elaboração: NBR 6023. Rio de Janeiro. 1989, 24p.

Normas Para a Publicação da UNESP – Coordenadoria geral de Bibliotecas e Editora UNESP
– São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. 1994, 93p.

Rother, E. T; Braga, M. E. R. **Como Elaborar sua Tese: Estrutura e referências.** São Paulo.
2001, 86p.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ___/___/___

Assinatura