

Rita de Cássia de Sousa

**Estudo do Nucléolo e da Diferenciação
Longitudinal dos Cromossomos de Aedes
Aegypti, por Técnicas de Coloração**



1910000810



UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

RITA DE CÁSSIA DE SOUSA

ESTUDO DO NUCLEOLO E DA DIFERENCIAÇÃO LONGITUDINAL
DOS CROMOSSOMOS DE *AEDES AEGYPTI*,
POR TÉCNICAS DE COLORAÇÃO.



810/98

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências Biológicas
no Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Genética.

São José do Rio Preto
1998



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP, com auxílio-bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP; com auxílio-bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Aos meus queridos pais,

Waldevino e Maria Nícea.



Dedico este trabalho,

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a lidar com o desconhecido, a descobridor da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencerá."

Aos meus queridos pais,

Waldevino e Maria Nilce.

Albert Einstein

Agradecimentos

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu reconhecimento e gratidão e em particular:

A Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Dicudo pela orientação, paciência, dedicação e desprendimento durante todas as etapas deste trabalho.

A Profa. Dra. Lillian Madi-Ravazzi pelo incentivo e apoio desde a iniciação científica.

A Profa. Dra. Marlene K. H. Kobayashi e à Profa. Dra. Shirlei M. Resco-Pimentel, pela leitura minuciosa da Pro-forma, pelo interesse e estímulo.

A Profa. Dra. Maria Terécia V. A. Oliveira e à Profa. Dra. Mary M. Itoyama pela disponibilidade em ajudar sempre que precisamos.

A Elza Minko Sato pelo eficiente serviço de consulta bibliográfica e à Maria de Carmo Junqueira pela revisão das referências.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

Aos funcionários do Biotério, Fábio e Sidney, pela colaboração no fornecimento do camundongo para a alimentação dos mosquitos, garantindo assim a manutenção destes em laboratório.

A Maria Helena, pelo auxílio fotográfico.

Agradecimentos

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu reconhecimento e gratidão e em particular:

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo pela orientação, paciência, dedicação e desprendimento durante todas as etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pelo incentivo e apoio desde à Iniciação Científica.

À Profa. Dra. Marlene K. H. Kobayashi e à Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel, pela leitura minuciosa da Pro-forma, pelo interesse e estímulo.

À Profa. Dra. Maria Tercília V. A. Oliveira e à Profa. Dra. Mary M. Itoyama pela disponibilidade em ajudar, sempre que precisamos.

À Elza Mitiko Sato pelo eficiente serviço de comutação bibliográfica e à Maria do Carmo Junqueira pela revisão das referências.

Aos funcionários da Superintendência de Campanhas Endêmicas (SUCEN) de São José do Rio Preto: Beatriz, Perpétua; ao biólogo Rubens P. C. Júnior e ao engenheiro Francisco Chiaravalloti Neto pelo fornecimento de exemplares de *Aedes*, e à bióloga Margareth Dibo-Soares pela disposição no fornecimento de dados estatísticos referentes à ocorrência e atividade de controle do mosquito.

Aos funcionários do Biotério, Fábio e Sidney, pela colaboração no fornecimento do camundongo para a alimentação dos mosquitos, garantindo assim a manutenção destes em laboratório.

À Maria Helena, pelo auxílio fotográfico.



Ao Prof. Dr. James R. Coleman pela revisão do "Summary".

Ao CNPq e CAPES pelos auxílios financeiros e pela concessão de bolsa de Mestrado (CNPq).

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação, pelo agradável convívio e solidariedade.

Ao Marcelo, por estar ao meu lado, sempre.

Aos meus pais, Waldevino e Maria Nilce, que me ensinaram a amar o trabalho e as responsabilidades e pelo apoio e carinho.

A Deus, por tudo.

3. Importância - Aspectos epidemiológicos.....	2
4. Biologia de <i>A. degumii</i>	11
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1. Espécie utilizada.....	19
2. Manutenção das amostras em álcool.....	19
4. Preparações citológicas.....	20
4.1. Preparo de lâminas e lâminas lacto-acéticas.....	20
4.2. Preparo de lâminas e lâminas lacto-acéticas.....	20
4.3. Bandamento C.....	21
4.4. Nitrato de Prata.....	21
5. Total de lâminas analisadas.....	22
6. Fotomicrografias.....	23
III. Resultados.....	25
1. Túbulos de Malpighi.....	25
1.1. Coloração com orceína-lacto-acética.....	25
1.2. Coloração com Feulgen.....	29
1.3. Coloração pela técnica de bandamento C.....	29
1.4. Impregnação pelo nitrato de prata.....	32
2. Células da Região celática.....	32
2.1. Coloração pela técnica de bandamento C.....	32
2.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	39
3. Ovírio.....	46
3.1. Coloração com orceína-lacto-acética.....	48
3.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	51
3.3. Coloração pela técnica de bandamento C.....	57
4. Testículo.....	60
4.1. Coloração pela técnica de bandamento C.....	60
4.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	61
IV. DISCUSSÃO.....	66
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	90
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	92
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Taxonomia.....	1
2. Distribuição.....	1
3. Importância - Aspectos epidemiológicos.....	2
4. Biologia de <i>Ae. aegypti</i>	11
5. Abordagens citogenéticas.....	15
6. Objetivos.....	18
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1. Espécie utilizada.....	19
2. Origem das amostras.....	19
3. Manutenção das amostras em laboratório.....	19
4. Preparações citológicas.....	20
4.1. Esmagamento e coloração com orceína-lacto-acética.....	20
4.2. Preparo de lâminas a serem submetidas ao bandamento C e ao nitrato de prata.....	20
4.3. Bandamento C.....	21
4.4. Nitrato de Prata.....	21
4.5. Reação de Feulgen.....	22
5. Total de lâminas analisadas.....	23
6. Fotomicrografias.....	23
III. Resultados.....	25
1. Túbulos de Malpighi.....	25
1.1. Coloração com orceína-lacto-acética.....	25
1.2. Coloração com Feulgen.....	29
1.3. Coloração pela técnica de bandamento C.....	29
1.4. Impregnação pelo nitrato de prata.....	32
2. Células da Região cefálica.....	32
2.1. Coloração pela técnica de bandamento C.....	32
2.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	39
3. Ovário.....	46
3.1. Coloração com orceína-lacto-acética.....	48
3.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	51
3.3. Coloração pela técnica de bandamento C.....	57
4. Testículo.....	60
4.1. Coloração pela técnica de bandamento C.....	60
4.2. Impregnação pelo nitrato de prata.....	61
IV. DISCUSSÃO.....	66
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	90
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	92
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

I- INTRODUÇÃO

1- Taxonomia

Os culicídeos (família Culicidae, subfamília Culicinae) são dípteros de pequeno porte e de corpo delgado, conhecidos comumente como mosquitos ou pernilongos. Reconhece-se, atualmente, a existência de cerca de 3600 espécies, com aproximadamente 40 gêneros, sendo a área neotropical (América Central, Antilhas e América do Sul) a que detém o maior nível de endemidade, com 27% desses grupos restritos a essa região (Forattini, 1996). A subfamília Culicinae é dividida em várias tribos, uma das quais é a Aedini, que inclui o gênero *Aedes*. A espécie de mais ampla distribuição e de maior importância vetorial, *Aedes (Stegomyia) aegypti*, foi descrita por Linnaeus em 1762 (Forattini, 1965). Essa espécie foi dividida em duas subespécies, *Ae. aegypti aegypti* e *Ae. aegypti formosus* (Mattinghy, 1957 apud Jupp *et al.*, 1991). A última está confinada à África do Sul e Sahara.

2- Distribuição

O mosquito *Aedes aegypti* é originário da África e parece ter sido introduzido na América em época precoce da colonização, através de embarcações. Possui distribuição quase mundial, em regiões tropicais e sub-tropicais, entre 30°N e 20°S (Christophers, 1960 apud Halstead, 1988). A ampla distribuição desta espécie, possivelmente, está relacionada à temperatura. Os adultos não são resistentes a climas muito frios ou muito quentes. Por exemplo, são letais as temperaturas de 6° C por 24 horas e 42°C por 5 minutos. A temperatura limite para larvas é de -8 a 46°C e para ovos é de 20 a 46°C (Slosek, 1986). O mosquito *Ae. aegypti* é raramente encontrado acima de 1200m de altitude, embora tenha sido visto a 1700m no México (Herrera-Basto *et al.*, 1992) e a 2200m na Colômbia (Nelson, 1985 apud Marzochi, 1994). Na África do Sul esta espécie é representada por populações estabelecidas em uma variedade de altitudes, desde o nível do mar

até 1800m, principalmente associadas com savanas, florestas, ou com ambiente urbano (Muspratt, 1956 apud Kemp & Jupp, 1991).

A incidência e distribuição geográfica deste mosquito têm aumentado muito nos últimos anos; sua densidade populacional é altamente dependente de habitações humanas e criadouros artificiais (Monath, 1994a).

3- Importância- Aspectos epidemiológicos

Mosquitos têm sido alvo de estudos científicos desde o início do século, quando foram inicialmente relacionados a doenças (Besansky & Collins, 1992). Os mosquitos são hospedeiros de uma variedade de patógenos e parasitas, incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides. Alguns destes organismos alternam a fase parasitária com a fase de vida livre, outros são inteiramente parasitas e muitos destes alternam entre hospedeiros mosquitos e outros vertebrados e invertebrados (Clements, 1992). *Ae. aegypti* possui considerável interesse médico-sanitário, visto que é o principal vetor da dengue e dengue hemorrágica e outras doenças como a febre amarela. O *Ae. aegypti* é originário da África e considera-se que foi silvícula (habitante de bosques) e, posteriormente foi se adaptando ao habitat doméstico e urbano dos tempos modernos (Reyes-Villanueva, 1990).

O ciclo urbano da febre amarela foi erradicado no Brasil desde 1942, entretanto como o *Ae. aegypti* está distribuído por todo o país, o risco de uma epidemia urbana pode acontecer a qualquer momento, desde que um paciente virêmico se instale em uma cidade com altas densidades do mosquito (Vasconcelos *et al.*, 1992). Ainda persiste a forma silvestre da doença, cujo vírus circula entre mosquitos (*Haemagogus* e *Sabethes*) e algumas espécies de macacos. Em muitos Estados brasileiros casos de febre amarela são mais ou menos numerosos a cada ano (Mondet, 1996). O homem ao penetrar na mata, sem a devida proteção conferida pela vacina, torna-se susceptível a contrair a doença (Lima, 1985). Assim, a necessidade de vacinação da população que vive em área endêmica ou que para lá se dirige é inquestionável (Tauil, 1986).

A fêmea de *Ae. aegypti* adquire o vírus da dengue através da picada em um indivíduo infectado. O vírus entra no sistema digestivo e se dissemina para outros órgãos do mosquito, incluindo a glândula salivar. Após várias replicações na glândula salivar, o vírus, presente na saliva do mosquito, pode ser transmitido a outro indivíduo, na próxima picada, durante a ingestão de sangue (Halstead, 1988).

Os agentes causadores da febre amarela e dengue são arbovírus, membros da família Flaviviridae. Ambos os vírus têm ciclos de transmissão silvestre, envolvendo macacos selvagens e mosquitos vetores, e um ciclo urbano, envolvendo hospedeiros humanos e mosquitos domésticos, como o *Ae. aegypti*, o qual é altamente dependente do homem para oviposição e repouso (Monath, 1994a).

Os vírus da dengue constituem um complexo antigênico, do gênero Flavivirus e são vírus de RNA. Existem 4 sorotipos distintos: dengue tipo 1 (DEN-1), dengue tipo 2 (DEN-2), dengue tipo 3 (DEN-3) e dengue tipo 4 (DEN-4), os quais podem ser diferenciados, além de sorologicamente (Westaway *et al.*, 1985 apud Barbosa, 1996) também bioquimicamente (Vezza *et al.*, 1980). Não existe nenhuma imunidade entre os sorotipos, assim uma pessoa pode ter tanto quanto 4 infecções por dengue durante a sua vida (Gubler & Trent, 1994).

O principal vetor do vírus da dengue é *Ae. aegypti*, uma espécie altamente domesticada que se tornou adaptada para viver em íntima associação com o homem. Mosquitos vetores secundários incluem *Ae. albopictus* de origem asiática, já introduzido nos Estados Unidos (no Texas em 1985), África (na Nigéria em 1991), no Brasil (no Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo em 1986), inclusive na região de São José do Rio Preto, e o complexo *Aedes (Scutellaris)*, encontrado no Pacífico Central e Sul (Forattini, 1986; Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Gubler & Trent, 1994).

A introdução e disseminação de *Ae. albopictus* da Ásia para as Américas, nos anos 80, foi um dos mecanismos para a rápida mudança no balanço ecológico da transmissão do vírus. *Ae. albopictus* é responsável pela transmissão endêmica de dengue na Ásia e por epidemias em áreas onde *Ae. aegypti* está ausente, por exemplo, nas ilhas de Seychelle em 1977 (Monath, 1994a).

Os arbovírus possuem padrões de infecção distintos em diferentes espécies de mosquitos, que podem alterar a sua capacidade ou competência para funcionarem como vetores. A competência vetorial de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para o vírus DEN-1 foi testada em Taiwan. Os mosquitos foram infectados com o vírus e vários tecidos foram testados para a sua presença. Os tecidos da probóscide de *Ae. albopictus* não foram infectados pelo vírus, mas o foram frequentemente em *Ae. aegypti*, indicando que o vírus pode escapar da barreira da glândula salivar mais eficientemente que em *Ae. albopictus*. Provavelmente, em Taiwan, *Ae. albopictus* desempenhe um papel secundário na transmissão do vírus, não sendo capaz de manter a transmissão do vírus DEN-1 na ausência de *Ae. aegypti* (Chen *et al.*, 1993).

A análise de uma linhagem do Espírito Santo (Brasil) de *Ae. albopictus* por Miller & Ballinger (1988), quanto à capacidade vetorial revelou uma menor susceptibilidade à infecção pelo vírus da dengue e febre amarela em relação a *Ae. albopictus* da América do Norte.

A dengue é uma doença humana de abrangência mundial. Nas Américas e na África, o vírus, na maioria dos casos, leva a uma síndrome benigna, a febre por dengue. Na Ásia tropical, uma região de alta endemicidade, a doença é mais severa. Nesta área o vírus da dengue causa com mais frequência a dengue hemorrágica (DH) e a síndrome do choque pelo vírus da dengue (SCD) (Halstead, 1988; James, 1996).

A incidência da dengue tem aumentado dramaticamente nos últimos 15 anos, na maioria dos centros urbanos nos trópicos. Paralelamente, tem ocorrido o surgimento de epidemias de dengue hemorrágica (Gubler & Trent, 1994).

A situação da dengue no mundo caracteriza-se por 2,5 bilhões de pessoas em risco, 60 milhões de casos por ano e 30000 mortes por ano. A epidemiologia da doença pode ser dividida em situações endêmico-epidêmicas no sudeste Asiático, e situações epidêmicas nas ilhas do Pacífico, na África e América tropical (Rodhain, 1996).

A grande adaptabilidade demonstrada por esta espécie ao meio ambiente humano fez com que, nas Américas, fosse o grande responsável pela transmissão da



febre amarela nas cidades e núcleos povoados da zona rural. Ao lado da ação veiculadora de moléstias, a importância sanitária do *Ae. aegypti* prende-se às consequências decorrentes de sua simples presença. Em certas regiões e em épocas propícias, pode atingir alta densidade a qual, aliada à averse por sangue humano, podem transformar esta espécie em sério inconveniente para o bem estar do homem (Forattini, 1965). Deve-se considerar, ainda, que o controle do *Ae. aegypti* envolve o uso de inseticidas, que por sua vez podem trazer sérias consequências para o meio ambiente. Dadas suas características de transmissor de doenças, é grande o interesse em se estudar as características biológicas deste organismo.

A introdução dos diversos sorotipos do vírus e a manutenção da doença em muitas regiões do mundo, vêm ocorrendo devido à urbanização descontrolada nos trópicos, aumento demográfico, condições climáticas favoráveis para a proliferação dos vetores, deficiências dos programas de controle dos vetores, deteriorização dos programas de saúde pública e, finalmente em decorrência de problemas econômicos e sociais (Barbosa, 1996; Rodhain, 1996).

A dengue é uma doença ligada ao meio ambiente e, acima de tudo, a hábitos domésticos da população. Assim, o acúmulo de recipientes com água, tais como vasos de flores, baldes, garrafas vazias, pneus e outros, favorecem a proliferação do vetor, que se multiplica, preferencialmente, em águas paradas e limpas. Nas áreas urbanas e rurais da Ásia e das Américas *Ae. aegypti* se reproduz principalmente em recipientes usados para armazenar água para uso doméstico e em recipientes descartados e pneus usados.

Antes de 1980, muitas epidemias eram causadas por um, ou ocasionalmente dois sorotipos de dengue, mas muitos sorotipos são agora endêmicos em diversas regiões e a situação de emergência criada pela dengue hemorrágica, ou síndrome do choque pelo vírus da dengue (DH/SCD), tornou-se um grave problema de saúde pública, não só nas Américas, mas em vários outros países (Gubler, 1989).

A DH/SCD pode resultar da infecção sequencial de dois sorotipos diferentes, assim a introdução de um novo sorotipo em uma área anteriormente infectada, é potencialmente perigosa. Nos últimos anos, a forma hemorrágica da dengue tem causado um maior número de mortes que outras doenças causadas por arbovírus.

Nos seres humanos, os quatro sorotipos são responsáveis tanto pela dengue clássica como pela DH/SCD (Halsted, 1988).

Observações acumuladas há mais de três décadas mostram que a DH/SCD pode ocorrer em dois grupos principais. O primeiro é constituído por indivíduos que apresentam uma primeira infecção por qualquer um dos sorotipos do vírus, incluindo crianças menores que um ano de idade, durante epidemias de DH/SCD. O segundo tipo é representado por indivíduos já infectados anteriormente e desenvolvendo nova infecção por um sorotipo diferente do anterior (Pontes & Ruffino-Netto, 1994). Evidências epidemiológicas sugerem que a DH/SCD ocorre com maior frequência dentro de um intervalo entre 3 até 5 anos a partir da infecção primária.

A primeira epidemia de DH/SCD fora do sudeste asiático ocorreu nas Américas em 1981, em Cuba, levando à hospitalização de 1% da população, num período de 3 meses, com 158 mortes, e a segunda na Venezuela, em 1990, com 73 mortes. A partir de 1986, houve uma expansão rápida do vírus e grandes epidemias têm ocorrido em países ou áreas que permaneceram livres da dengue por um período de 35 a 130 anos, incluindo: Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador, Peru e USA (Gubler, 1992 apud Barbosa, 1996; Gubler & Trent, 1994; Halstead, 1988).

Em 1955, o Brasil e 18 países da América, mais ou menos nesta época, erradicaram o mosquito *Ae. aegypti* de seus territórios, após muitos anos de luta (Tauil, 1986). Porém, a partir dos países que não o erradicaram, Estados Unidos e Venezuela, praticamente todos foram reinfestados (Gratz, 1993). Este mosquito foi encontrado temporariamente no Brasil, em 1967 em Belém (Pará) e 1968 em São Luís (Maranhão) tendo sido eliminados, mas a partir de 1976 foi encontrado em Salvador (Bahia), definitivamente, disseminando-se para outros Estados (Pontes & Ruffino-Netto, 1994; Mondet *et al.*, 1996). Até 1994, nas Américas, somente as Ilhas Bermudas, Uruguai e Chile permaneceram livres do mosquito *Ae. aegypti* (Gubler & Trent, 1994).

No Brasil, nos últimos 10 anos vêm ocorrendo epidemias de dengue por todo o País, exceto na região Sul. A primeira epidemia registrada, após a erradicação do mosquito, foi em 1982 em Boa Vista (Roraima), atingindo 20% da população, sendo

identificados os vírus DEN-1 e DEN-4, exigindo gastos extremamente elevados para o seu controle (Osanai *et al.*, 1983).

Em 1986 registrou-se no Estado do Rio de Janeiro, uma epidemia provocada pelo vírus DEN-1. Após este período, a atividade deste vírus foi observada ao longo da costa leste do Brasil, principalmente em Alagoas e Ceará (casos relatados anualmente de 1986 a 1994) embora outros Estados, como Pernambuco e Bahia também tenham tido pequenos surtos da doença, em 1987 (Marzochi, 1994). No Estado da Bahia, foi detectado um outro surto da doença em 1994, porém, provocado pela atividade do vírus DEN-2 (Nogueira *et al.*, 1995).

Em fevereiro de 1989, foi isolada a primeira amostra do vírus DEN-2, no Brasil, em uma paciente oriunda de Angola (Travassos da Rosa, 1989 apud Vasconcelos *et al.*, 1993). Um ano depois, em 1990, o Rio de Janeiro teve sua segunda epidemia, agora causada pelo vírus DEN-2, com centenas de casos da forma hemorrágica da doença, ocorrendo pela primeira vez no Brasil (Marzochi, 1987). Em 1990, a dengue afetou a região nordeste do Estado de São Paulo (epidemia em Ribeirão Preto) e Mato Grosso do Sul, pela primeira vez, tendo sido isolado o vírus DEN-1 (Serufo *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 1995). Em 1991, em Araguaína (Tocantins) registrou-se uma epidemia de dengue pelo vírus DEN-2, com 90.000 casos (Vasconcelos *et al.*, 1993). Uma grande epidemia de dengue, inclusive com casos de dengue hemorrágica, ocorreu em 1994 no Ceará, a maioria dos casos na cidade de Fortaleza, provocados pelos vírus DEN-1 e DEN-2; ambos os sorotipos estavam envolvidos com a manifestação de dengue hemorrágica (Vasconcelos *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1995).

O Estado de São Paulo possui 585 municípios, dos quais 74,4%, em 1993, já estavam infestados por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A distribuição destes vetores caracterizam 3 áreas distintas: a região oeste, onde predomina *Ae. aegypti*, a região central, onde ocorrem ambas as espécies, e a região leste, onde predomina *Ae. albopictus* (Marques *et al.*, 1993; Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

O mosquito *Ae. aegypti* foi encontrado pela primeira vez em São José do Rio Preto em 1985. Os primeiros casos de dengue foram registrados em 1991 e desde então têm sido relatados anualmente. As duas maiores epidemias foram registradas

em 1995, com o maior número de infectados no interior do Estado de São Paulo, e 1996, com 1323 e 727 casos, respectivamente (Dibo-Soares*, 1997). O primeiro caso de dengue hemorrágica nessa Cidade, foi provocado pelo vírus DEN-2 em fevereiro de 1997 (Gonçalves, 1997, Diário da Região). Em Franca, um único caso de dengue foi registrado pela primeira vez em em 1990. Entre 1990 e 1995, não houve casos de dengue. Em 1995 ocorreram dois casos, em 1996, 6 casos e em 1997, até agosto, 3 casos (Dibo-Soares*, 1997).

Em 1985, diante da grande dispersão do mosquito *Ae. aegypti*, instituiu-se o "Programa de Controle dos Vetores da Dengue e da Febre Amarela no Estado de São Paulo", sob a responsabilidade da SUCEN; até então o controle do *Aedes* era desenvolvido pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública-SUCAN. Apesar das atividades de controle desenvolvidas, os levantamentos realizados pela SUCEN mostraram contínuo aumento no número de infestações domiciliares no Estado de São Paulo (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

Índices de densidade larvária têm sido utilizados para o estudo da densidade e distribuição dos vetores da febre amarela e dengue. No Estado de São Paulo, adotou-se o índice de Breteau como indicador dos níveis de infestação domiciliar por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Esse índice envolve o dimensionamento dos criadouros existentes, pela contagem dos recipientes com larvas, dando indicação da intensidade e extensão da infestação, associando recipientes a casas (n° de amostras positivas/ n° de residências visitadas x 100). O conhecimento dos níveis de infestação permite a avaliação dos riscos de uma epidemia. Áreas com índices superiores a 5 são considerados locais de risco para a transmissão das doenças. Este índice é efetuado mensalmente onde há infestação domiciliar (Alves *et al.*, 1991).

Tentativas para o controle de mosquitos têm falhado devido à sua alta capacidade reprodutiva e flexibilidade genética, incluindo um rápido espalhamento de genes de resistência a inseticidas, nas populações (Besansky & Collins, 1992). A ausência de vacinas, o colapso do sistema de saúde e falhas nos programas visando ao controle do mosquito, também são responsáveis pela dificuldade de se

* Dibo-Soares, M. (Bióloga da Superintendência de Campanhas Endêmicas - SUCEN). Comunicação Pessoal, 1997.



evitar a doença. A falta de colaboração da população, na eliminação dos criadouros, é também digna de nota.

Novas estratégias de controle estão sendo agora consideradas, incluindo a alteração genética dos mosquitos vetores, visando evitar a rápida proliferação do vírus nas suas glândulas salivares. Olson *et al.* (1996), na Universidade do Estado do Colorado (USA) conseguiram, através de alteração genética, tornar o mosquito *Ae. aegypti* incapaz de transmitir o vírus da dengue. Porém, é necessário saber se é possível integrar de modo permanente a “escada antisense” no material genético do mosquito e se esse poderia tomar o lugar do mosquito selvagem (capaz de transmitir o vírus). Até que essas questões sejam solucionadas, a única maneira de se prevenir a doença é erradicar esse inseto.

A utilização de inseticidas químicos requer um monitoramento e controle da toxicidade e resistência do vetor. No Brasil, a maioria dos agentes químicos utilizados são organofosforados, pois as linhagens de *Aedes* que reinfestaram o País são resistentes à organoclorados (incluindo DDT) (Uribe, 1983 apud Marzochi, 1994). Organofosforados são administrados na forma de Temefos (Abate), granulado a 1%, e são considerados seguros quando usados para matar larvas em recipientes com água (Jukes, 1983 apud Marzochi, 1994). Entretanto, o potencial tóxico destes químicos, quando aplicados em altas concentrações, como adulticidas, usando um volume ultra baixo, é um problema que requer investigações sobre a ação em pessoas e meio ambiente (Marzochi, 1994). Durante os surtos de DH, a maioria dos municípios utilizam aplicações de Malathion, Fenitrothion, Deltamethrin e outros inseticidas para obter um rápido controle da população de mosquitos vetores (Gratz & Jany, 1994).

Medidas de controle baseadas em competição biológica entre larvas de insetos e peixes, em criações de *Ae. aegypti*, têm dado resultados variáveis (Annis *et al.*, 1989, 1990; Wang *et al.*, 1990 apud Marzochi, 1994). O uso de *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus* como larvicidas parece promissor, uma vez que estes microorganismos produzem proteínas tóxicas para as larvas de mosquitos (Mulla *et al.*, 1986 apud Marzochi, 1994; Mulla & Sing, 1991; Orduz, 1995). Entretanto, métodos de controle, baseados em microorganismos, podem funcionar para vetores



que se reproduzem em grandes corpos de água, como rios, lagoas e pântanos, porém, não são recomendáveis do ponto de vista prático para vetores que se reproduzem em pequenos depósitos temporários, que é o caso de *Ae. aegypti* (Reyes-Villanueva, 1990).

As razões para o ressurgimento de dengue são complexas e não são completamente entendidas. Nas Américas, um dos mais importantes fatores foi a falha nos programas de erradicação do mosquito e a subsequente reinvasão nos centros urbanos tropicais por esta espécie. As pessoas devem entender que a doença só existe porque elas permitem que o mosquito se reproduza em suas casas. Assim os programas de controle devem ser baseados na educação e participação da comunidade (Reyes-Villanueva, 1990).

A dificuldade em se desenvolver uma vacina para a dengue e DH/SCD está no fato de que os 4 sorotipos podem causar ambas as doenças e não existe imunidade entre os diferentes sorotipos. O risco de se desenvolver a DH/SCD é relativamente maior entre aqueles indivíduos que já sofreram uma segunda e subsequente infecção por dengue. Consequentemente, a vacina deve proteger contra os 4 sorotipos. Vacinas contra o vírus da dengue ainda não estão disponíveis para uso geral, embora pesquisas promissoras tenham sido desenvolvidas por pesquisadores da Universidade de Mahidol, Tailândia e inclusive uma vacina contra o vírus DEN-2, já tenha sido testada em voluntários americanos, sendo segura e sem reações adversas sérias. Esta vacina mostrou-se altamente imunogênica e todos os voluntários desenvolveram anticorpos neutralizantes, que persistiram por dois anos (Vaughn *et al.*, 1996). Até que uma vacina eficiente contra todos os sorotipos do vírus da dengue seja desenvolvida, a única maneira de se prevenir epidemias dessa doença é através do controle dos mosquitos que transmitem o vírus (Leduc, 1994; Gubler & Trent, 1994).

Manifestações clínicas da doença

A dengue manifesta-se como uma enfermidade infecciosa aguda, caracterizada por um amplo espectro clínico, que varia desde infecções assintomáticas ou febre indiferenciada, até as formas de hemorragia e/ou choque.

A febre por dengue, ocorre mais frequentemente em crianças mais velhas e adultos, começa abruptamente, após um período de incubação do vírus de 4-6 dias, com febre alta e dor de cabeça, seguidos por mialgia generalizada, dor nos ossos, anorexia, náuseas, vômitos, fraqueza, prostração, entre outros. O estado febril pode permanecer por 5-7 dias (Gubler & Trent, 1994; Nimmannitya, 1994; Monath, 1994b).

DH/SCD é uma doença que atinge, mais comumente, crianças menores que 15 anos, inicia-se de forma semelhante ao dengue clássico, mas depois de 2-5 dias progride para uma forma severa com prostração, irritabilidade, choque com extremidades frias e úmidas, sudorese, cianose periférica, respiração rápida, pulso rápido e hipotensão. Ocorrem hemorragias espontâneas de todos os tipos. Alterações físicas incluem hemorragias na pele, derrame pleural, alterações dos sinais vitais, hepatomegalia e linfadenopatias. A duração da DH é de 7 a 10 dias, na maioria dos casos. Em sua forma mais severa (designada SCD, que ocorre em mais de 1/3 dos indivíduos com DH), os pacientes apresentam queda da pressão arterial e falha circulatória. A síndrome de choque por dengue requer substituição rápida do grande volume de plasma sanguíneo perdido pelo paciente. A progressão do choque é rápida e sem tratamento, leva mais de 20% dos pacientes à morte; com tratamento à base de reposição de fluidos, eletrólitos e oxigênio, esta proporção cai para menos que 1% (Nimmannitya, 1994; Monath, 1994b).

4- Biologia de *Ae. aegypti*

Os culicídeos exibem metamorfose completa, isto é, a forma juvenil passa por larva e pupa. A larva é anatomicamente diferente dos adultos, vive em habitats diferentes e exibe tipo diferente de alimentação (Clements, 1992). As fêmeas botam de 50 a 500 ovos, de uma só vez, depositando-os em ambientes favoráveis. Os espermatozóides estocados pelas fêmeas inseminadas fertilizam os oócitos e o desenvolvimento embrionário inicia-se logo após os ovos terem sido postos. Os ovos são depositados na superfície ou logo acima da superfície da água e são visíveis como pequenos pontos escuros. Dentro de um a dois dias, uma semana ou

mais, dependendo da temperatura, o embrião desenvolve-se em uma larva completamente formada (Clements, 1992). Dentro de 48 horas, se as condições forem viáveis, dá-se a eclosão da larva (Jones, 1978) ou esta pode ser adiada por tempo prolongado, até que ocorram condições favoráveis. O contato com a água parece ser o estímulo principal para a saída da larva e, em condições normais, a grande maioria dos ovos maduros eclodem, decorridos alguns minutos ou no máximo horas, após a submersão nesse meio líquido (Forattini, 1965).

Os mosquitos da tribo Aedini têm ovos capazes de resistir à dessecação e podem permanecer viáveis por meses e até anos na ausência de água (Clements, 1992). Quando a larva do mosquito deixa o ovo, ela está fortemente adaptada para viver na água, tendo duas características que determinam seu modo de vida: o uso de oxigênio atmosférico para respiração e filtração de água para alimentação. Em poucos dias, ela completa seu ciclo larval, que consiste de 4 discretos estádios, tornando-se maior e mais complexa a cada etapa (Jones, 1978). Os estádios larvais ocorrem em habitats bastante diversos, como lagoas, poças, recipientes artificiais, buracos no tronco de árvores, bromélias, etc. As larvas se alimentam de microorganismos aquáticos (bactérias, algas e lêvedos), polén e uma ampla variedade de detritos orgânicos, passando cerca de 95% do tempo filtrando água para reter partículas alimentares (Jones, 1978). A duração da fase larval é variável com a temperatura. Em geral as larvas atingem o estágio de pupa em 7 dias após a eclosão, sob condições ideais (Craig *et al.*, 1960). As pupas são também aquáticas e, ao contrário da maioria das pupas de outros insetos, são bastante ativas. Respiram na superfície da água através de trompetas situadas no tórax (Borror & DeLong, 1964 apud Clements, 1992). A cabeça e o tórax, com seus alongados apêndices, estão cimentados juntos na forma de um cefalotórax. O abdomen retém a forte musculatura larval e funciona como um órgão de propulsão efetivo. Neste estágio, a boca e o ânus são selados; desta forma a pupa não se alimenta e não elimina fluidos ou sólidos. O estágio final da metamorfose, na pupa, pode ser completado dentro de um a dois dias, se a temperatura for suficientemente alta (Clements, 1992).

De 20 a 24 horas após o adulto ter emergido, inicia-se a sua procura por alimento. Somente as fêmeas são hematófagas, os machos alimentam-se de néctar e



de outros líquidos vegetais. As fêmeas também se alimentam de fluidos doces, mas quando é dada a chance de escolha entre o fluido açucarado e o sangue, a fêmea faminta sempre prefere o sangue (Jones, 1978). O período de vida do mosquito adulto, *Ae. aegypti*, é de poucas semanas, variando de 10 a 45 dias (Forattini, 1965; Marzochi, 1994).

O adulto recém-emergido passa suas primeiras 24 horas em repouso, pousado sobre as paredes ou superfícies verticais, sombreadas, ao redor do criadouro. Depois inicia um período de vôos curtos em busca do sexo oposto e de um hospedeiro para alimentação. Na fêmea, durante o repouso, ocorre um desenvolvimento folicular parcial, cujo término está sujeito à ingestão de sangue para a maioria dos mosquitos (anautogenia). A fêmea se orienta detectando o calor, o dióxido de carbono e principalmente o ácido láctico que emana do hospedeiro potencial, iniciando o comportamento de busca entre 24 e 72 horas após ter eclodido. Uma fêmea jovem (24h) produz som de baixa frequência e não é perseguida por machos, porém uma fêmea madura (mais de 48h) produz som de maior frequência e é fortemente atrativa (Reyes-Villanueva, 1990).

As espécies de *Aedes* apresentam diapausa sucedendo-se ao desenvolvimento embrionário e antecedendo à eclosão. Nas regiões de estações anuais bem marcadas, o fenômeno de diapausa constitui mecanismo para ultrapassar o período desfavorável do inverno. Contudo, tem-se observado várias eclosões dentro de uma mesma época favorável, bem como a ocorrência desta quiescência em áreas onde não existem estações anuais rigorosas. Neste último caso, diversas gerações são produzidas na dependência das dessecações e inundações dos locais de criação. Pode ocorrer um grande número de posturas durante certo tempo em amplas áreas de terreno sem condições imediatas para criação. Com a sobrevinda de condições favoráveis, representadas por chuvas e temperatura adequada, ocorre o alagamento e consequente formação de grandes criadouros. Como resultado final, observa-se o aparecimento explosivo, em poucos dias, de um grande número de adultos (Forattini, 1965).

As observações de laboratório indicam que as posturas de *Ae. aegypti* podem ser feitas diretamente na água ou nas paredes do criadouro, pouco acima da



superfície líquida. Obtém-se as primeiras, quando o material de que é feito o recipiente é de tal forma liso que não propicia substrato viável para a ulterior fixação dos ovos. Obtém-se as segundas, quando tais condições são inversas. Como exemplo, podem ser citados os recipientes de vidro, para o primeiro caso, e os de barro poroso para o segundo. Quanto às propriedades da água, tem-se estabelecido que existem preferências pelos meios pouco poluídos, pobre em sais e matéria orgânica (Forattini, 1965).

O fato já mencionado, de que, os ovos de *Ae. aegypti*, são passíveis de apresentar resistência prolongada às condições desfavoráveis do meio, é de grande interesse prático, pois explica a possibilidade que este mosquito teve e tem, de disseminar-se por amplas áreas geográficas. Compreende-se, assim, o transporte de ovos resistentes, em recipientes, através de distâncias consideráveis. Neste culicídeo, a fase de ovo é, sem dúvida, a etapa de maior resistência de seu ciclo biológico e, nas regiões onde as estações anuais são bem marcadas, é tida como o meio principal de que a espécie dispõe para suportar os rigores do inverno (Forattini, 1965).

Apesar de *Ae. aegypti* possuir poder de vôo apreciável, é considerado como um mosquito com pequena tendência para as viagens de longo alcance. Esta espécie restringe-se às áreas onde encontra ambiente necessário às suas atividades, fazendo vôos curtos e procurando, com frequência, abrigos para pouso (Forattini, 1965).

O forte padrão diurno de atividade de *Ae. aegypti* é bem conhecido. Todavia as verificações deste aspecto particular do comportamento, nem sempre são concordantes. Há dados que indicam picos de atividade logo após o nascer do sol e logo antes do pôr do sol (Trpis, 1973). Na região de Quênia, África, foram feitas observações mostrando que o *Ae. aegypti* suga tanto de dia como de noite, sendo, porém, mais frequentemente diurno no desempenho desta atividade (Teesdale, 1955 apud Forattini, 1965). Os máximos de hematofagia verificados por aquele autor foram incluídos em dois picos. Destes, o maior ocorre das 10 às 13 horas, e o menor, das 16 às 19 horas. Porém, estudos realizados por Kemp & Jupp (1991) na África do Sul, demonstraram que altas taxas de picadas, deste mosquito, ocorrem das 10 às 15 horas.



5- Abordagens Citogenéticas

Em contraste com a maioria dos grupos de insetos, o número cromossômico de mosquitos culicídeos, consistindo de aproximadamente 2500 espécies, é essencialmente invariável ($2n=6$) (Mathews & Munstermann, 1994). Uma única exceção é a espécie *Chagasia bathana*, que tem quatro pares de cromossomos, ou seja, $2n=8$ (Kreutzer, 1978).

As espécies de culicídeos podem ser subdivididas em 34 gêneros, dos quais *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* são os mais importantes, devido à sua capacidade vetorial (Motara, 1982a). O cariótipo de *Ae. aegypti*, assim como o de todos os culicídeos, consiste de 3 pares de cromossomos ($2n=6$). Estes cromossomos foram inicialmente numerados em ordem ascendente de tamanho, o menor como I, o mediano II e o maior III (Rai, 1963). Um novo sistema de numeração foi proposto posteriormente, no qual o menor é metacêntrico, denominado 1 e representa o par sexual. O cromossomo 2 é o maior e é também metacêntrico, o 3 é o intermediário, levemente submetacêntrico (McDonald & Rai, 1970) e portador de uma constrição secundária, no terço distal do braço longo (Akstein's, 1962 apud Rai, 1967). Estes cromossomos, como os de outros dípteros, exibem pareamento somático, que é um fenômeno no qual existe íntima associação entre os cromossomos homólogos durante as divisões mitóticas. Esta atração entre os homólogos modifica o padrão de mitose e meiose e tem levado muitos pesquisadores a questionar a existência dos estágios de leptóteno e zigóteno em mosquitos (Breland, 1961; Mescher & Rai, 1966; Mukherjee & Rees, 1970; Bhalla, 1971; Bianchi *et al.*, 1972a). Em microscopia eletrônica, Wandall & Svendsen (1985) utilizaram o termo pré-paquítenu para descrever o estágio transitório entre o pareamento somático e pareamento meiótico. Motara *et al.* (1985) utilizando microscopia de luz denominaram este estágio transitório, leptóteno/zigóteno, em cromossomos de testículo de *Ae. aegypti*. No entanto, Lima-Catelani & Bicudo (1994) observaram todos os estágios da prófase I, que caracteriza a divisão meiótica. O pareamento

somático nos 3 pares é íntimo durante a prófase, exceto próximo ao centrômero de um dos cromossomos maiores (provavelmente o 3) em alguns núcleos (Rai, 1963).

A distribuição dos cromossomos politênicos foi estabelecida, para tecidos de *Ae. aegypti*, por Gillham (1957). Na larva de último estágio, estes cromossomos foram encontrados primariamente no epitélio alimentar, incluindo as glândulas salivares, os cecos gástricos, estômago, túbulos de Malpighi, reto e papila anal. Na pupa, foram encontrados somente nos túbulos de Malpighi. No adulto, a politenia foi visível apenas nos túbulos de Malpighi de fêmeas. Tentativas foram feitas para se analisar os cromossomos politênicos de *Ae. aegypti*. Estes cromossomos foram estudados na glândula salivar de *Ae. aegypti*, porém não foi possível seguir o padrão de bandamento ao longo de braços cromossômicos individuais, devido a sua interrupção por vários pontos de quebra (Sutton, 1942). Devido à dificuldade de espalhamento, pouco se pode observar da estrutura destes. Outras descrições de cromossomos politênicos presentes na glândula salivar de *Ae. aegypti* foram feitas e as mesmas dificuldades técnicas foram encontradas (Sharma *et al.*, 1979 apud Sharma *et al.*, 1986). Na ausência de boas preparações de cromossomos politênicos em *Aedes*, mapas de sítios alvos de enzimas de restrição têm se mostrado especialmente úteis para estudos de evolução cariotípica (Matthews & Munstermann, 1994; Munstermann & Craig, 1979).

Muitos trabalhos têm sido realizados com *Ae. aegypti*, pois além de sua importância como vetor de doenças, tem um baixo número cromossômico, é fácil de ser mantido e manipulado em laboratório, tem uma rica fonte de variabilidade genética e tem distribuição mundial, o que o torna bastante apropriado para estudos genéticos.

O cariótipo da maioria das espécies de *Aedes* é tão similar, que não pode ser utilizado para distinguir espécies. A técnica de bandamento C tornou possível o estudo da diferenciação linear dos cromossomos e assim identificar diferenças cariotípicas entre espécies, tendo sua primeira aplicação em cromossomos de *Aedes* por Newton *et al.* (1974), possibilitando a distinção entre machos e fêmeas, até então não realizada. Desde então, técnicas apropriadas para revelar bandas C em *Ae.*



aegypti e outras espécies de mosquitos têm sido utilizadas (Newton *et al.*, 1974; Motara, 1982b; Motara & Rai, 1977, 1978; Rao & Rai, 1987a).

A técnica de bandamento C mostrou-se útil, também, como marcador citológico, ou seja, foi utilizada para definir com um grau de precisão maior, do que era possível até então, as posições relativas dos loci D (gene *Distorter*) (Newton *et al.*, 1978).

O padrão de bandas C observado no gênero *Aedes* sugere que a especiação nesse grupo pode ter envolvido rearranjos cromossômicos e mudanças na quantidade e distribuição da heterocromatina (Rai, 1980).

As diferenças na quantidade e posição de bandas C, rearranjos cromossômicos e quantidade de DNA nuclear foram utilizadas por Rao & Rai (1987b, 1990) para determinar as relações evolutivas entre mosquitos e espécies relacionadas. Mudanças numéricas parecem não ter sido importantes na evolução dos cromossomos de mosquitos, e por causa da similaridade morfológica de seus cromossomos, parece que mudanças estruturais desempenharam pouco ou nenhum papel na evolução cariotípica de mosquitos. Devido a este fato, estes mesmos autores têm comparado mapas de ligação de enzimas, com o objetivo de identificar os tipos de mudanças cromossômicas que ocorreram na evolução dos mosquitos e também em relação com outros dípteros e encontraram que os cromossomos de *Aedes* foram modificados por inversões, na maioria paracêntricas e por translocações, na maioria Robertsonianas (Matthews & Munstermann, 1994).

O íntimo pareamento somático que ocorre entre os cromossomos homólogos, nas células somáticas e germinativas, fornece uma poderosa ferramenta para o estudo de aberrações cromossômicas (Rai, 1963). Consideráveis esforços têm sido dispendidos no estudo da resposta dos cromossomos de *Ae. aegypti* à irradiação e a agentes químicos esterilizantes. Entre as aberrações induzidas por raio X, nas células somáticas, estão as deleções, quebras, recombinação, cromossomos em anel, dicêntricos e pontes na anáfase (Rai, 1967). Os tratamentos com agentes químicos para induzir esterilidade em insetos, são às vezes mais apropriados do que a irradiação, por causarem menos danos a estes organismos (White, 1966).

Estudos citogenéticos realizados anteriormente na população de *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto revelaram uma grande quantidade de anomalias cromossômicas, incluindo “gaps”, pontes na anáfase, quebras, fragmentos, pequenos cromossomos adicionais e poliploidia. A presença dessas aberrações foram atribuídas ao uso de inseticidas no controle do mosquito vetor da dengue (Lima-Catelani & Bicudo, 1994).

6- Objetivos DAS AMOSTRAS

Como uma forma de contribuição ao conhecimento da biologia de *Ae. aegypti*, foram estudados, no presente trabalho, aspectos citogenéticos visando a auxiliar na caracterização cromossômica em alguns órgãos, abrangendo túbulos de Malpighi, gânglios cerebrais e gônadas, bem como aspectos da atividade organizadora nucleolar, abrangendo a morfologia do nucléolo e sua relação com os cromossomos. Estudamos principalmente, amostras da população de São José do Rio Preto, mas, também, mosquitos coletados na cidade de Franca, para comparação. Ambas são cidades do Estado de São Paulo, distantes cerca de 230 km. Uma das diferenças básicas destas amostras é que a cidade de São José do Rio Preto tem sido submetida a frequentes pulverizações com inseticidas visando ao controle do tamanho populacional do mosquito, devido à manifestação de casos de dengue. Franca por sua vez, não tem sido submetida ao mesmo tratamento. As duas cidades apresentam diferenças de altitude (996m para Franca e 489 para São José do Rio Preto) e, assim, a temperatura em Franca apresenta-se mais amena.

A manutenção da umidade do ar é feita colocando-se recipientes com água dentro da gaiola, onde também são colocados recipientes para oviposição. Os ovos são depositados pelas fêmeas diretamente no papel de filtro úmido que envolve o interior das paredes dos recipientes com água. Depois de algumas horas, os papéis de filtro com os ovos são retirados da gaiola e colocados para secar. Depois de secos, os ovos são contados e guardados em sacos plásticos ou colocados para

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1- ESPÉCIE UTILIZADA

A espécie utilizada neste trabalho foi *Aedes (Stegomyia) aegypti*, pertencente à família Culicidae e subfamília Culicinae.

2- ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foram analisadas amostras da população de *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto-SP e da Cidade de Franca-SP. As de São José do Rio Preto foram coletadas, nos estádios de larva e pupa, por funcionários da SUCEN, nas áreas periféricas da Cidade, em criadouros artificiais, como pneus, latas, piscinas, etc.; ou criadas no Laboratório de Vetores do IBILCE/UNESP a partir de adultos dessas amostras. A amostra da população de *Ae. aegypti* de Franca foi por nós coletada em criadouros artificiais, na Cidade.

3- MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO

Os mosquitos criados no Laboratório de Vetores, deste Instituto, têm sido mantidos à temperatura ambiente, em gaiolas de tela fina. Uma solução de água com açúcar é colocada diariamente dentro da gaiola, para a alimentação principalmente de machos. As fêmeas são alimentadas, com sangue, uma vez por semana, utilizando um camundongo, que é imobilizado em uma tela quadriculada de arame, no interior da gaiola.

A manutenção da umidade do ar é feita colocando-se recipientes com água dentro da gaiola, onde também são colocados recipientes para oviposição. Os ovos são depositados pelas fêmeas diretamente no papel de filtro úmido que envolve o interior das paredes dos recipientes com água. Depois de algumas horas, os papéis de filtro com os ovos são retirados da gaiola e colocados para secar. Depois de secos, os ovos são contados e guardados em sacos plásticos ou colocados para



eclodir em um recipiente maior com água. As larvas são alimentadas com ração (para peixe) moída e dissolvida em água, também uma vez por semana.

O material biológico coletado pela SUCEN, composto de larvas e pupas, era mantido em uma mistura de uma parte da água do material de coleta e outra parte de água de torneira do laboratório, até o preparo das lâminas. Se necessário, essas larvas também eram alimentadas com ração para peixe.

4- PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

Nas preparações citológicas foram utilizados: o conteúdo cefálico (incluindo os gânglios cerebrais), os túbulos de Malpighi e as gônadas (ovários e testículos) de larvas de 4º estágio e pupas, de fêmeas e machos. Nas preparações do conteúdo cefálico, a fase de larva de 4º estágio foi a que forneceu o maior número de células em divisão. As melhores preparações de túbulos de Malpighi e gônadas foram obtidas com pupas. As técnicas utilizadas compreenderam a coloração com orceína-lacto-acética, Feulgen (coloração específica para DNA), bandamento C (técnica de coloração específica para a heterocromatina) e impregnação com nitrato de prata (coloração marcadora de regiões organizadoras nucleolares e nucléolo).

4.1- Esmagamento e coloração com orceína-lacto-acética

As larvas e pupas foram dissecadas em solução fisiológica de Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945) e colocadas em uma lâmina contendo uma gota de ácido acético a 45%, por um minuto. Em seguida, o ácido acético foi retirado e uma gota de orceína-lacto-acética a 2% foi adicionada, por 5 minutos. A seguir foi colocada uma gota de ácido láctico a 50%, durante 8 minutos. O material foi então recoberto com uma lamínula e submetido ao esmagamento. As lâminas foram lutadas com esmalte incolor e estocadas para posterior análise.

4.2- Preparo de lâminas a serem submetidas ao bandamento C e ao nitrato de prata

Para obtermos um maior número de células em divisão, as larvas de 4º estágio e pupas foram tratadas com solução de colchicina a 0,025% por 4 horas, antes da dissecação (French *et al.*, 1962).

O material foi dissecado em solução de citrato de sódio a 1% e transferido para uma gota de ácido acético a 45%, por 1 minuto, em seguida retirou-se o ácido acético e acrescentou-se ácido láctico a 50% por 10 minutos. Após retirado o ácido láctico adicionou-se uma gota de ácido acético sobre o material e submeteu-se ao esmagamento. As lâminas, assim preparadas, foram colocadas em câmara úmida por 20 minutos e logo após esse intervalo as lamínulas foram retiradas com o auxílio do nitrogênio líquido. As lâminas foram, então, secas à temperatura ambiente e guardadas no freezer, para posterior coloração.

4.3- Bandamento C

As lâminas previamente preparadas por esmagamento, como foi descrito anteriormente, foram retiradas do freezer e colocadas para secar à temperatura ambiente.

A técnica de bandamento C utilizada foi a de Sumner (1972), com algumas modificações. Por essa técnica, adiciona-se solução de hidróxido de bário a 5% sobre o material, nas lâminas, cobre-se com uma lamínula e colocam-se as lâminas sob a ação do vapor de banho-maria a 60°C, por 6 minutos, mantendo-as suspensas sobre esse equipamento com o auxílio de duas varetas de madeira. Em seguida as lamínulas são retiradas mergulhando-se as lâminas em um borel contendo 100ml de água desionizada gelada e 3ml de ácido acético. Feito isto, as lâminas são incubadas em solução salina (2xSSC), durante 1 hora, a 60°C.

Posteriormente, as lâminas são submetidas a 2 banhos em álcool 70% e dois banhos em álcool 95% e, em seguida, são colocadas para secar à temperatura ambiente e então coradas com Giemsa (2%) em tampão fosfato (pH 6,8), por 20 minutos. Quando as lâminas já estão secas à temperatura ambiente, são montadas em verniz cristal para posterior análise.



4.4- Nitrato de Prata

O preparo das lâminas, por esmagamento, para a impregnação pelo nitrato de prata foi descrito anteriormente.

A impregnação pelo nitrato de prata foi feita segundo a técnica de Howell & Black (1980), abrangendo os seguintes passos:

a. preparo da solução reveladora, obtida dissolvendo-se 1g de gelatina em 50ml de água desionizada fervente e acrescentando-se 0,5ml de ácido fórmico.

b. preparo da solução de nitrato de prata, obtida pela dissolução de 1g de AgNO_3 em 2ml de água desionizada;

c. pingar uma gota da solução reveladora sobre o material na lâmina limpa e seca;

d. pingar 2 gotas da solução de nitrato de prata a 50% sobre a solução reveladora e misturá-las delicadamente;

e. cobrir com lamínula;

f. colocar as lâminas em estufa a 70°C , em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com água desionizada, por 10 minutos, após o que a mistura das soluções torna-se marrom-dourada;

g. lavar a lâmina em água desionizada e deixar secar ao ar;

h. montar a lâmina em verniz cristal.

4.5- Reação de Feulgen

Esta reação foi empregada em preparações citológicas de túbulos de Malpighi para evidenciar a presença de DNA.

O preparo das lâminas a serem submetidas à reação foi o mesmo descrito para bandas C e nitrato de prata, porém, dispensou-se o uso da colchicina e a dissecação do órgão foi feita em solução fisiológica de Demerec. A reação de Feulgen consiste das seguintes etapas:

a- hidrolizar o material em HCl 5N durante 10 minutos à temperatura ambiente;

b- lavar 3 vezes em água desionizada;

- c- tratar com reativo de Schiff por 50 minutos, à temperatura ambiente, no escuro;
- d- dar 3 banhos de 2 minutos cada, em água sulfurosa;
- e- lavar em água desionizada;
- f- desidratar em álcool 70% e 95% e montar.

5- TOTAL DE LÂMINAS ANALISADAS

Visto que o objetivo deste trabalho era analisar citologicamente alguns tecidos de *Ae. aegypti*, através das técnicas de coloração propostas, o número de indivíduos a serem analisados estava na dependência de obter boas lâminas. Assim, consta na tabela 1, o número de lâminas que foram submetidas às técnicas de coloração que apresentaram boa qualidade para análise, mas, muitas mais foram preparadas antes que obtivéssemos bons resultados e assim não temos um controle do seu número total.

6- FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio II Zeiss (doador pela FAPESP- processo número 70/562). O filme utilizado foi o Kodak TMAX 5052 100 ASA. As fotomicrografias foram copiadas em papel fotográfico Kodak Kodabrome Print RC F3. As fotos foram reveladas e ampliadas no laboratório fotográfico do Departamento de Biologia do IBILCE.

Neste trabalho, a presença de barra em uma só foto componente da montagem significa que a ampliação é a mesma para as demais fotos componentes.



III. RESULTADOS

1- TÚBULOS DE MALPIGHI

Tabela 1. Número de lâminas (indivíduos) das duas populações, analisadas pelas diferentes técnicas com bons resultados (F=fêmeas; M=machos).

		Técnicas de Coloração								
Cidade	Órgão	Nitrato de Prata		Banda C		Orceína		Feulgen	Total	
		F	M	F	M	F	M			
S.J.R.P.	Região cefálica	39	12	31	36	-	-	-	118	
	Túb. de Malpighi	13	17	23	12	15	10	10	100	
	Ovário	22		22		10		-	54	
	Testículo		23		36		-	-	59	
	Total	74	52	76	84	25	10	10	331	
Franca	Região cefálica	6	4	8	14				32	
	Ovário	-		1					1	
	Testículo		2		10				12	
	Total	6	6	9	24				45	
	Total geral								376	

1.1- Coloração com Orceína-Lacto-Acética

A figura 1A mostra um segmento de túbulo de Malpighi com os dois tipos de células, primárias e estreladas, em preparações coradas com orceína-lacto-acética. A figura 1B mostra a faixa de pequenas células, na região de confluência entre os túbulos de Malpighi e o canal alimentar.

III. RESULTADOS

1- TÚBULOS DE MALPIGHI

Em *Ae. aegypti* há cinco túbulos de Malpighi que se abrem no canal alimentar, atrás do estômago. A partir desta posição eles se dirigem para a frente, usualmente para o 5° ou 6° segmento abdominal e então reverterem sua direção, terminando em fundo cego perto da região posterior do abdome. Há dois tipos de células formando suas paredes, denominadas células primárias e estreladas ("stellate") que diferem em tamanho e ultraestrutura (Berridge & Oschman, 1969 apud Mathew & Rai, 1976). No local onde os túbulos de Malpighi se abrem no tubo digestivo é encontrado o anel imaginal posterior, uma faixa de pequenas células, empacotadas, bem próximas umas das outras, indiferenciadas, que se tornam ativas na metamorfose (Clements, 1992).

Os túbulos de Malpighi, nos insetos, possuem como principais funções, a excreção e a regulação iônica e osmótica. Em *Ae. aegypti*, as células primárias ou principais são responsáveis pela secreção de urina primária, que contém Na, K e Cl, no lúmen dos túbulos de Malpighi; e as células estreladas seriam sítios de reabsorção de íons sódio e água (Berridge & Oschman, 1969 apud Mathew & Rai, 1976).

No presente trabalho, os túbulos de Malpighi de larvas e pupas foram submetidos às técnicas de coloração com orceína-lacto-acética, Feulgen, bandas C e nitrato de prata. As observações realizadas são descritas a seguir.

1.1- Coloração com Orceína-Lacto-Acética

A figura 1A mostra um segmento de túbulo de Malpighi com os dois tipos de células, primárias e estreladas, em preparações coradas com orceína-lacto-acética. A figura 1B mostra a faixa de pequenas células, na região de confluência entre os túbulos de Malpighi e o canal alimentar.



Figura 1A-B. A- Trecho de túbulo de Malpighi de pupa mostrando células primárias (seta) e células estreladas (ponta de seta). B- Região de confluência entre os túbulos de Malpighi (TM) e o canal alimentar, mostrando o empacotamento de pequenas células indiferenciadas (CI). Coloração com orceína-lacto-acética. (barra=50µm).

Na tentativa de isolar os túbulos de Malpighi intactos para melhor análise da sua morfologia observou-se que os túbulos de machos são mais delgados e mais frágeis. A observação das lâminas, ao microscópio, sugeriu que o tamanho dos núcleos das células dos túbulos de Malpighi difere entre fêmeas e machos (Fig. 2).

A figura 3 mostra células primárias de túbulos de Malpighi em preparações coradas com orceína-lacto-acética. Observa-se que esses núcleos variam bastante em tamanho e organização da cromatina. De acordo com nossas observações, os núcleos das células primárias possuem cromossomos politênicos que apresentam estruturas variáveis. Em 3A a cromatina mostra uma granulação mais fina, enquanto em 3B, C, D ela se apresenta sob a forma de massas. Na figura 3E, F, os núcleos foram analisados em contraste de fase, e é possível ver alguns segmentos cromossômicos bandados. Outra observação possível nestas células é a presença de um grande "vacúolo", que contém um grânulo cromatínico em seu interior e é circundado total ou parcialmente por um anel de cromatina (Fig. 3A-C). Este vacúolo deve corresponder ao nucléolo. Além dele podem aparecer outros, sem a granulação interior e sem a cromatina circundante (Fig. 3C-D). Infelizmente não conseguimos obter um bom espalhamento dos cromossomos desses núcleos, para uma melhor análise.

Um aspecto que deve ser destacado é o de que núcleos de tamanhos diferentes podem mostrar o mesmo padrão de organização da cromatina (Fig. 3C-D; E-F). Da mesma maneira, núcleos de tamanhos semelhantes podem diferir na organização da cromatina (Fig. 3A, E). Isto parece indicar que o tamanho do núcleo não está relacionado com a organização da cromatina.

1.2- Coloração com Feulgen

A figura 4 apresenta núcleos de células primárias e células estreladas corados com Feulgen. Essa técnica de coloração é específica para o DNA. Observa-se uma confirmação das observações realizadas em preparações coradas com orceína-lacto-acética, quanto ao tamanho dos núcleos e a organização da cromatina nas células primárias. No que se refere às células estreladas, vistas na figura 4A, C, a literatura não menciona o tipo de cromossomo que as mesmas contém. Nossas observações



Figura 2A-B. Túbulos de Malpighi de fêmea (A) e macho (B), corados com orceína-lacto-acética. Observar a diferença na espessura dos túbulos e no tamanho dos núcleos. (barra=100 μ m)

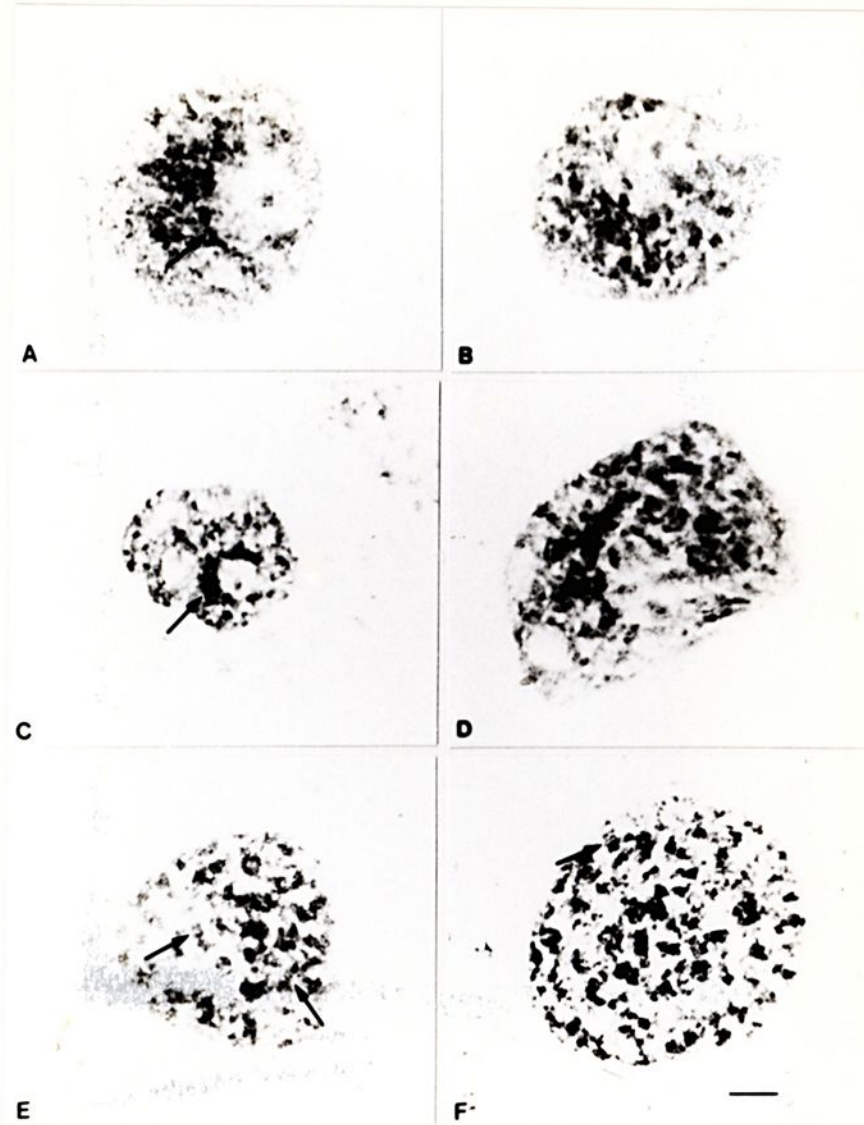
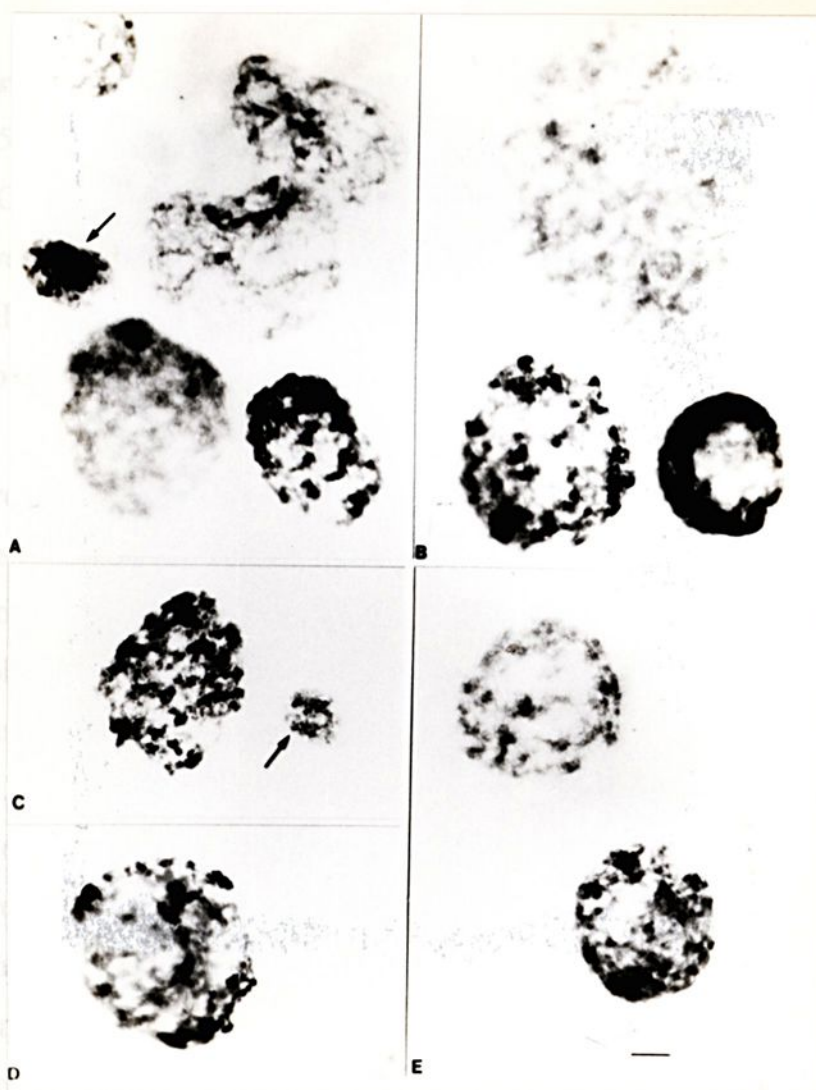


Figura 3A-F. Núcleos de células primárias do túbulos de Malpighi de larva (4º estágio). Em A e C, as setas apontam a cromatina que circunda o provável nucléolo. Em E e F as setas apontam segmentos cromossômicos bandados. Coloração com orceína-lacto-acética. (barra=10 μ m)



Na figura 7A, B são observados dois núcleos de células estreladas, além de

Figura 4A-E. Núcleos de células primárias e estreladas dos túbulos de Malpighi em preparações coradas com Feulgen. Observa-se variação de tamanho e organização do DNA nas células primárias e estreladas (setas em A e C). (barra=10 μ m)

mostram que elas contêm a cromatina organizada sob a forma de grânulos grandes, semelhantes aos observados nas células primárias.

1.3- Coloração pela Técnica de Bandamento C

A figura 5 mostra preparações de túbulos de Malpighi corados pela técnica de bandamento C. São observadas células primárias com graus de condensação da cromatina variáveis e tamanhos nucleares também variados. É visualizado também um núcleo de célula estrelada (Fig. 5A). Ambos os tipos de células apresentam um único corpúsculo cromatínico intensamente corado, isto é, C-positivo.

1.4- Impregnação pelo Nitrato de Prata

As figuras 6 e 7 apresentam núcleos de túbulos de Malpighi corados pela técnica de nitrato de prata. Tanto as células primárias quanto as estreladas mostram um único nucléolo. Nos núcleos das células primárias o nucléolo é bastante grande; em algumas células chega a ocupar a maior parte da área do núcleo. Observa-se também que sua estrutura é variável, em geral acompanhando o grau de compactação da cromatina. Por exemplo, na figura 6A, B, C o nucléolo é compacto e a cromatina é relativamente compacta também. Já na figura 6D, E a estrutura tanto do nucléolo quanto da cromatina é menos densa. O “desmembramento” do nucléolo é maior na figura 6F, onde também a cromatina se encontra mais aberta, isto é, os filamentos cromossômicos aparecem mais condensados.

Na figura 7A, B são observados dois núcleos de células estreladas, além de dois núcleos de células primárias. De modo semelhante ao que acontece nas células primárias, a organização do nucléolo nas células estreladas acompanha o grau de organização da cromatina. Na figura 7A ele apresenta uma forma regular, ovalada e uma estrutura mais densa, enquanto na figura 7B o nucléolo mostra-se irregular e a cromatina mais aberta.

Além disso, nos núcleos de células primárias (setas espessas em A-E) e estrelada (seta fina em A), (barra=10µm)

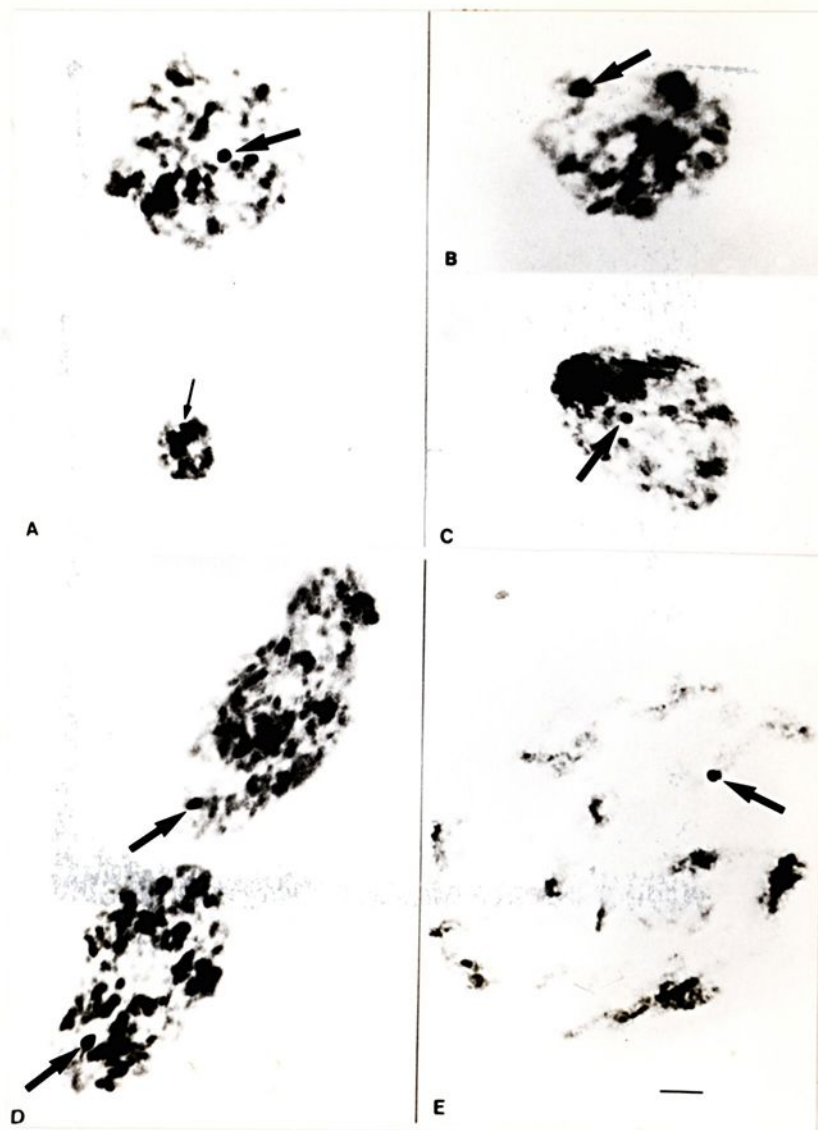


Figura 5A-E. Núcleos de células de túbulos de Malpighi coradas pela técnica de bandas C. Observa-se um único grânulo de cromatina corado diferencialmente nos núcleos de células primárias (setas espessas em A-E) e estrelada (seta fina em A). (barra=10 μ m)

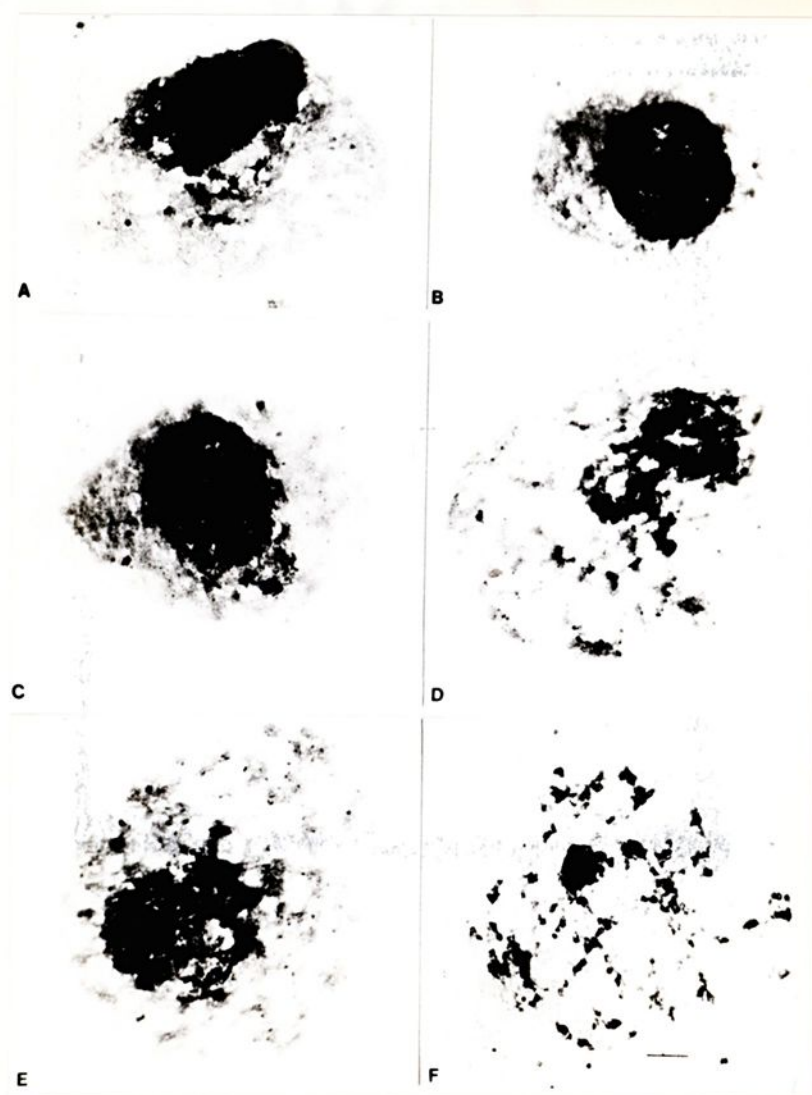


Figura 7A-D. Núcleos de células primárias e estradas dos túbulos de Malpighi corados com nitrato de prata. Observar que as células estradas

Figura 6A-F. Núcleos de células primárias dos túbulos de Malpighi corados com nitrato de prata. Observar o grande tamanho dos nucléolos, a variação de sua condensação e a variação de organização da cromatina. (barra=10 μ m)

2- CÉLULAS DA REGIÃO CEFÁLICA

Originalmente
porém, a dificuldade
analisar todo o cont

2.3- Coloração

Conforme f
múltiplas foi utiliz

(L-J) e papa, sendo
contido abrange

podemos determin
certeira, aos gâmbis

Neste mater
correspondendo as
Preto e Franca.

A figura 8-9
de divisão. Nas
frequentemente pr

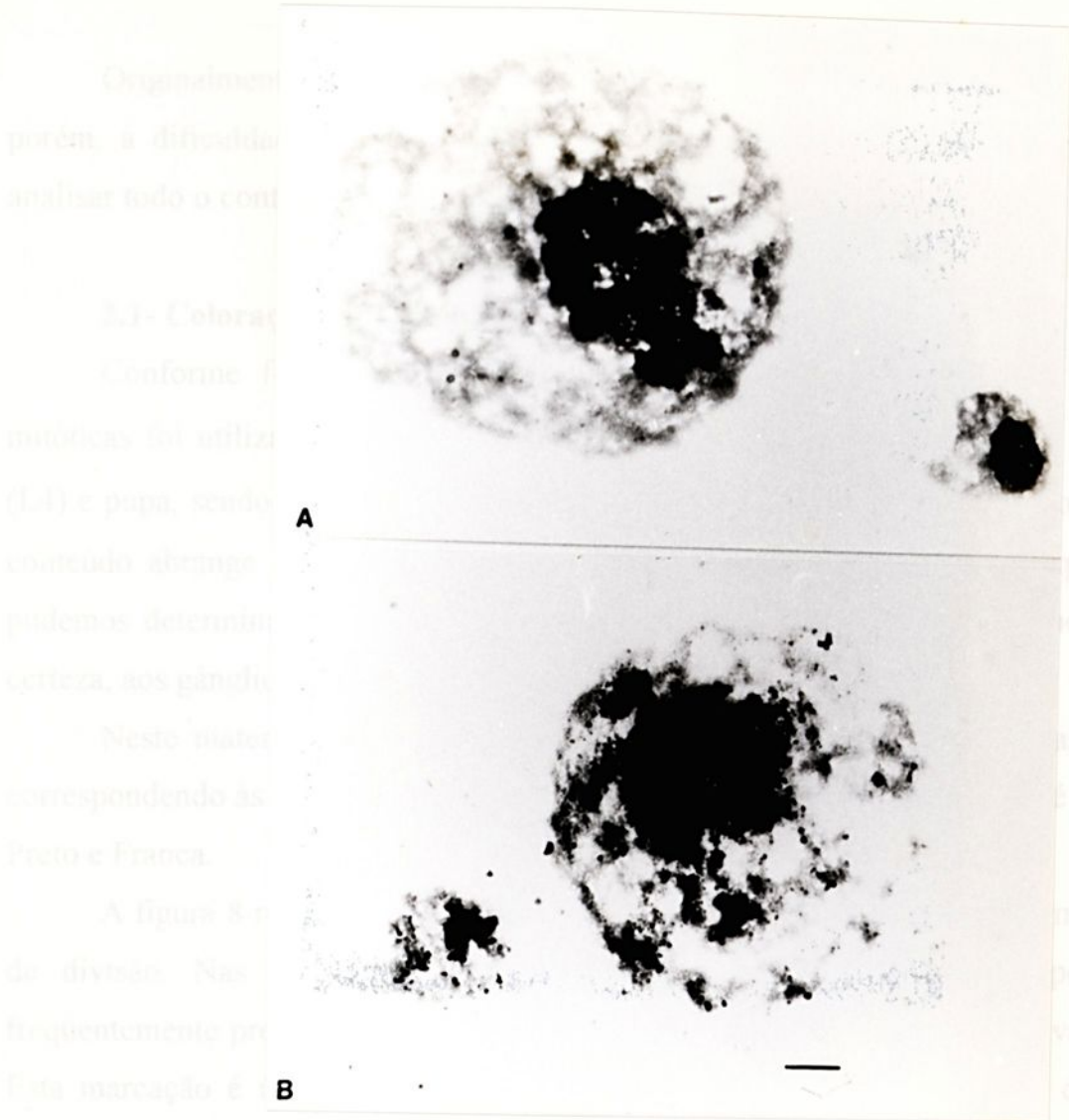
Esta marcação é

provavelmente corresponde às bandas intercalares, associadas, dos cromossomos
sexuais. Quando o indivíduo possui bandas intercalares heterozigotas no par sexual,

Figura 7A-B. Núcleos de células primárias e estreladas dos túbulos de Malpighi
corados com nitrato de prata. Observar que as células estreladas
também apresentam variação morfológica do nucléolo, acompanhando
a organização da cromatina. (barra=10µm)

intercalares
metafásicos e três marcações mais fracas que devem corresponder às marcações
centroméricas (Fig. 8 C). Em outras células em início de divisão, pode-se observar 1
ou 2 marcações (Fig. 8 D, E)

Nas células em divisão, dos mosquitos tanto de São José do Rio Preto como



2- CÉLULAS DA REGIÃO CEFÁLICA

Originalmente, pretendia-se analisar os gânglios cerebrais apenas. Dada, porém, a dificuldade de se isolar os gânglios nas larvas e pupas, optou-se por analisar todo o conteúdo da região cefálica.

2.1- Coloração pela Técnica de Bandamento C

Conforme foi descrito em Materiais e Métodos, no estudo das células mitóticas foi utilizado todo o conteúdo da região cefálica de larvas de 4º estágio (L4) e pupa, sendo a fase de 4º estágio a que fornece os melhores resultados. Esse conteúdo abrange células de tamanhos diferentes pertencentes a tecidos que não pudemos determinar quais são, com segurança. Parte delas, porém, pertence com certeza, aos gânglios cerebrais.

Neste material foram obtidos os resultados apresentados nas figuras 8-17, correspondendo às observações feitas em indivíduos procedentes de São José do Rio Preto e Franca.

A figura 8 refere-se, predominantemente, às células interfásicas ou em início de divisão. Nas duas populações analisadas, ocorre um grânulo C-positivo, freqüentemente presente no interior de uma região clara, semelhante a um vacúolo. Esta marcação é única na maioria dos núcleos, mas, pode apresentar-se dupla e provavelmente corresponde às bandas intercalares, associadas, dos cromossomos sexuais. Quando o indivíduo possui bandas intercalares heterozigotas no par sexual, pode-se notar a diferença de tamanho, em núcleos interfásicos, dos segmentos unidos da marcação (Fig. 8B). Nos núcleos em prófase pode-se, frequentemente, observar as duas marcações bem evidenciadas que devem corresponder às bandas intercalares do par sexual, que se tornarão bem visíveis nos cromossomos metafásicos e três marcações mais fracas que devem corresponder às marcações centroméricas (Fig. 8 C). Em outras células em início de divisão pode-se observar 1 ou 2 marcações (Fig. 8 D, E)

Nas células em divisão, dos mosquitos tanto de São José do Rio Preto como



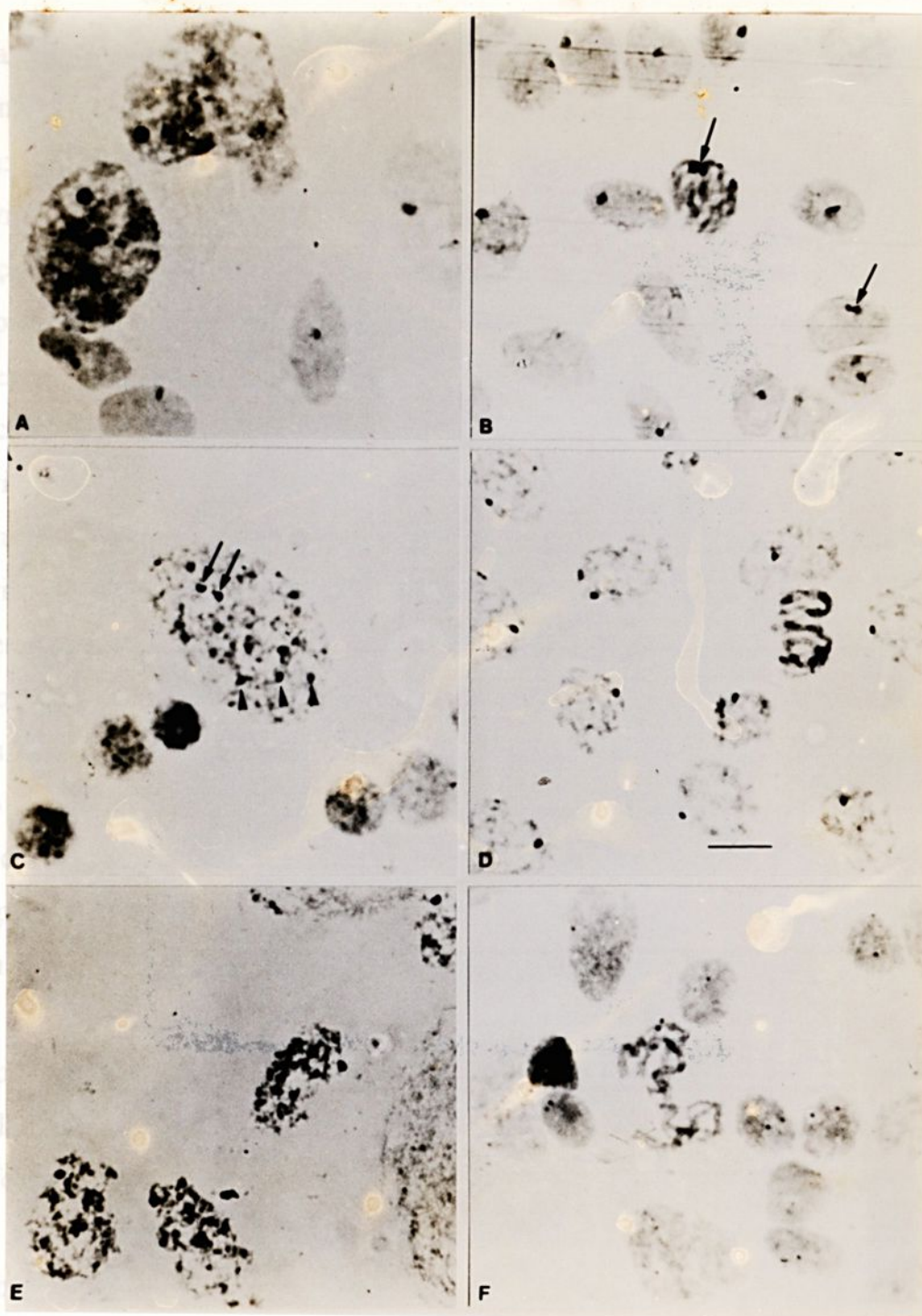


Figura 8A-F. Bandas C. Células da região cefálica. A-D. *Ae. aegypti* de Franca; B,C,E,F. *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. A. Dois tipos de células interfásicas apresentando uma única marcação; B. algumas marcações duplas, acompanhando pelo tamanho, a heterozigose das bandas intersticiais dos cromossomos sexuais (seta); C. cinco marcações em uma célula em início de prófase, correspondendo às bandas intersticiais (setas) e centroméricas (pontas de seta); D, E. células em início de divisão, com marcação única, bem destacada ou com pequenas marcações adicionais; F. células interfásicas com uma ou duas marcações pequenas. Em A, B, C, F pode-se observar um halo claro em torno das marcações. (barra=10µm)

de Franca, foram observadas bandas centroméricas nos cromossomos X, 2 e 3, apresentando geralmente a intensidade de coloração ou tamanho na seguinte sequência: $X > 3 > 2$ (Figs. 9 e 10). O cromossomo X apresenta, além da banda centromérica, uma banda intercalar, em um dos braços, de espessura e intensidade de coloração variáveis entre os indivíduos, havendo assim, fêmeas homozigotas ou heterozigotas para essa banda, quanto à morfologia. Isto foi observado nas duas populações analisadas (Figs. 9B e 10B,E).

O cromossomo Y, na população de São José do Rio Preto, apresenta banda centromérica de coloração geralmente mais fraca que a do X (Fig. 9G) ou mais frequentemente não apresenta essa banda. Na amostra de Franca, a marcação centromérica no Y está ausente em todos os indivíduos analisados (Fig. 10G). A banda intercalar cuja espessura é também variável, só está presente no cromossomo Y dos mosquitos de São José do Rio Preto, ocorrendo em 100% dos machos analisados (São José do Rio Preto, Fig. 9D-H; Franca, Fig. 10G-H). Assim, há na população de São José do Rio Preto, machos homozigotos ou heterozigotos quanto à espessura da banda intercalar.

Alguns indivíduos, tanto de São José do Rio Preto como de Franca, mostraram uma banda intercalar adicional no cromossomo 3 (Figs. 9B, C, H e 10A,F).

Anomalias cromossômicas foram encontradas na população de *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto, incluindo "gaps", cromossomos "satelitados", cromossomos com morfologia alterada e indivíduos que apresentavam células tetraplóides e normais e outros também, com células tetraplóides e octaplóides (Fig.11). Não foram encontradas aberrações na amostra analisada de Franca, nos tecidos da região cefálica. Em alguns indivíduos, a banda intercalar não está presente neste cromossomo, mas aparentemente, na mesma posição, ocorre uma constrição secundária nos dois membros do par. Em algumas células verificou-se a presença de uma banda C-positiva, em apenas um dos cromossomos do par, na extremidade distal da constrição (Fig. 11E).

Em B, C, H é possível observar a presença de marcação intercalar no par 3 (cores pequenas) (barra=10µm)

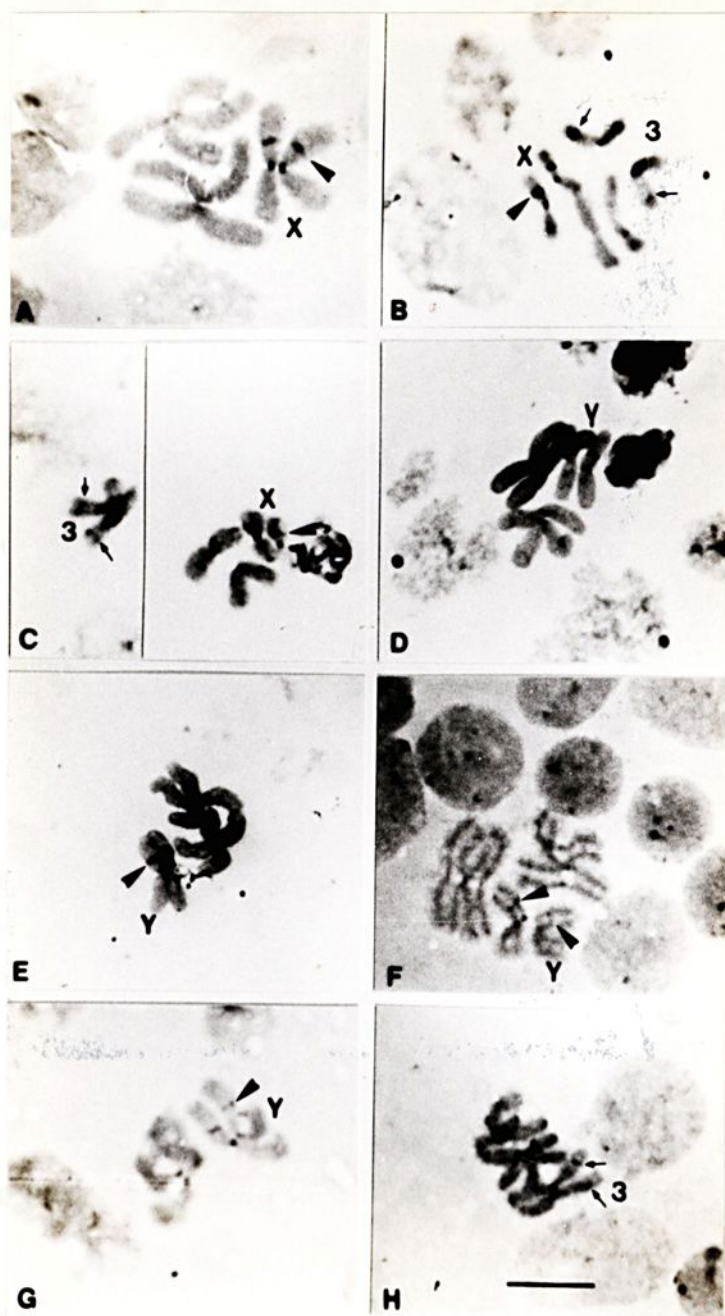


Figura 9A-H. Bandas C. Região cefálica, *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. A-C= fêmeas; D-H= machos. Observar as marcações centroméricas e a variabilidade de espessura das bandas intercalares do par sexual (pontas de seta). Em B, C, H é possível observar a presença de marcação intersticial no par 3 (setas pequenas). (barra=10 μ m)

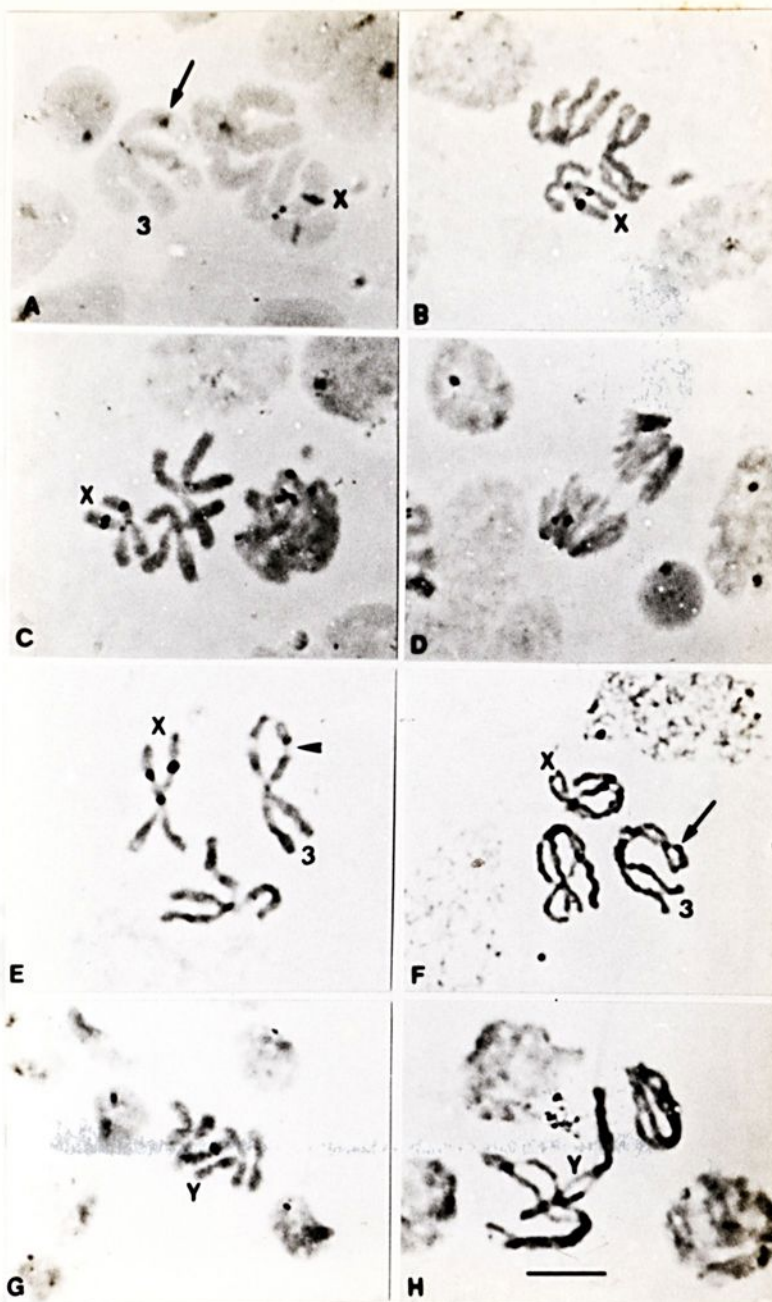


Figura 10A-H. Bandas C. Região cefálica, *Ae. aegypti* de Franca. A-F= fêmeas; G-H= machos. Observar heterozigose das bandas intercalares dos cromossomos sexuais. Nos machos, um dos cromossomos sexuais parece apresentar ausência de marcação centromérica e intercalar (cromossomo Y). Em A, F a seta indica a marcação intercalar no cromossomo 3. E. Presença de constrição secundária no cromossomo 3 e uma marcação na região distal da constrição em um dos cromossomos (ponta de seta). (barra=10 μ m)

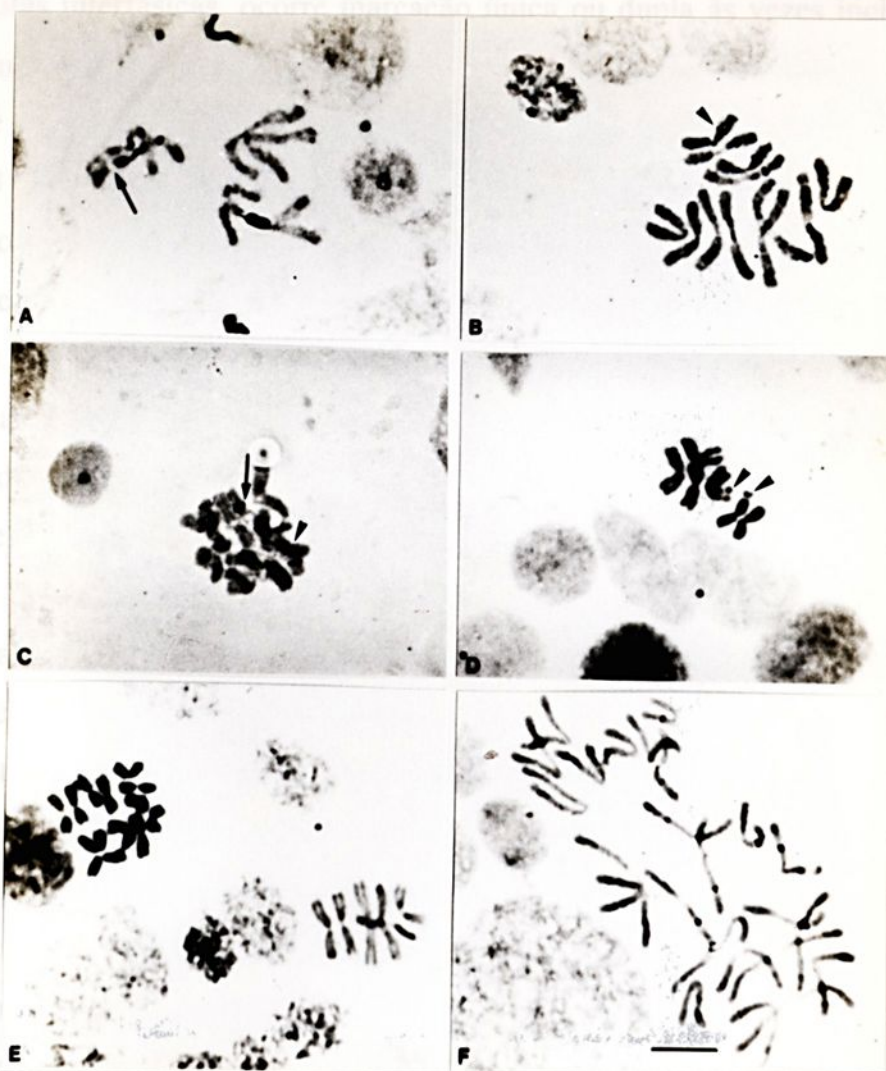


Figura 11A-F. Bandas C. Anomalias cromossômicas em células da região cefálica de *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. A. "gap" homozigoto no par sexual (seta). Observar as marcações bem evidentes, intercalares e centroméricas; B. célula tetraplóide de macho, com marcação intercalar nos 4 cromossomos sexuais (ponta de seta); C. cromossomos de macho, morfologicamente alterados, evidenciando as bandas intercalares do par sexual (seta) e do par 3 (ponta de seta); D. cromossomos "satelitados" (pontas de seta); E. células diplóide e tetraplóide de fêmea; F. célula octoplóide de macho. B, F são procedentes do mesmo indivíduo. (barra=10μm)

2.2- Impregnação pelo Nitrato de Prata

Nas células interfásicas, ocorre marcação única ou dupla às vezes incluídas em uma “vesícula” corada de tom mais claro. Um outro aspecto que podemos notar é a presença de núcleos com marcação maior e núcleos com marcação bem pequena (Figs. 12B e 13). Em geral, mas não em todos os casos, células maiores apresentam marcações maiores. Quando as células entram em prófase começam a evidenciar as 3 marcações centroméricas. Às vezes o nucléolo ainda é visível junto com estas marcações. Em seguida esta marcação nucleolar deixa de ser visível (Fig. 13). Na metáfase, as marcações na região centromérica dos cromossomos X, Y, 2 e 3 são bem evidenciadas (Fig. 14-16). Também é possível observar em uma pequena porcentagem de células, uma marcação intercalar nos dois homólogos do par sexual (Fig. 15C-E).

As figuras 16 e 17 mostram o padrão de marcação pela prata, dos três tipos principais de células observadas na região cefálica de *Ae. aegypti*: as células ganglionares interfásicas e em divisão, respectivamente com uma marcação grande ou menos freqüentemente duas, e marcações nas regiões centroméricas dos três pares; células grandes interfásicas ou em divisão, as primeiras portadoras de um nucléolo grande e as segundas com marcações nas regiões centroméricas e a presença de uma ou mais formações nucleolares, em alguns casos visivelmente associadas a um dos braços cromossômicos (Fig. 17A-B). O terceiro tipo de células presentes apresenta marcações múltiplas, de forma e tamanho variáveis.

3- OVÁRIO

Os dois ovários, em *Ae. aegypti*, estão situados dorsolateralmente na região posterior do abdomen, sendo compostos de unidades funcionais chamadas ovariolos. Os ovários são conectados, por ovidutos laterais, ao oviduto comum. No interior dos ovariolos, formam-se os folículos, nos quais amadurecem os ovócitos (Clements, 1992). Dá-se o nome de folículo à formação que engloba 1 oócito e 7 células nutritivas e é envolto por uma camada de células epiteliais que se forma quando o folículo deixa o germário. Antes de se diferenciarem, essas 8 células são

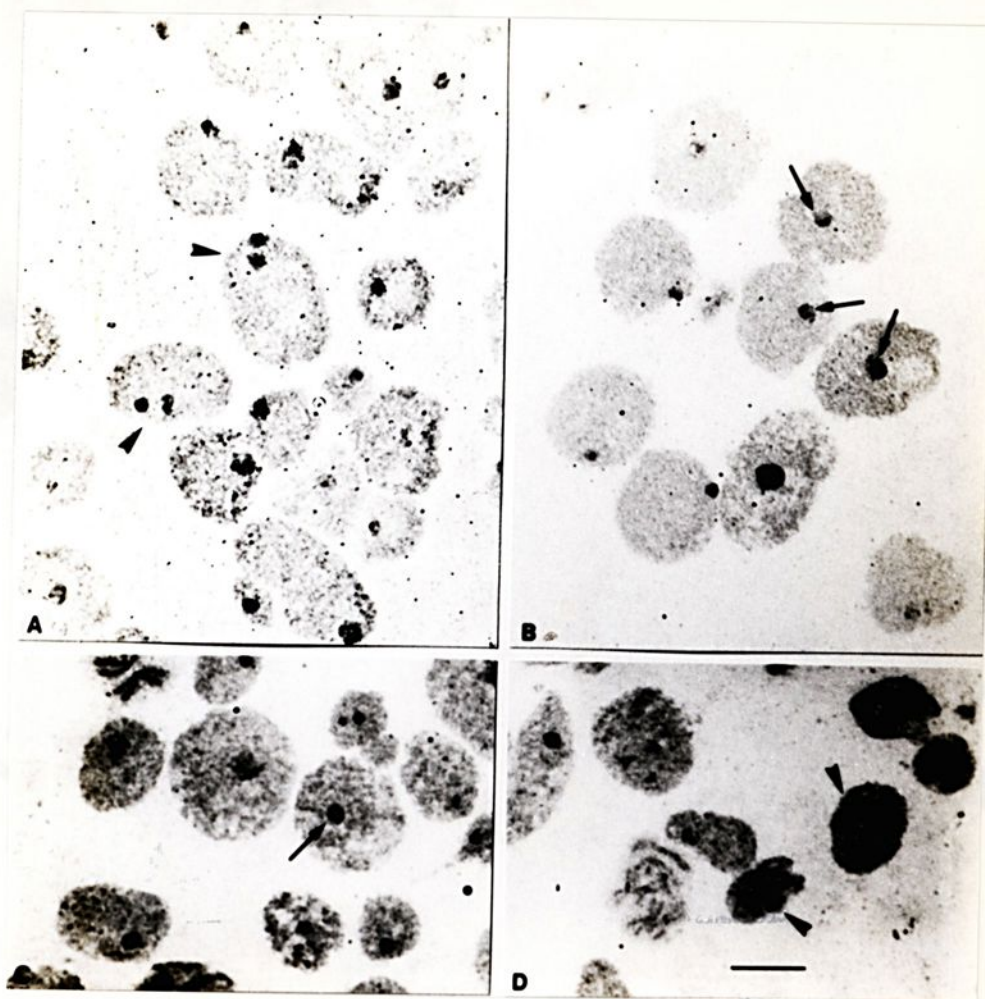


Figura 12A-D. Nitrato de Prata. Células interfásicas da região cefálica. *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. Observar a presença de células com 1 ou 2 nucléolos em A e D (pontas de seta). Em B e C é possível observar um ou dois corpúsculos mais corados no interior do nucléolo (setas). (barra=10μm)

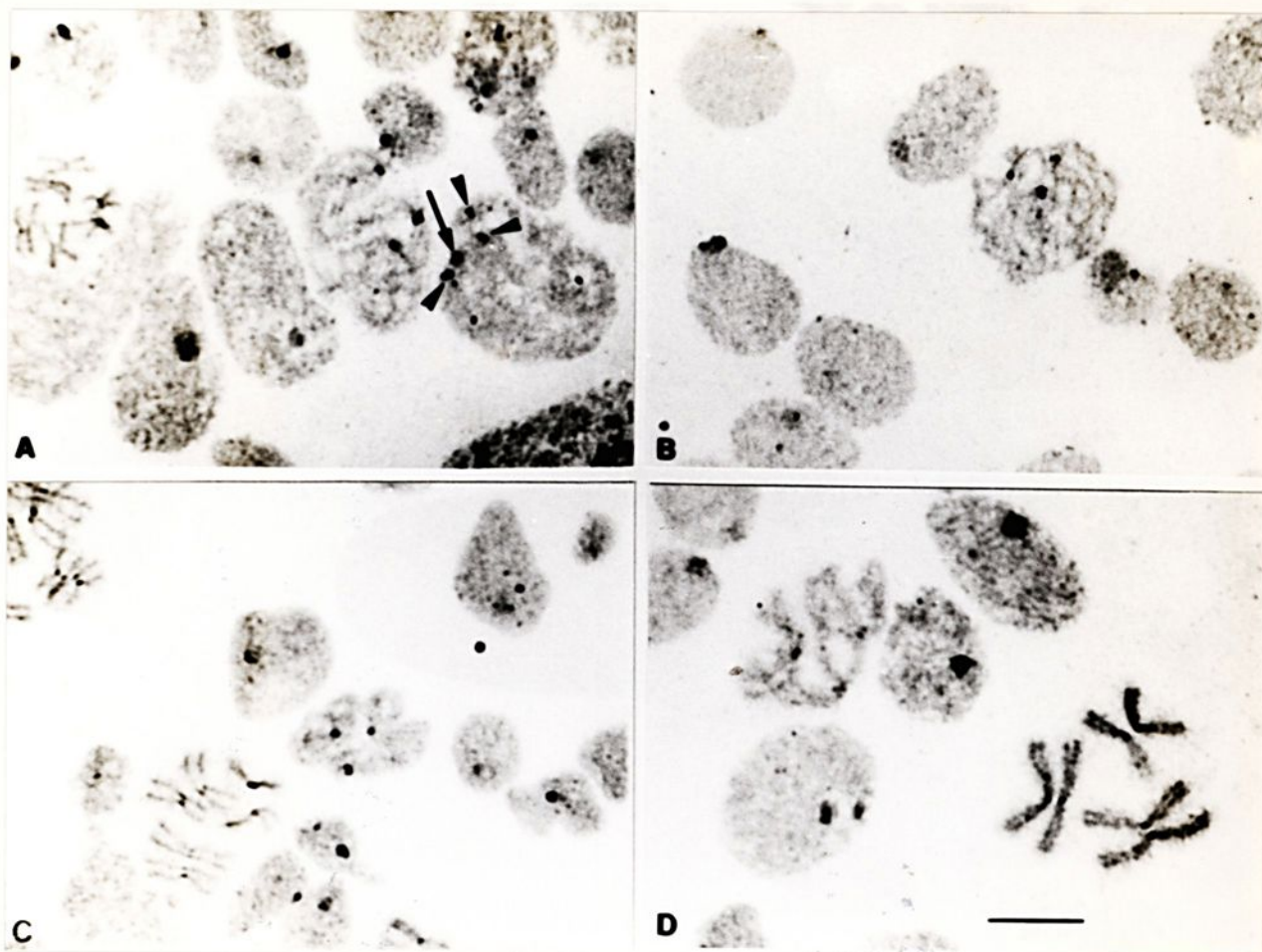


Figura 13A-D. Nitrato de Prata. Região cefálica. *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. Núcleos em prófase e metáfase com as regiões centroméricas dos 3 pares de cromossomos coradas. Os núcleos em intérfase apresentam um ou dois corpúsculos marcados. Em A é possível observar um corpúsculo nucleolar, aparentemente associado a um dos cromossomos (seta), além das 3 regiões centroméricas (pontas de seta). (barra=10 μ m)

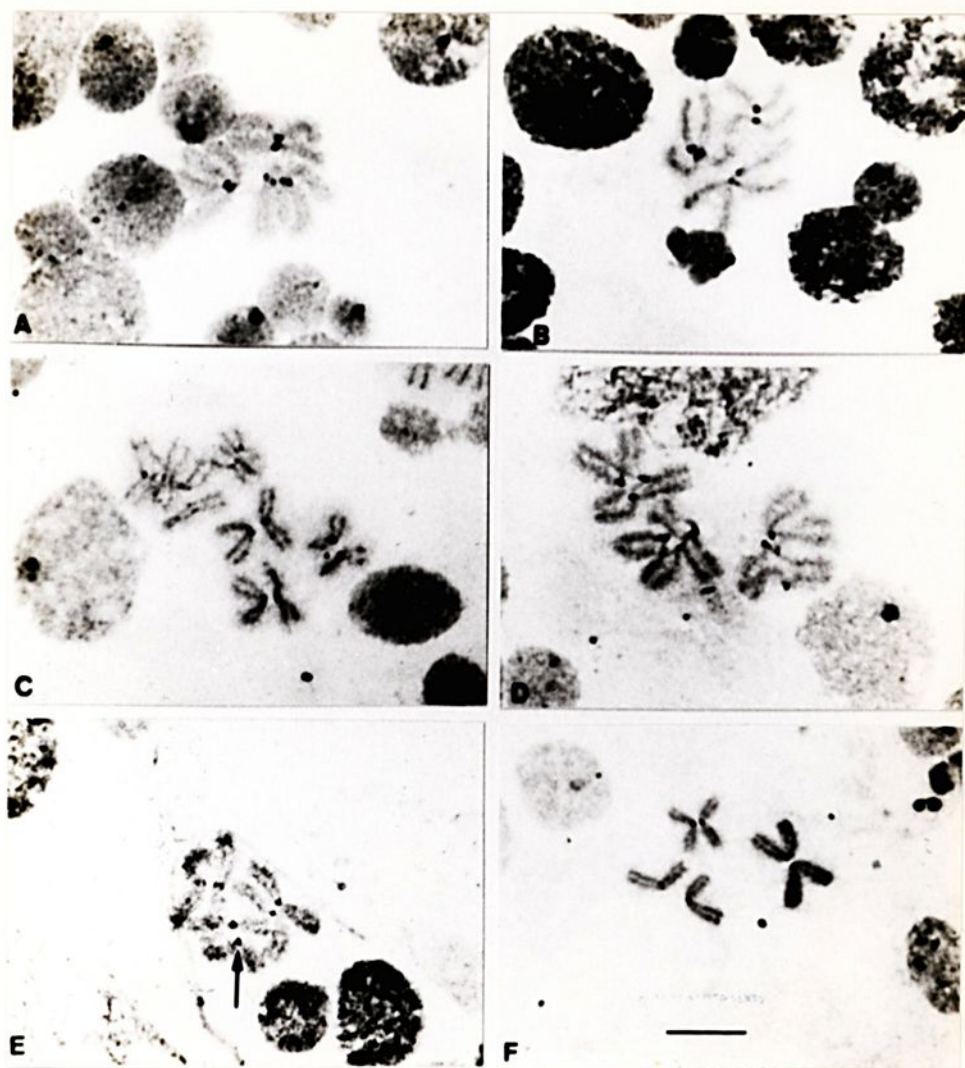


Figura 14A-F. Nitrato de Prata. *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto. Cromossomos da região cefálica, em metáfase, com as regiões centroméricas coradas. E. metáfase de macho, onde é possível observar a região centromérica corada do par sexual (seta). (barra=10 μ m)

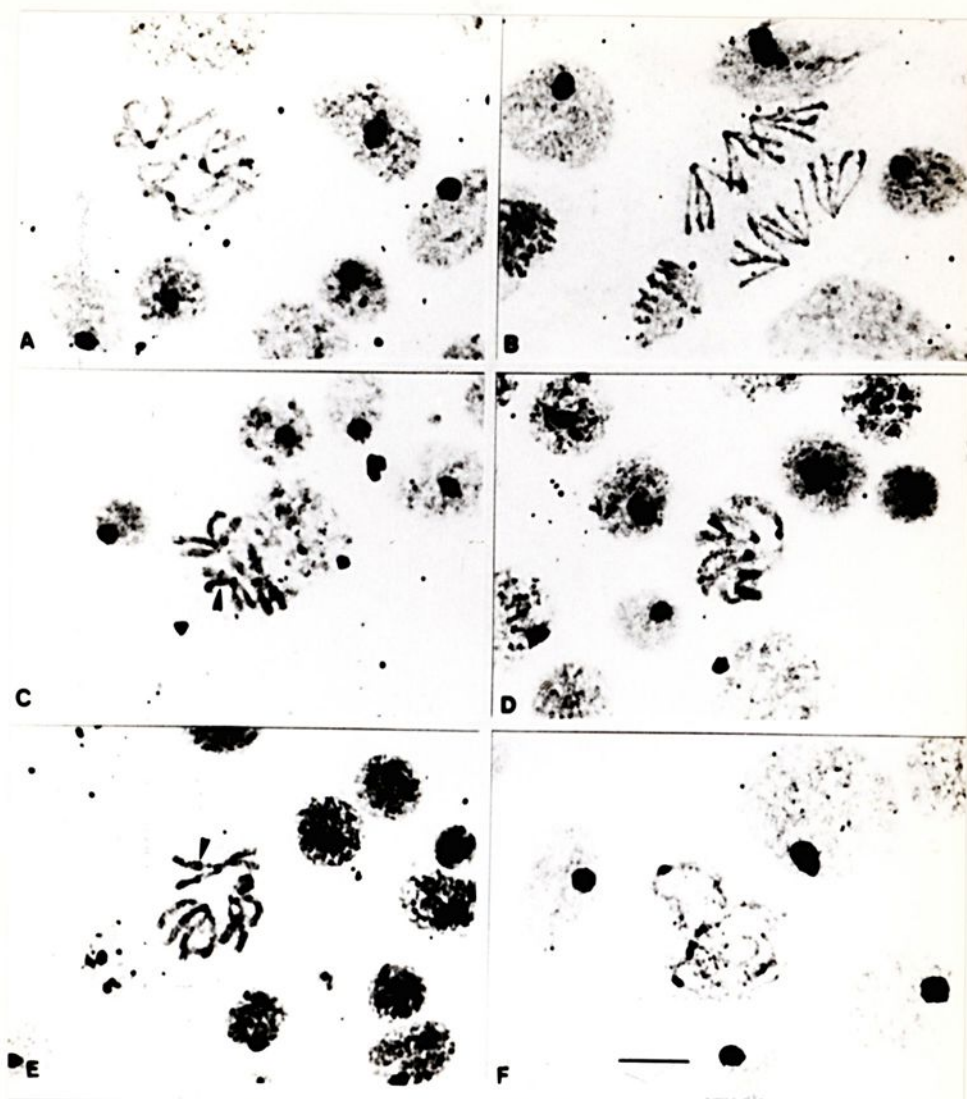


Figura 15A-F. Nitrato de Prata. *Ae. aegypti* de Franca. Células da região cefálica. F, A-B. cromossomos em pró-metáfase, metáfase e anáfase, apresentando as regiões centroméricas coradas. C-E. região intercalar marcada pela prata no cromossomo X (pontas de seta). (barra=10 μ m)

Figura 16A-F. Nitrato de Prata. *Ae. aegypti* de Franca. Células da região cefálica. A, células ganglionares nervosas e em divisão; B-F, alguns núcleos apresentam várias marcações de tamanho e intensidade variáveis; D, núcleo grande com apenas uma marcação nucleolar. (barra=10 μ m)

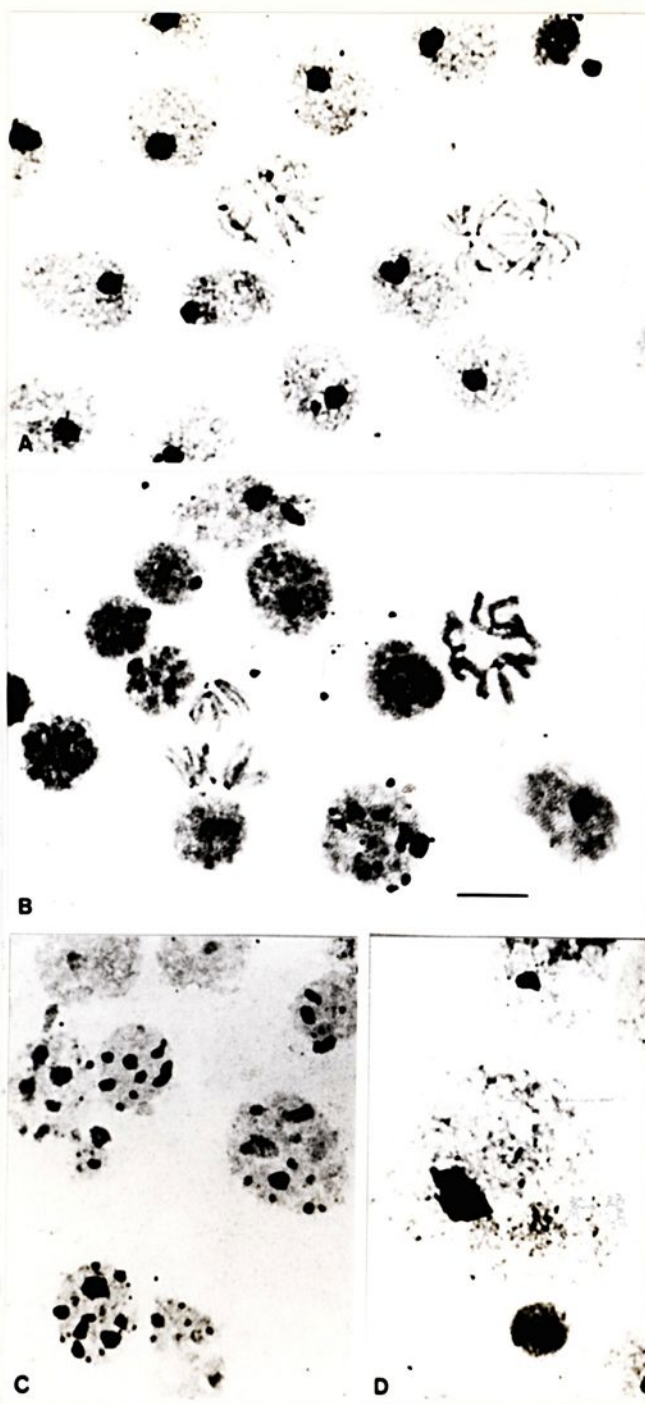


Figura 16A-D. Nitrato de Prata. *Ae. aegypti* de Franca. Padrão de marcação das principais células encontradas na região cefálica. A. células ganglionares interfásicas e em divisão; B-C. alguns núcleos apresentam várias marcações de tamanho e intensidade variáveis; D. núcleo grande com apenas uma marcação nucleolar. (barra=10 μ m)

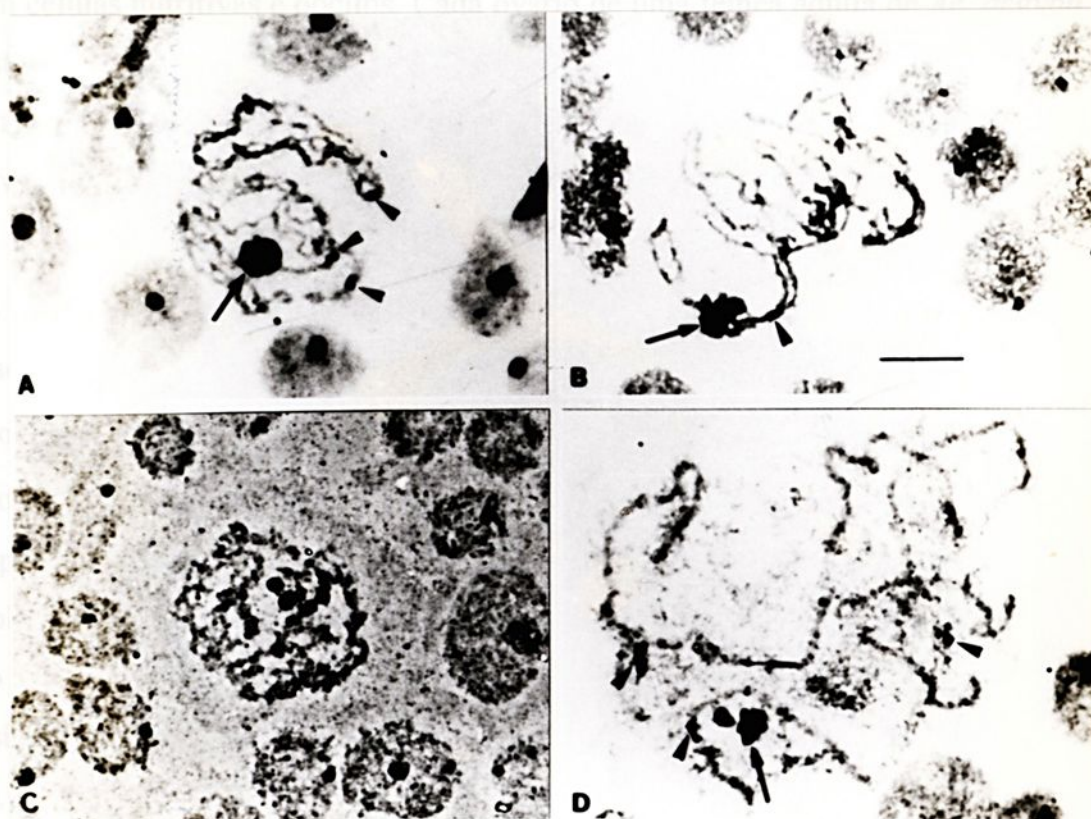


Figura 17A-D. Nitrato de Prata. A-C. *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto; D. Franca. Núcleos em prófase, encontrados na região cefálica, com um ou mais corpúsculos nucleolares. A-C. Uma marcação nucleolar associada a uma região cromossômica (setas) e marcações centroméricas (pontas de seta). (barra=10µm)

3.1- Coloração com Orceína-Lacta-Ácética

A figura 18 mostra aspectos da organização do ovário de *Ae. aegypti* na fase de pupa. Nas 18A-B pode-se observar um dos dois ovários em desenvolvimento,

chamadas cistócitos e são derivadas de 3 divisões mitóticas sucessivas de um cistoblasto. As 8 células formam um sincício interconectado por pontes citoplasmáticas através das quais as células nutritivas enviarão produtos de síntese para o oócito.

Os ovários de mosquitos são classificados como meroísticos porque eles contêm células nutritivas e oócitos. Cada ovário de uma fêmea adulta de *Ae. aegypti* consiste de cerca de 100 ovários. O desenvolvimento do folículo é dependente da alimentação com sangue, sendo que cada refeição produz uma onda de oócitos maduros (Fill, 1974).

Na fase de larva de 1º estágio, os primórdios gonadais constituem a chamada massa ovóide. Anteriormente, na massa ovóide ocorre um quepe de 4 ou 5 células chamado rudimento ovariano. O rudimento ovariano cresce durante o 2º e 3º estágios larvais, principalmente pelo aumento do número de células. Durante o 3º estágio as células do rudimento ovariano começam a se diferenciar e no 4º estágio já é possível diferenciar as células germinativas e as células intersticiais. A multiplicação celular e a diferenciação continuam até o estágio de pupa quando o ovário atinge sua forma definitiva, constituindo os grupos de ovários. Nessa fase, é possível visualizar, nos ovários, os cistócitos e as células intersticiais (Clements, 1992).

Nas fêmeas recém-emergidas, cada ovário consiste de uma zona de crescimento ou germário, situada em sua porção proximal e de um primeiro folículo constituído por um conjunto de 8 células. O germário é uma zona de tecido nucleado indiferenciado, que contém as células germinativas primordiais (Bertran, 1962).

No presente trabalho, ovários de pupas foram utilizados no preparo de lâminas por esmagamento e submetidos às técnicas de coloração com orceína, nitrato de prata e bandas C. As observações realizadas foram as que seguem.

3.1- Coloração com Orceína-Lacto-Acética

A figura 18 mostra aspectos da organização do ovário de *Ae. aegypti* na fase de pupa. Em 18A-B pode-se observar um dos dois ovários em desenvolvimento,



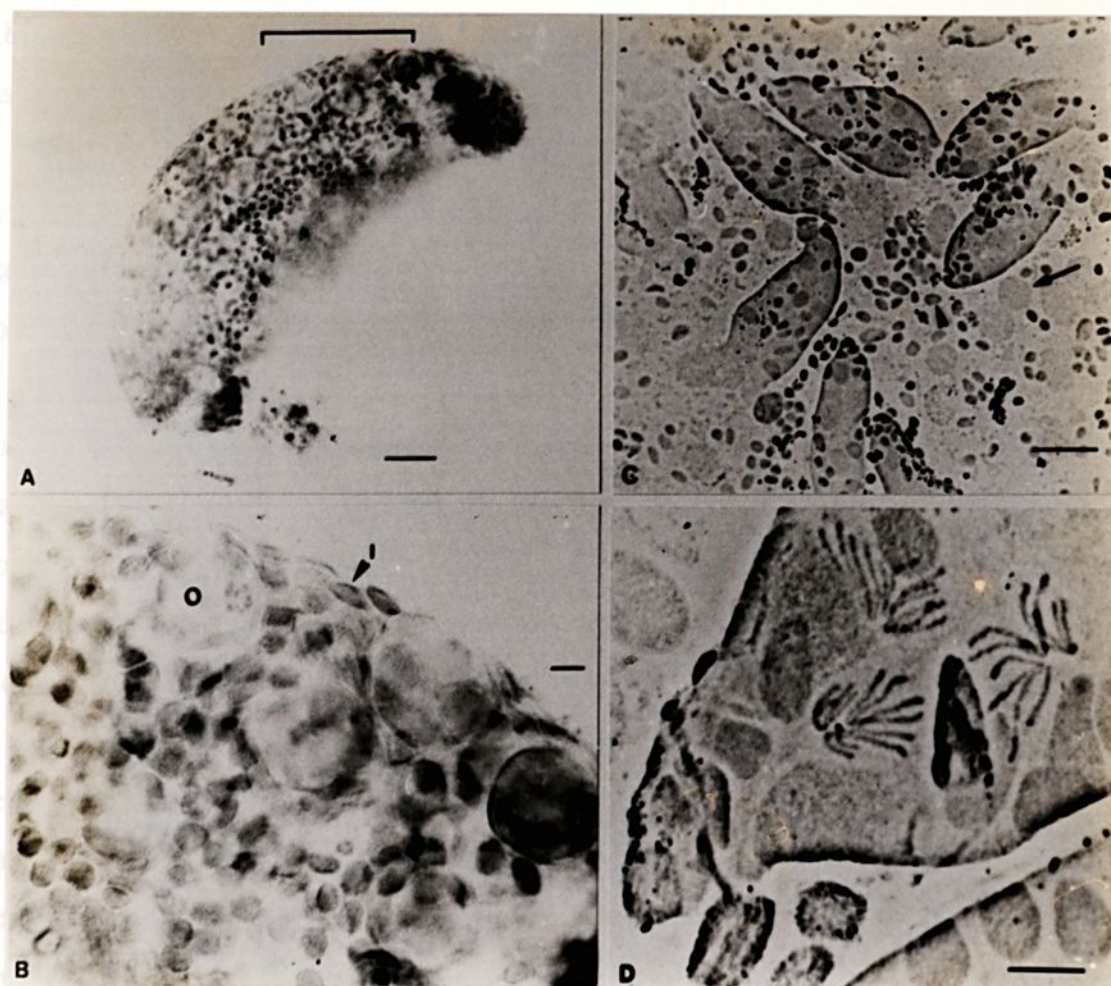


Figura 18A-D. Aspectos da organização do ovário de *Ae. aegypti* na fase de pupa.

Coloração com orceína-lacto-acética. A. Ovário completo observado em lâmina escavada; B. Detalhe de A: são visíveis os ovaríolos (o) e as células intersticiais (i); C-D. Ovaríolos observados em preparações de esmagamento: observam-se os núcleos dos cystócitos (seta) e os núcleos das células intersticiais (ponta de seta). Observam-se também células germinativas em mitose. (barra em A=100µm; em C=50µm; em B, D=10µm)

formado por ovariolos e células intersticiais e analisado em lâmina escavada. Já em 18C-D os ovários são observados em lâmina preparada por esmagamento, mostrando os núcleos grandes dos cystócitos e os pequenos das células intersticiais. Em 18D são observados cromossomos em mitose, produto da reprodução das células germinativas.

Na figura 19A-F, são apresentadas fases das divisões mitótica e meiótica. Na figura 19A-B são observadas duas metáfases mitóticas, com o pareamento característico desses cromossomos de *Aedes*, visto especialmente em 19A. Os cromossomos são em número de $2n=6$, dos quais o par 1 (sexual) é o menor; o maior é denominado par 2 e o intermediário, par 3. Em ambas as metáfases os cromossomos aparecem duplicados e a região centromérica, como uma região não corada, evidenciada principalmente nos cromossomos sexuais. Nos outros cromossomos a região centromérica geralmente se destaca apenas por ser mais delgada. No par cromossômico 3 aparece uma região clara indicativa de constrição secundária, geralmente mais evidenciada em um dos cromossomos do par. Em 19C-F são vistas fases da prófase I da meiose, em cystócitos. Em 19C, temos o início de zigóteno e em 19D-E, momentos mais adiantados da mesma fase. A observação em contraste de fase mostra um corpúsculo arredondado no interior de cada núcleo em zigóteno adiantado, aparentemente correspondendo ao nucléolo (19D-E). Em 19F observam-se os cromossomos em diplóteno, apresentando algumas regiões claras, possivelmente falhas ou quebras homo ou heterozigotas.

3.2- Impregnação pelo Nitrato de Prata

Nas figuras 20 a 24 são observados os padrões de impregnação pela prata, nas células intersticiais e nos cystócitos. Nas figuras 20 e 21 observa-se a marcação nucleolar única das células intersticiais e as marcações de tamanho e número variável dos cystócitos. Observa-se também que nestas últimas células o aspecto das marcações varia com a organização da cromatina, tornando-se mais difusa à medida em que os cromossomos se diferenciam. Na figura 22, em que a membrana nuclear já desapareceu, corpúsculos nucleolares em número e tamanho variáveis e forma arredondada estão associados aos cromossomos, aparentemente a diferentes regiões.

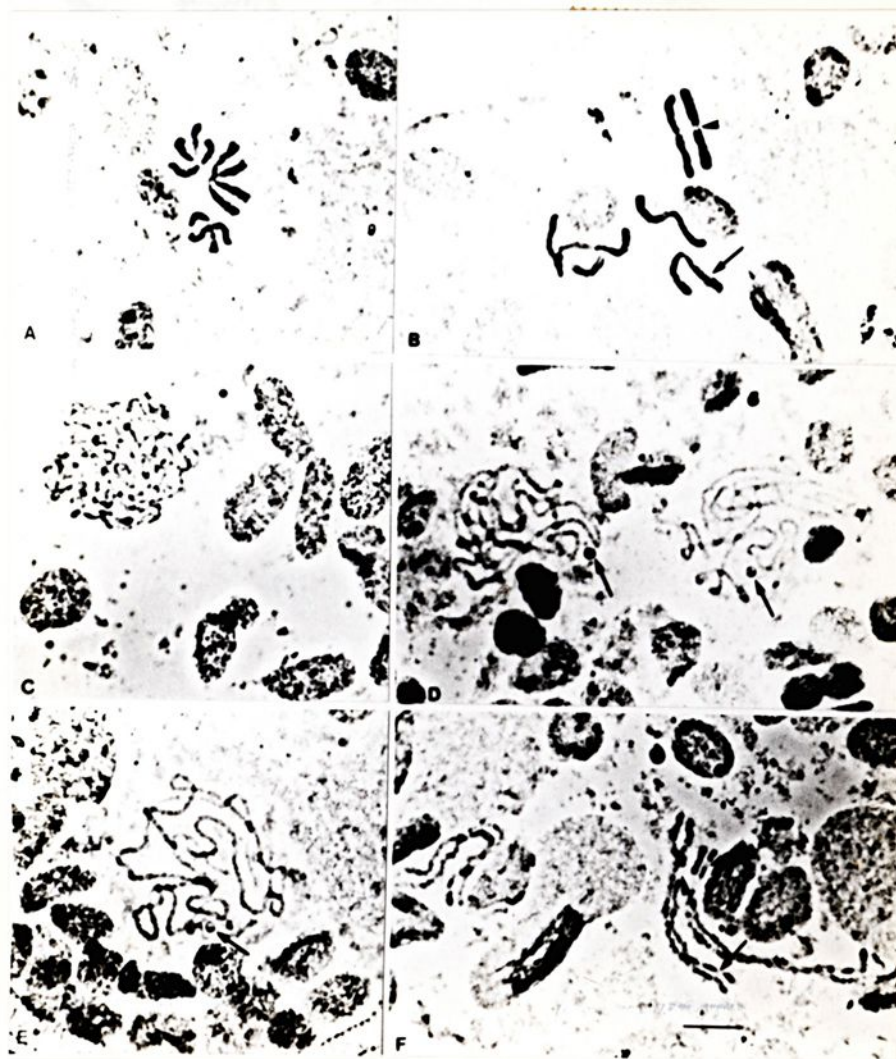


Figura 20A-B. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. Núcleos das células

Figura 19A-F. Ovário. Coloração com orceína-lacto-acética. A-B. Metáfases mitóticas. Em A observa-se o pareamento mitótico característico dos cromossomos de mosquitos. Em B, a ponta de seta indica a região centromérica do cromossomo 1 e a seta, a constrição secundária no cromossomo 3; C-E. Cromossomos em zigóteno. Em D e E observa-se, em cada núcleo em divisão, um corpúsculo, possivelmente nucleolar (setas); F. Cromossomos em diplóteno. Observam-se possíveis regiões de falhas (setas) ou quebras (ponta de seta). (c.f.) (barra=10 μ m)

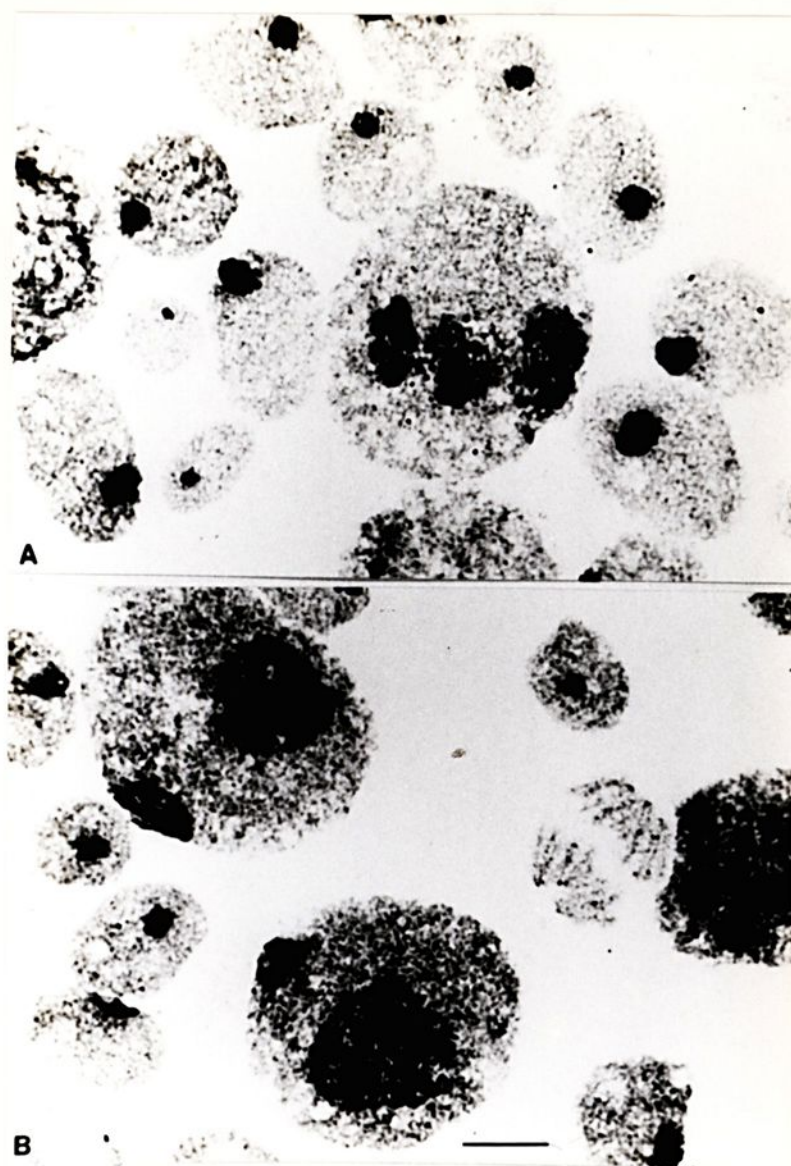


Figura 20A-B. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. Núcleos das células intersticiais mostrando um único corpúsculo nucleolar e cistócitos com grandes regiões nucleolares marcadas. (barra=10μm)

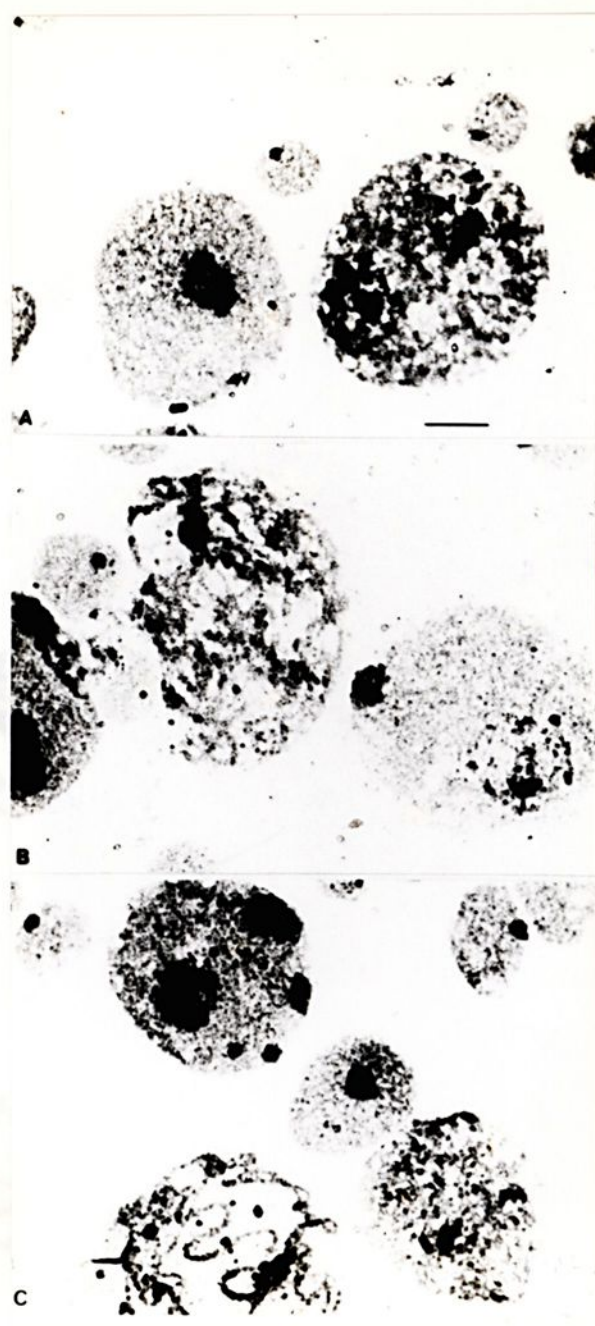


Figura 21A-C. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. Núcleos de cistócitos com aspectos variáveis da cromatina. As regiões marcadas pela prata aparecem mais densas nos núcleos com cromatina finamente granular e vão se tornando mais difusas à medida em que os cromossomos se vizualizam. (barra=10 μ m)

A figura 23 mostra que, nas células em metáfase e anáfase mitóticas, as regiões centroméricas dos 3 pares de cromossomos apareceram nitidamente marcadas com igual intensidade. Não foram observadas marcações fora dessas regiões cromossômicas.

Na figura 24, a marcação nuclear em células de oócitos e cistócitos apresenta resultados semelhantes. Em 249 cistócitos, foram observadas 103 marcações (massas nucleares marcadas) (Tab. 2). Em 100 oócitos, foram observadas 33 marcações (massas nucleares marcadas) (Tab. 2). Em 100 células de oócitos, foram observadas 7 a 8 marcações (massas nucleares marcadas) (Tab. 2).

Visto que as células nutritivas e as células de oócitos parecem corresponder a diferentes regiões cromossômicas, a técnica de marcação nuclear pode ser utilizada para identificar as regiões cromossômicas envolvidas.

3.3- Conclusões

A figura 25 mostra que, nas células de oócitos e cistócitos, a técnica de marcação nuclear pode ser utilizada para identificar as regiões cromossômicas envolvidas.

Foram observadas 103 marcações em 249 cistócitos e 33 marcações em 100 oócitos. Os resultados mostram que a marcação nuclear pode ser utilizada para identificar as regiões cromossômicas envolvidas.

As medidas da distância entre o centrômero e a marcação mostram que esta se localiza em regiões cromossômicas específicas.

Figura 22A-F. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. Cromossomos de cistócitos evidenciando corpúsculos nucleolares que variam em número e tamanho e aparentemente se associam a diferentes regiões cromossômicas. (barra=10µm)

Na figura 22, são mostrados seis micrografios (A-F) de ovários de camundongo, impregnados com nitrato de prata. Os micrografios mostram cromossomos de cistócitos com corpúsculos nucleolares marcados. A barra de escala representa 10µm.

A figura 23 mostra que, nas células em metáfase e anáfase mitóticas, as regiões centroméricas dos 3 pares de cromossomos apareceram nitidamente marcadas, com igual intensidade. Não foram observadas marcações fora dessas regiões cromossômicas.

Na figura 24 é possível observar núcleos de cistócitos com uma única marcação nucleolar, que é frequentemente arredondada, pequena e densa. Os outros cistócitos apresentam marcações maiores e em número variável. Foram observados 249 cistócitos, dos quais 211 tinham uma grande ou várias marcações nucleolares (massas nucleolares) e 38, um único corpúsculo menor, denso e arredondado (Tab.2). Em porcentagem esses valores correspondem a 84,7% e 15,3%, respectivamente.

Visto que entre 8 cistócitos apenas 1 dará origem ao oócito e os outros 7 a células nutritivas, a porcentagem esperada é de 12,5 % para oócitos e 87,5% para células nutritivas; os nossos resultados quanto à marcação nucleolar (15,3%; 84,7%) parecem corresponder aos dois tipos de células ($\chi^2=1,49$ e $0,3>P>0,2$).

3.3- Coloração pela Técnica de Bandamento C

A figura 25 apresenta cromossomos de cistócitos na fase de paquíteno nos quais a técnica de coloração para bandas C determina marcação intercalar, em um único cromossomo. Em algumas células a região marcada parece composta por dois cromômeros vizinhos (Fig. 25A).

Foram realizadas medidas do comprimento dos cromossomos nestas células cujos resultados, apresentados na tabela 3, demonstram que o cromossomo portador da marcação intercalar é o cromossomo menor, que corresponde ao X. As medidas da distância entre o centrômero e a marcação mostram que esta se localiza em região correspondente a aproximadamente 1/3 do comprimento total do braço.

Na figura 25 observa-se, também, que um corpúsculo nucleolar aparece sempre associado à região cromossômica marcada pela técnica de bandamento C. Pode-se verificar que essa associação é feita através de um filamento e parece ocorrer preferencialmente com o cromômero distal da região marcada ou com a região distal, quando não é possível visualizar os dois cromômeros. Além desse

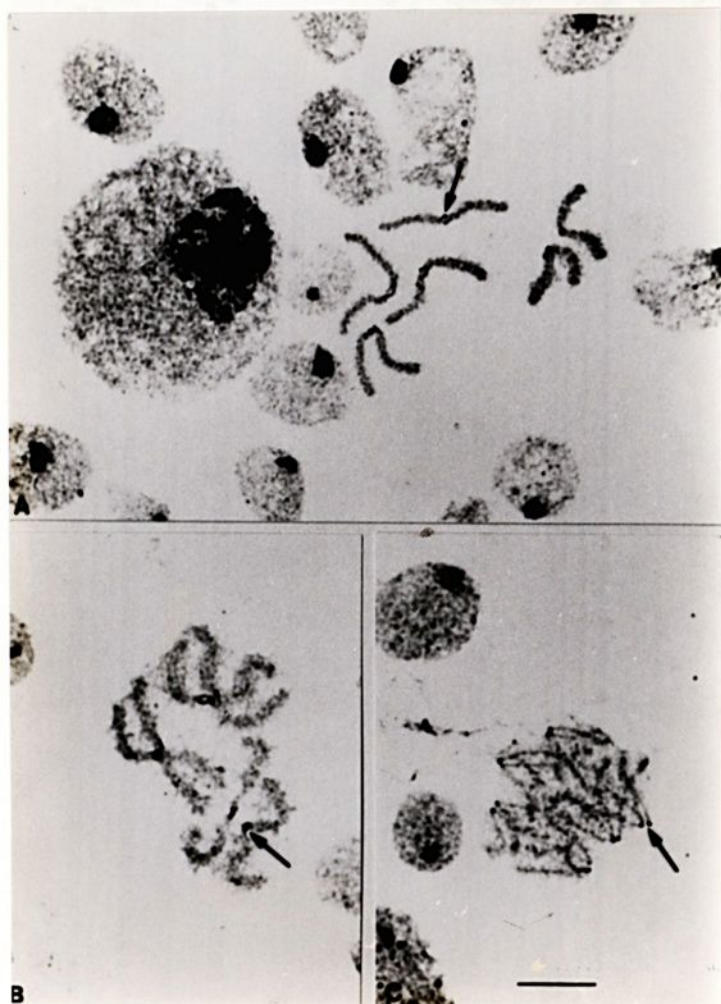


Figura 23A-B. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. A. Observam-se citócitos

Figura 23A-C. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. Cromossomos em diferentes fases da mitose mostrando marcação na região centromérica nos 3 pares de cromossomos (setas). (barra=10 μ m)

apresenta marcação pericêntrica e densa (seta). (barra em A=50 μ m; em B=10 μ m)

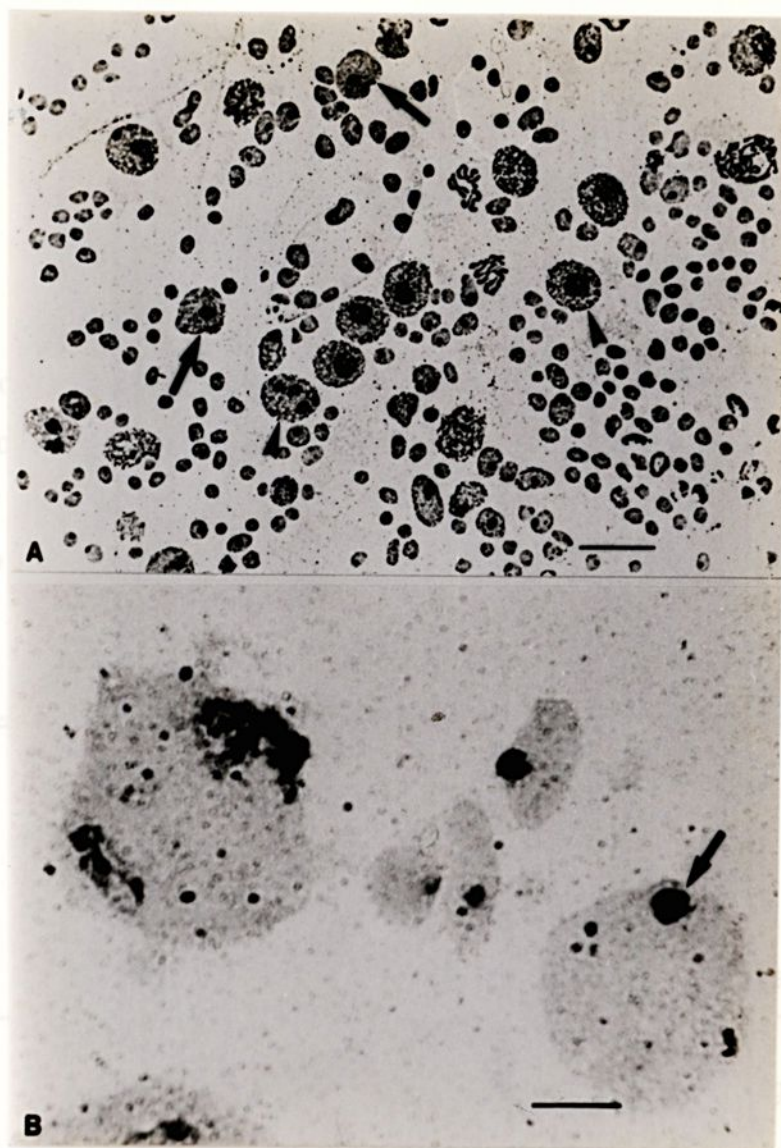


Figura 24A-B. Ovário. Impregnação com nitrato de prata. A. Observam-se cistócitos com uma única marcação nucleolar densa e pequena (setas) e cistócitos com marcações maiores ou várias marcações (pontas de seta). B. Dois cistócitos vistos em maior aumento, um dos quais apresenta marcação pequena e densa (seta). (barra em A=50 μ m; em B=10 μ m)

Tabela 2. Número de cistócitos esperados na proporção de 7:1 (7 células nutritivas e um oócito) e observados, admitindo-se, para as primeiras, uma marcação nucleolar grande ou múltiplas marcações e, para as segundas, uma marcação única e pequena, com o uso de impregnação pela prata.

Impregnação pela prata			
	Uma ou mais marcações grandes e difusas	Marcação única, menor e densa	Total
Obs.	211	38	249
Esp.	217,87	31,12	249

Figura 25A-P. Ovario - Bandas C. Células em pequeno mostrando uma região de banda C intervalar (pontos de seta) à qual se associa o nucléolo, em posição distal. Observam-se também corpúsculos menores, em número variável. (c.f.) (barra=10µm)

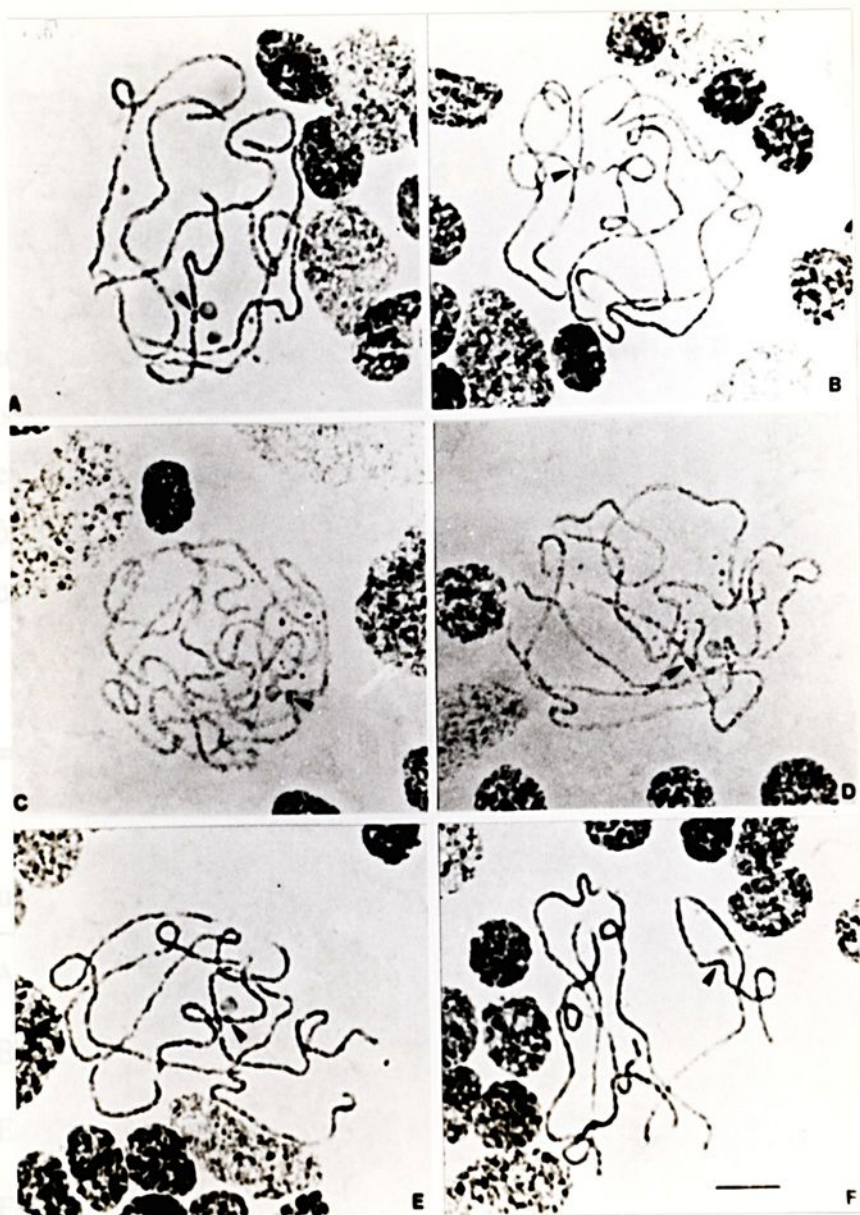


Figura 25A-F. Ovário. Bandas C. Células em paquíteno mostrando uma região de banda C intercalar (pontas de seta), à qual se associa o nucléolo, em posição distal. Observam-se também corpúsculos menores, em número variável. (c.f.) (barra=10 μ m)

corpúsculo, aparecem outros menores, às vezes muito numerosos, espalhados pelo núcleo.

A figura 26 mostra que nos cromossomos metafásicos de fêmeas, ocorre marcação intercalar e centromérica nos dois elementos do par X. A marcação intercalar apresenta tamanho variável, sendo bem evidente, como mostra a figura 26B. A marcação centromérica é mais discreta, ocorrendo também nos outros cromossomos, porém de forma não constante. Em células em prometáfase (Fig. 26A) aparecem três marcações bem evidenciadas e uma mais tênue, possivelmente correspondendo, a maior, à banda intercalar, e as demais, às bandas centroméricas.

Tabela 3. Medidas (em cm) do comprimento dos três cromossomos dos cistócitos e da distância centrômero-banda C intercalar tomadas na figura 25. Os valores entre parênteses correspondem, na sequência, à distância entre o centrômero e a marcação C-positiva e ao comprimento total do braço cromossômico em que a marcação ocorre.

Figura	Medidas do comprimento cromossômico (cm)		
	Cromossomo marcado	Demais cromossomos	
7A	11,8 (2,1: 5,6)	18,2	17,7
7B	13,7 (2,3: 7,3)	20,4	17,0
7E	12,1 (2,0: 5,6)	16,3	15,8
7F	11,2 (1,8: 5,2)	16,4	14,7

No presente trabalho, os testículos foram submetidos à coloração pela técnica de bandamento C e de impregnação pelo nitrato de prata. As observações são descritas a seguir.

corpúsculo, aparecem outros menores, às vezes muito numerosos, espalhados pelo núcleo.

A figura 26 mostra que nos cromossomos metafásicos, de fêmeas, ocorre marcação intercalar e centromérica nos dois elementos do par X. A marcação intercalar apresenta tamanho variável, sendo bem evidente, como mostra a figura 26B. A marcação centromérica é mais discreta, ocorrendo também nos outros cromossomos, porém de forma não constante. Em células em prometáfase (Fig. 26A) aparecem três marcações bem evidenciadas e uma mais tênue, possivelmente correspondendo, a maior, à banda intercalar, e as demais, às bandas centroméricas.

Na figura 26C-H são observadas células portadoras de aberrações cromossômicas incluindo fragmentos adicionais e quebras, principalmente. Algumas dessas regiões quebradas coram-se intensamente com a técnica de banda C.

4- TESTÍCULO

As gônadas atingem seu tamanho completo no estágio de pupa. A espermatogênese ocorre principalmente durante os estádios larval e pupal. A espermatogênese pode continuar durante a fase adulta, mas em taxas reduzidas. Um único testículo de mosquito pode conter células germinativas em todos os estágios de diferenciação (Clements, 1992).

Krafsur & Jones (1967) estudaram a espermiogênese em *Ae. aegypti* pela microscopia eletrônica de transmissão. Com base em seus resultados, as espermatogônias situam-se na porção anterior do testículo. As espermátides estão presentes no início do estágio de pupa e, na época da emergência dos machos, a metade de cada testículo é preenchida com espermatozóides, que já apresentam movimento (Rai, 1967).

No presente trabalho, os testículos foram submetidos à coloração pela técnica de bandamento C e de impregnação pelo nitrato de prata. As observações são descritas a seguir.

4.1- Coloração pela Técnica de Bandamento

O uso dessa técnica permite a observação de marcação centromérica nos 3 pares de cromossomos obedecendo a sequência $X \rightarrow 3 \rightarrow 2$, quanto à intensidade de coloração ou tamanho. Em algumas vezes, ausente. Também pode variar quanto à intercalação no par de cromossomos (Fig. 26A-H).

Nos testículos, as células portadoras de aberrações cromossômicas apresentam fragmentos adicionais ou ausentes. Células com alterações cromossômicas podem ser visualizadas.

4.2- Impressão

As células grandes (Fig. 30) apresentam um núcleo triangular e o nucléolo.

Em células pequenas, o núcleo é arredondado e o nucléolo é bem visível.

Podem ser vistas, também, células com alterações cromossômicas (Fig. 30D-E).

Nas células grandes, o núcleo é triangular e o nucléolo é bem visível.

Podem ser vistas, também, células com alterações cromossômicas (Fig. 30D-E).

Nas células pequenas, o núcleo é arredondado e o nucléolo é bem visível.

Podem ser vistas, também, células com alterações cromossômicas (Fig. 30D-E).

Nas células grandes, o núcleo é triangular e o nucléolo é bem visível.

Podem ser vistas, também, células com alterações cromossômicas (Fig. 30D-E).

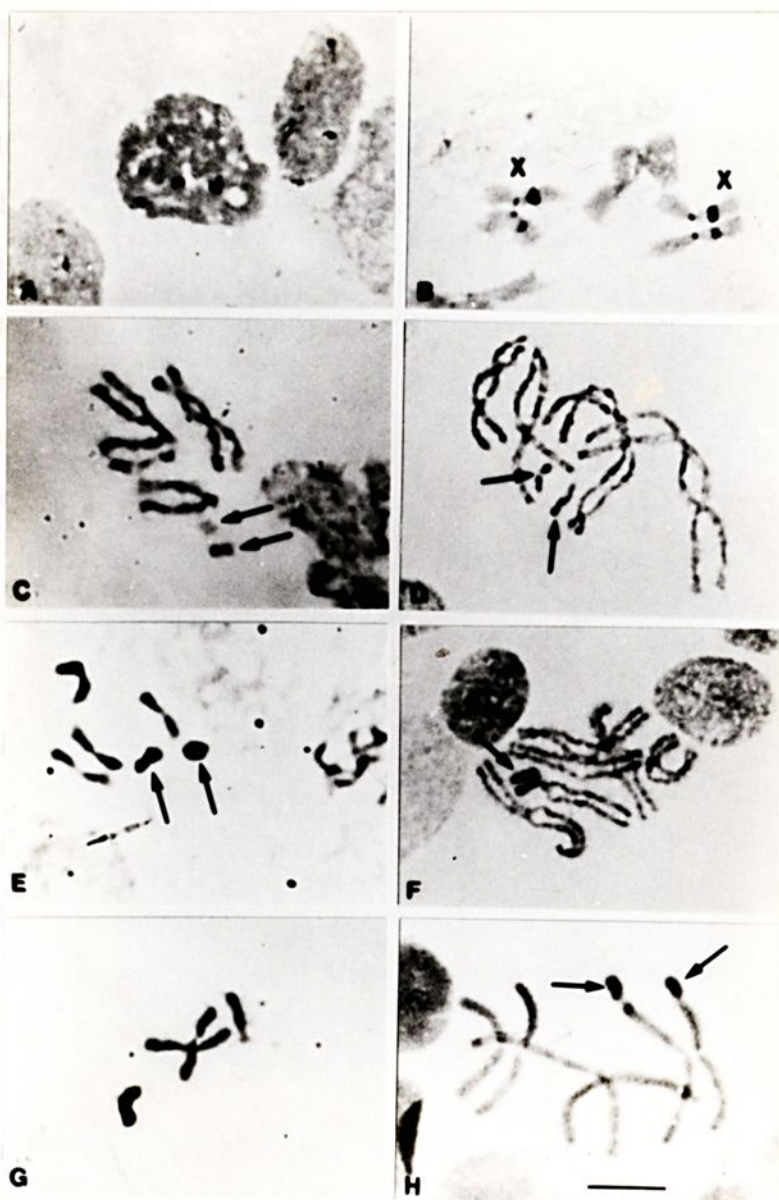


Figura 26A-H. Ovário. Bandas C. A. Núcleo em prófase mostrando 3 marcações mais evidentes e uma tênue; B. Dois pares de cromossomos X com as regiões centroméricas e intercalares coradas; C-F. Células com aberrações cromossômicas: fragmentos cromossômicos (setas em C, D, F) ou alterações morfológicas no par sexual (E) ou alteração numérica (G); H. Cromossomos de *Ae. aegypti* de Franca. Observa-se uma região possivelmente adicional, corada positivamente (setas). (c.f.) (barra=10µm)

4.1- Coloração pela Técnica de Bandamento C

O uso dessa técnica permitiu a observação de marcação centromérica nos 3 pares de cromossomos, obedecendo a sequência $X>3>2$, quanto à intensidade de coloração ou tamanho. No Y, a marcação centromérica se apresenta mais fraca e às vezes, ausente. Tanto o cromossomo X, como o Y mostram marcação intercalar que pode variar quanto à intensidade de coloração. Observa-se, ainda, uma marcação intercalar no par de cromossomos 3, que às vezes, porém, é visível em um só desses cromossomos (Fig. 27).

Nos testículos de *Ae. aegypti* de Franca também foram observadas células portadoras de aberrações cromossômicas, constituídas principalmente por quebras e fragmentos adicionais (Fig. 28). A marcação intercalar nestes cromossomos estava presente somente no X.

Células em fase de espermiogênese coraram-se pela técnica de bandamento C permitindo visualizar, geralmente, uma marcação única e nítida (Fig. 29).

4.2- Impregnação pelo Nitrato de Prata

As células testiculares mostram uma ou algumas marcações geralmente grandes (Fig. 30A-C). Nos espermatócitos, o núcleo tem forma arredondada ou triangular e o nucléolo é único.

Em células em início de zigóteno, observa-se um único corpúsculo nucleolar. Podem ser vistas, às vezes, algumas marcações granulares nos cromossomos (Fig. 30D-E).

Nas células em metáfase e anáfase a marcação centromérica é bem evidenciada nos 3 pares de cromossomos (Fig. 30E-G).

Figura 27A-F Testículo de *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. A. Bandamento centromérico observado nos três pares de cromossomos. Linha vertical centromérica no cromossomo Y (ponta de seta), marcação intercalar presente nos cromossomos X e Y. B-F. Marcação intercalar em um ou nos dois membros do par de cromossomos 3. C-D. Marcação centromérica ausente no cromossomo Y. E-F. Marcações em cromossomos em anáfase. (barra=10µm)

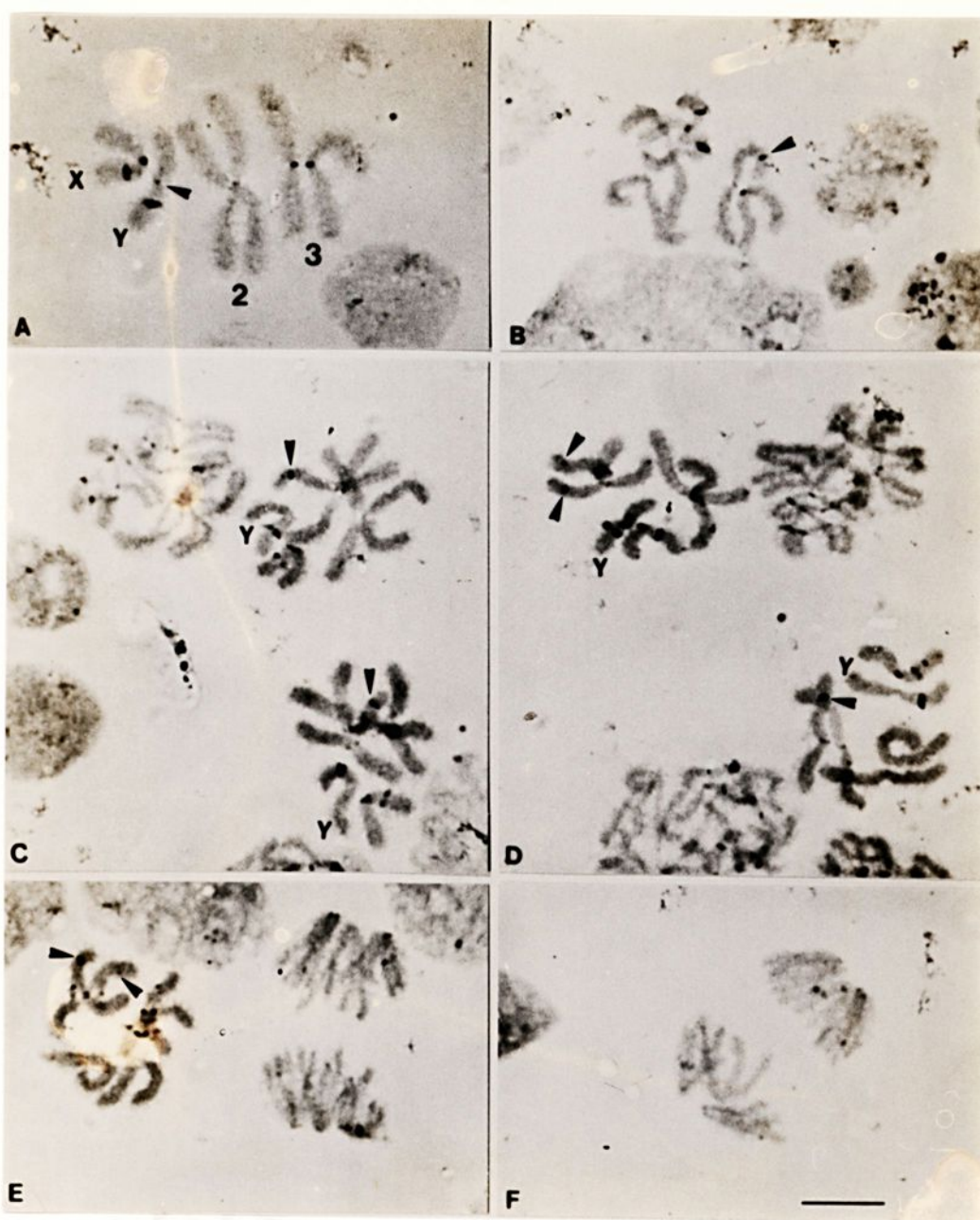


Figura 27A-F. Testículo. Bandas C. *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. A. Regiões centroméricas marcadas nos três pares de cromossomos. Leve marcação centromérica no cromossomo Y (ponta de seta); marcação intercalar presente nos cromossomos X e Y; B-E. Marcação intercalar em um ou nos dois membros do par de cromossomos 3; C-D. Marcação centromérica ausente no cromossomo Y; E-F. Marcações em cromossomos em anáfase. (barra=10 μ m)

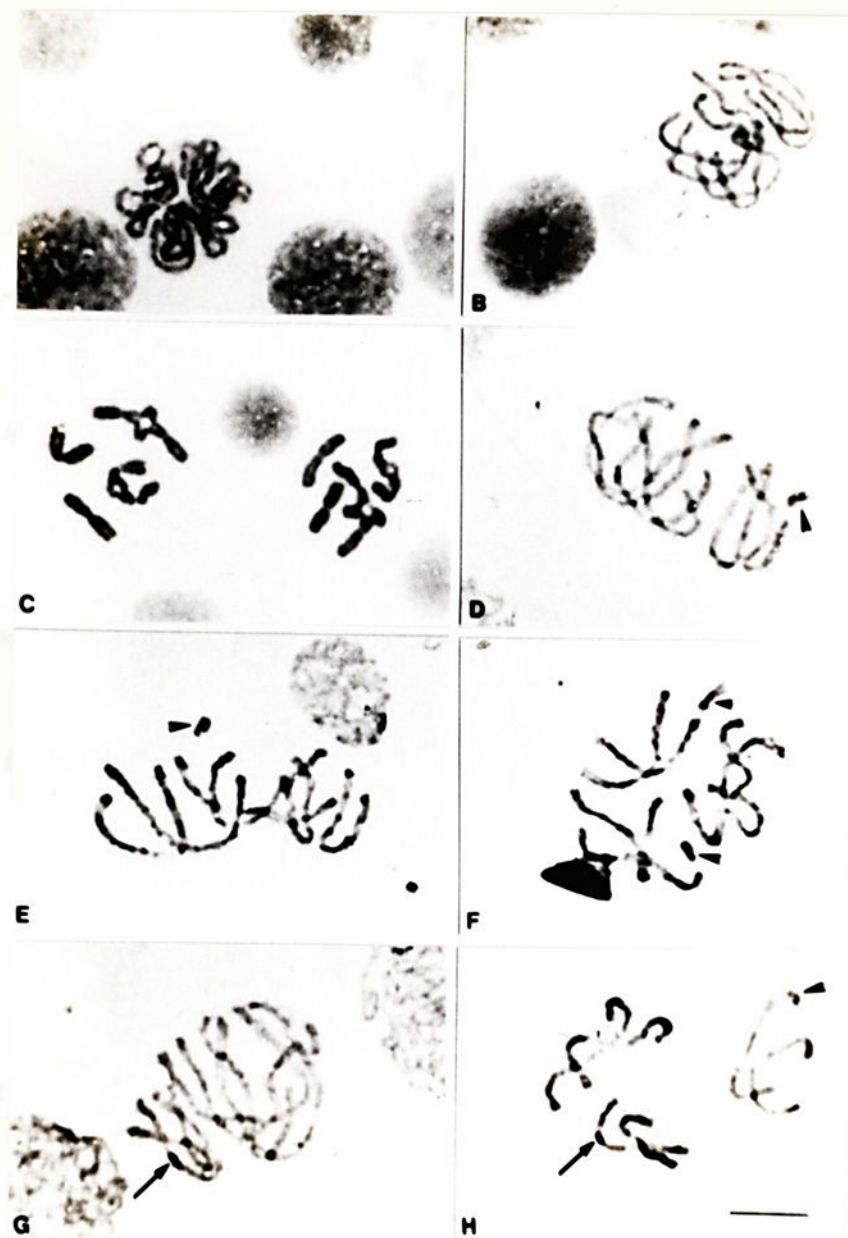


Figura 28A-H. Testículo. Bandas C. *Ae. aegypti* de Franca. A-C. Configurações meióticas normais; D, E, F, H. Aberrações cromossômicas constituídas por quebras ou fragmentos adicionais (pontas de seta); G-H. Marcação intercalar apenas no cromossomo X (setas). (barra=10µm)

Figura 28A-H. Testículo. Bandas C. *Ae. aegypti* de Franca. A-C. Configurações meióticas normais; D, E, F, H. Aberrações cromossômicas constituídas por quebras ou fragmentos adicionais (pontas de seta); G-H. Marcação intercalar apenas no cromossomo X (setas). (barra=10µm)

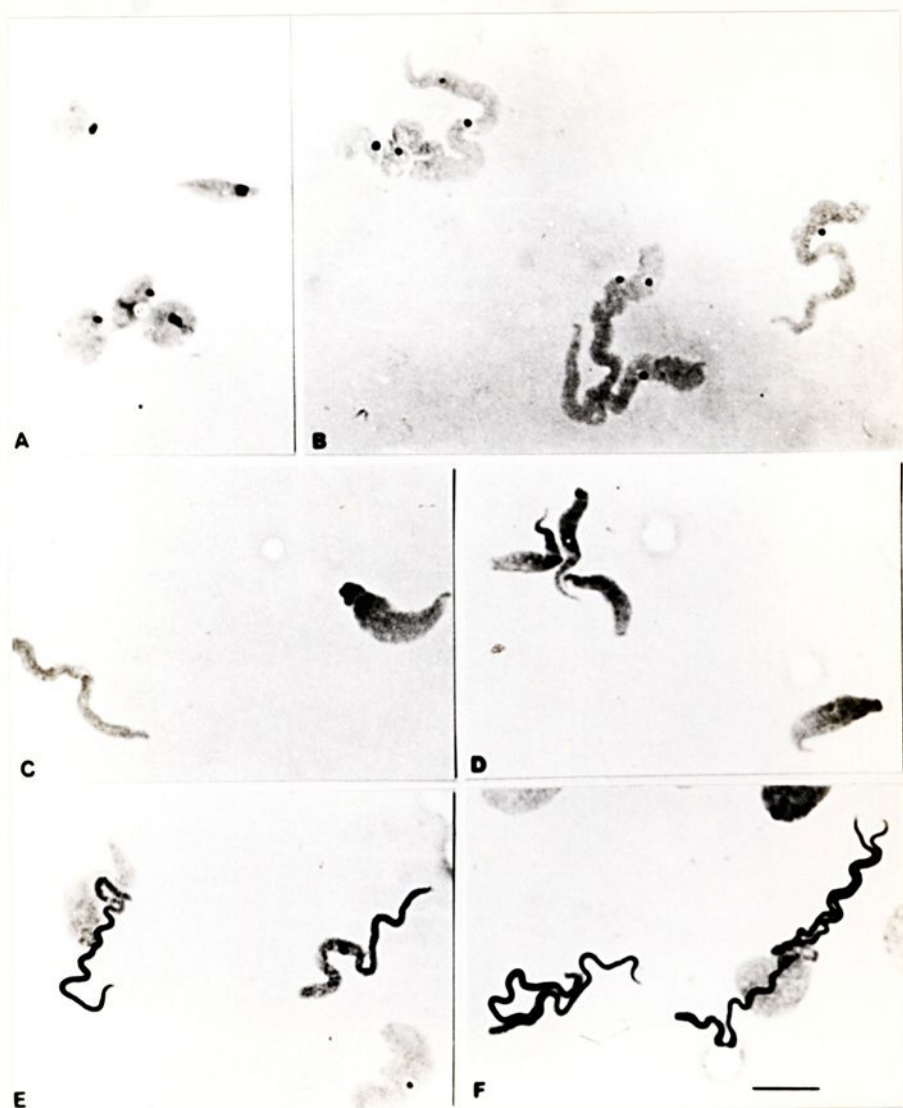


Figura 29A-F. Testículo. Bandas C. Fases da espermiogênese; as espermátides apresentam uma única marcação heterocromática. (barra=10µm)

Figura 30A-G

nuclear (espermatozoos) ou mais de um corpúsculo nuclear (espermatozoides); C: Uma marcação nuclear em núcleos "irregulares" de espermatozoides maduros; D-E: Núcleos em profase I de células com um corpúsculo nuclear (setas); E: Cromossomos em final de metáfase I; F-G: Metáfase, com as regiões centroméricas marcadas e separadas (barra=10µm; a barra em G é a mesma para A, D, E, F)

IV- DISCUSSÃO

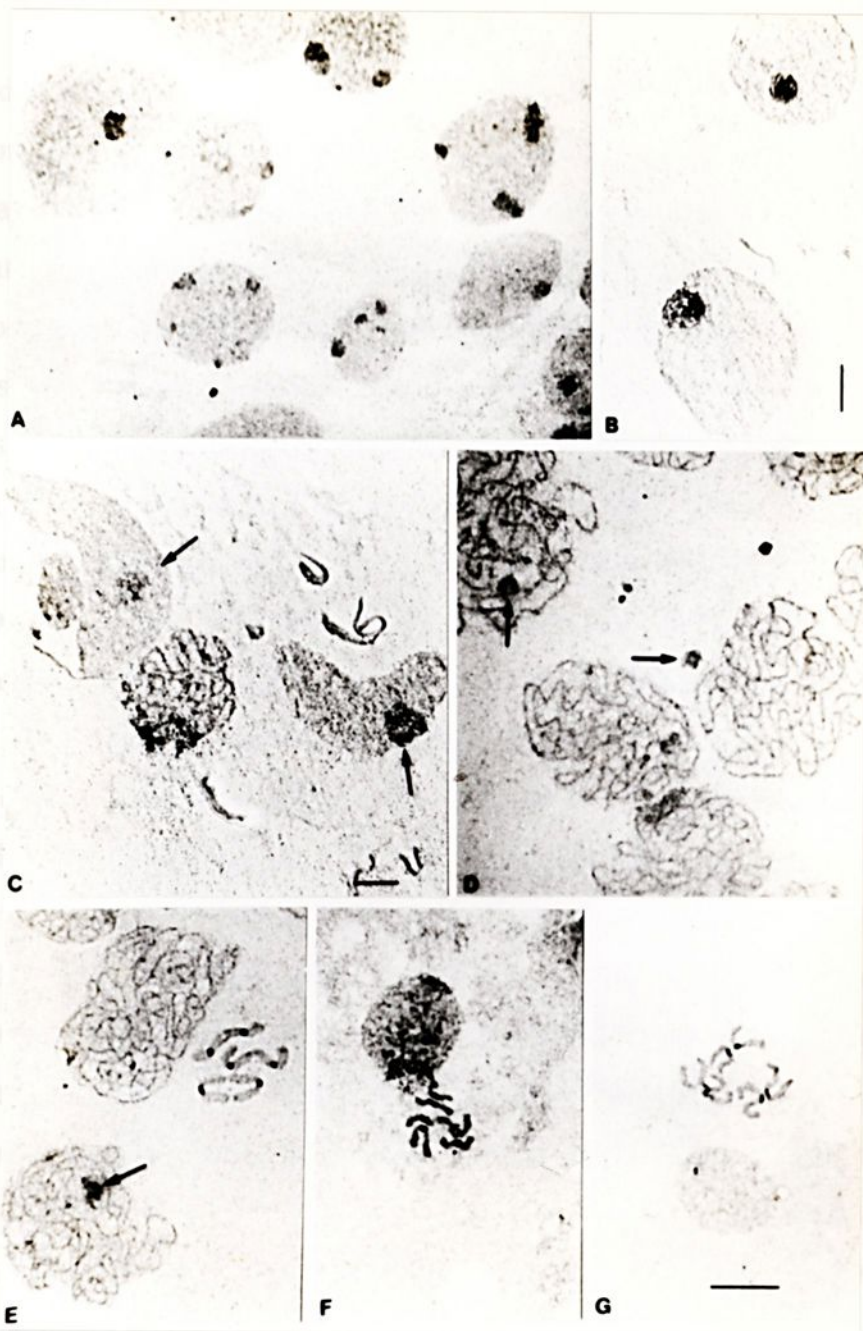


Figura 30A-G. Testículo. Nitrato de Prata. A-B. Células testiculares com uma marcação nucleolar (espermatócitos) ou mais de um corpúsculo nucleolar (espermatogônias); C. Uma marcação nucleolar em núcleos “triangulares” de espermatócitos maduros; D-E. Núcleos em prófase I da meiose com um corpúsculo nucleolar (setas). E. Cromossomos em final de metáfase I; F-G. Metáfase, com as regiões centroméricas marcadas e pareadas. (barra=10 μ m; a barra em G é a mesma para A, D, E, F)

IV- DISCUSSÃO

Métodos de coloração têm sido utilizados para identificar o conjunto normal de cromossomos, anormalidades cromossômicas associadas a algum estado patológico, ou para propósitos comparativos em estudos evolutivos.

Colaborou muito, nessa utilização, o desenvolvimento de técnicas de bandamento, ocorrido há mais de 20 anos, e que tem revelado extensa diferenciação longitudinal nos cromossomos. Fazem parte dessa diferenciação, as regiões heterocromáticas e as regiões organizadoras nucleolares (RONs).

A técnica de bandamento C é específica para localizar a distribuição das regiões heterocromáticas, que se coram diferencialmente do restante do cromossomo. O termo heterocromatina foi inicialmente usado para definir cromossomos ou segmentos cromossômicos que não se descondensam na telófase mitótica e assim se mantêm em estado condensado ou heteropicnótico por toda a intérfase e subsequente prófase do próximo ciclo celular (Heitz, 1928 apud John & Miklos, 1979). Brown (1966) ampliou esta definição identificando dois tipos de heterocromatina: (a) constitutiva, que está sempre presente em certos locais de ambos os cromossomos homólogos, em todas as células de uma espécie, e (b) facultativa, que varia em seu estado de condensação em diferentes tipos celulares e em tempos diferentes e pode diferir entre os cromossomos homólogos.

O uso da técnica de bandamento C, tem revelado consideráveis heteromorfismos heterocromáticos nos cromossomos, ou seja, os segmentos heterocromáticos variam em tamanho entre cromossomos de um mesmo indivíduo e entre indivíduos de uma espécie.

As regiões organizadoras nucleolares (RONs), por sua vez, têm sido bastante estudadas pelo uso de técnicas de impregnação pela prata (Goodpasture & Bloom, 1975; Howell & Black, 1980).

A especificidade para RONs ativas e nucléolos torna as técnicas de impregnação pela prata muito valiosas para estudos de ambas as estruturas. Muitos estudos têm sido realizados visando à comparação entre espécies, entre indivíduos de mesma espécie e entre fases de desenvolvimento utilizando esta técnica



(Schwarzacher *et al.*, 1978; Bicudo, 1982a; Nanya & Bicudo, 1995). Também tem sido de grande importância na comparação da atividade de RONS entre células cancerosas e normais, uma vez que o câncer é caracterizado por altas taxas de síntese de RNAr (Reeves *et al.*, 1982; Derenzini *et al.*, 1986, 1990; Derenzini & Betts, 1990; Boquist, 1990; Darne *et al.*, 1990).

Os métodos de impregnação pela prata, além de serem simples e seguros para a demonstração da atividade dos genes ribossômicos, evidenciam mecanismos relacionados à regulação da expressão gênica. No homem, embora o DNAr tenha sido detectado, por hibridização "in situ", em todos os cromossomos acrocêntricos (Warburton *et al.*, 1976), os métodos de coloração pela prata mostram, entre eles, cromossomos com pouca ou nenhuma coloração, sugerindo a possibilidade de que estes resultados sejam decorrentes de uma proporção de organizadores nucleolares inativos que não se coram apesar da presença de DNAr (Tantravahi *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1977).

O uso das técnicas em estudos com híbridos interespecíficos trouxe informações importantes sobre os mecanismos reguladores da atividade organizadora nucleolar ao nível da transcrição. Tornou-se evidente, por exemplo, a existência de dominância do organizador nucleolar em híbridos de *Drosophila* (Bicudo, 1982b).

Estudos realizados em *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos sugeriram que processos descritos em diferentes organismos podem fazer parte do sistema regulador de reserva de uma única espécie e podem ser acionados de acordo com as exigências do momento (Bicudo & Richardson, 1977). Nesses híbridos interespecíficos, o uso do nitrato de prata permitiu demonstrar que o RNA ribossômico de uma espécie é exclusivamente expressado e que além da dominância interespecífica do sistema regulador do organizador nucleolar, ocorre a ativação de um organizador nucleolar secundário associado à amplificação gênica (Bicudo, 1982b).

A impregnação pela prata, aplicada às glândulas salivares, mostrou que a hibridação determina também alterações morfológicas e numéricas dos nucléolos. Além disso, um resultado interessante da aplicação da prata a cromossomos

politênicos de *Drosophila* foi a coloração de um filamento que associa o cromossomo X ao nucléolo e que não havia sido corado em lâminas submetidas a hibridização "in situ" (Bicudo, 1982b).

Outro mérito da aplicação das técnicas de coloração pela prata, aos cromossomos politênicos, foi o de confirmar que os "corpúsculos semelhantes ao nucléolo" detectados com alguma dificuldade nas lâminas dos híbridos, examinadas em contraste de fase ou coradas pela orceína-lacto-acética, são realmente formados de material nucleolar (Bicudo, 1982b).

A técnica de bandamento C foi aplicada a túbulos de Malpighi, ovários, testículos e região cefálica.

Segundo Clements (1992), em *Ae. taeniorynchus*, o número médio total de células, nos túbulos, é 62 das quais 16 a 18% são células estreladas. O número de células é constante, desde a fase larval até a fase adulta de um indivíduo, e o número é semelhante em machos e fêmeas. Em *Ae. aegypti*, foram observadas proporções de células primárias e estreladas semelhantes às descritas para *Ae. taeniorynchus* (Satmary & Bradley, 1984).

As células primárias e estreladas diferem acentuadamente em tamanho. Há ainda variação dentro do mesmo tipo celular, especialmente em relação às células primárias, como vimos no presente estudo.

A coloração com orceína-lacto-acética e Feulgen nos permitiu confirmar a natureza politênica das células primárias dos túbulos de Malpighi pela percepção de segmentos bandados nesses núcleos, e verificar, por microscopia óptica, a organização da cromatina, que mostra aspectos variáveis, conforme foi descrito no item Resultados. Os diferentes graus observados de condensação da cromatina e tamanho do núcleo devem estar refletindo diferentes graus de atividade celular. A técnica de bandamento C revelou um único corpúsculo heterocromático, bastante destacado, tanto nas células primárias, quanto nas estreladas.

Outro órgão estudado, no presente trabalho, foi o ovário, que, como já foi mencionado, é constituído por grupos de ovariolos, dentro dos quais se desenvolvem os folículos. Na fase de pupa, analisada no presente trabalho, ou mesmo nos folículos que acabaram de sair do germário, na fêmea adulta antes da

primeira alimentação com sangue, o oócito é indiferenciado das células nutritivas e todas as 8 células parecem iguais (Bertran, 1962; Fill, 1974).

Seguindo a diferenciação dos cistócitos, os cromossomos do oócito iniciam a meiose, mas os cromossomos das células nutritivas sofrem endoduplicação e tornam-se politênicos. Embora esse processo de endoduplicação possa iniciar durante o estágio de pupa, ele só é completado alguns dias após a emergência do adulto. Uma vez que o oócito e as células nutritivas tenham se diferenciado, a sincronia que caracterizava a divisão celular, inicialmente, é perdida e as células nutritivas dentro de um mesmo folículo mostram diferentes graus de politenia (Clements, 1992).

Os mosquitos são um dos poucos grupos de insetos com ovários meroísticos nos quais o RNAr é sintetizado nas células nutritivas e nos oócitos. Os oócitos dos mosquitos crescem centenas de vezes em volume, dentro de um curto período de tempo após a ingestão de sangue pela fêmea. A politenia permite aos cromossomos das células nutritivas amplificar suas taxas de transcrição, mas tal mecanismo não é disponível aos oócitos (Clements, 1992).

Antes da fêmea de *Ae. aegypti* ter emergido, a replicação cromossômica já ocorreu e a meiose já iniciou nos oócitos dos folículos primários. Segundo Roth & Porter (1964), na época da emergência a fêmea tem seus oócitos mais adiantados no estágio de zigóteno e o prosseguimento do processo de divisão meiótica só vai se completar após a alimentação com sangue. Nossas observações, no presente trabalho, entretanto, mostram, em fase de pupa, células em paquíteno. Esses cistócitos, em paquíteno, apresentam uma única marcação C-positiva, que corresponde à banda C intercalar do cromossomo X, à qual observamos a associação de um corpúsculo nucleolar, em contraste de fase; essas observações serão discutidas mais adiante.

Nas células interfásicas do ovário, do testículo (inclusive nas espermátides) e na maioria das células da região cefálica, também foi observada uma única marcação heterocromática. Em alguns núcleos da região cefálica, observamos a presença de mais de uma marcação, que provavelmente resulta da separação precoce das regiões heterocromáticas centroméricas e intercalares, mais visíveis como

unidades separadas nos núcleos em prófase adiantada e que se mantinham unidas no início da divisão.

Dessa forma, a aplicação da técnica de bandamento C revelou, para todos os tecidos estudados neste trabalho, um padrão comum de heterocromatina constitutiva nas células interfásicas, isto é, uma única marcação.

A técnica de bandas C, aplicada a cromossomos, principalmente metafásicos, de testículo, ovário e gânglios cerebrais, nos permitiu diferenciar o padrão de marcação nos cromossomos de *Ae. aegypti* de Franca e de São José do Rio Preto. Uma marcação intercalar no cromossomo Y está sempre presente em indivíduos da população de São José do Rio Preto, enquanto na população de Franca está ausente. Os cromossomos 2, 3 e X apresentaram bandas centroméricas sendo que, nesse último, a marcação sempre foi mais intensa, enquanto nos cromossomos 2 e 3, foram sempre menores e menos óbvias. Uma leve marcação centromérica no cromossomo Y foi encontrada em algumas células de indivíduos da população de São José do Rio Preto, porém, não foi encontrada em nenhum indivíduo analisado da população de Franca. O cromossomo X de todos os indivíduos analisados, das duas populações e o cromossomo Y de indivíduos da população de São José do Rio Preto, apresentaram uma banda intercalar, em um dos braços, que variou em intensidade de coloração e largura, dentro e entre indivíduos. Esta variação, pode representar diferenças no conteúdo de heterocromatina.

No que se refere à heterocromatina, observada com o uso de bandamento C, é preciso mencionar a presença não constante de banda intercalar no cromossomo 3, das duas populações analisadas, em uma região cromossômica em que, às vezes, é possível observar uma constrição secundária. Essa constrição foi anteriormente mencionada por outros autores (Akstein, 1962 apud Rai, 1967; McDonald & Rai, 1970; Newton *et al.*, 1974) mas a presença de banda C no local parece ter sido observada pela primeira vez neste trabalho, constituindo-se em um elemento de diferenciação entre essas populações e as estudadas por outros autores. Como veremos mais adiante, essa constrição secundária não parece ter relação com a síntese nucleolar.

Na literatura, existem alguns trabalhos que descrevem o padrão de bandas C em *Ae. aegypti* de outras regiões. Um deles é o de Wallace & Newton (1987) que analisaram duas linhagens de *Ae. aegypti* de Bangalore e Trinidad, mantidas em laboratório. Os resultados de Trinidad mostraram a presença de banda C centromérica em todos os cromossomos exceto o Y. Os cromossomos X e Y possuíam uma banda intercalar. As bandas centroméricas eram pericêntricas, de acordo com observações na prófase. Na linhagem de Bangalore, foram observados esses mesmos padrões sendo que, em alguns indivíduos, foram observados cromossomos X e Y sem banda intercalar.

Motara & Rai (1978, 1977) analisaram uma linhagem mantida no Laboratório de Biologia de Vetores da Universidade de Notre Dame. Seus resultados mostraram a presença de banda C na região centromérica dos dois pares de autossomos e no cromossomo X, que apresentou também uma banda intercalar. O cromossomo Y não apresentou banda centromérica nem banda intercalar.

Outro trabalho é o de Newton *et al.* (1974), em que foram analisadas 4 linhagens mantidas em laboratório, sendo uma de Trinidad, duas da África (Accra e Chipei) e uma da Tailândia (Bangken). Foram observadas bandas C nos 6 centrômeros de fêmeas e em 5 de machos. Uma banda intercalar foi encontrada em todos os cromossomos X. Todos os machos de Trinidad e a maioria de Bangken tinham Y portador de banda intercalar, mas esta banda intercalar estava geralmente ausente em Accra e Chipei.

A figura 31 mostra um esquema comparativo dos resultados obtidos no presente trabalho, na análise do padrão de bandas C em cromossomos de *Ae. aegypti*, com as análises mencionadas, realizadas por diferentes autores em diferentes populações. Observa-se que o cromossomo Y pode apresentar presença ou ausência de banda C intercalar ou centromérica. É interessante destacar, também, que nenhum dos trabalhos previamente realizados mencionou a presença de banda intercalar no cromossomo 3, constatada nas duas populações brasileiras. Além disso, constitui diferença entre as duas populações analisadas no presente trabalho, a ausência de banda centromérica e intercalar no Y da amostra de Franca. Sob esse aspecto, excluindo-se a banda intercalar do cromossomo 3, não mencionado por



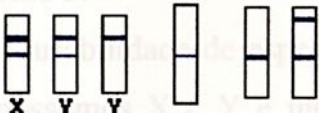
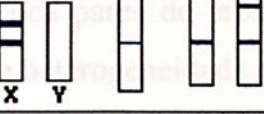
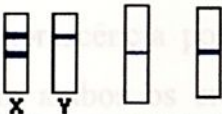
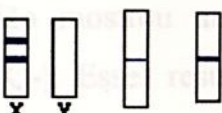
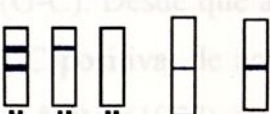
Cromossomos 1 2 3			Origem da linhagem	Autor (es)
			São José do Rio Preto-SP (Brasil)	Presente trabalho
			Franca-SP (Brasil)	Presente trabalho
			Bangalore (Índia)	Wallace & Newton (1987)
			Trinidad	Wallace & Newton (1987) Newton, Southern and Wood (1974)
			Cabo (África do Sul) Univ. Notre Dame (U.S.A.) Accra (Ghana), Chipei (Taiwan)	Motara (1982) Motara & Rai (1977, 1978) Newton, Southern and Wood (1974)
			Bangken (Tailândia)	Newton, Southern and Wood (1974)

Figura 31. Representação esquemática do padrão de bandas C encontrado em estudos com diferentes populações de *Ae. aegypti* e seus respectivos autores.

nenhum dos autores dos trabalhos prévios, os dados obtidos para Franca são semelhantes aos obtidos para a população de *Ae. aegypti* de Cabo (África do Sul), Accra e Chipei (África) e Universidade do Notre Dame (U.S.A.). Quanto à população de São José do Rio Preto, seu padrão difere de todos os demais, pela presença de banda centromérica no Y além da mencionada banda intercalar no cromossomo 3.

A variabilidade de espessura e intensidade de coloração da banda intercalar dos cromossomos X e Y e mesmo a diferença existente entre as marcações dos centrômeros dos pares de cromossomos X, 2 e 3 são também demonstrações de ocorrência de heterogeneidade das regiões heterocromáticas.

Marchi & Rai (1986) utilizaram os bandamentos fluorescentes Q (Quinacrina), H (Hoeschst 33258) e R (Acridina Orange) em cromossomos de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. mascarensis*. Foi obtido um padrão comum para as três espécies. Fluorescência por acridina orange (R+) foi encontrada em uma região intercalar em ambos os cromossomos sexuais (tanto no X, quanto no Y). Essa mesma região mostrou ausência de fluorescência por Hoechst 33258 (H-) e quinacrina (Q-). Esses resultados indicaram presença de DNA rico em guanina e citosina (G-C). Desde que as posições dessas bandas foram semelhantes à da banda intercalar C-positiva, de acordo com os autores esses dados suportaram a hipótese de Motara & Rai (1977) da natureza facultativa daquela região.

Wallace & Newton (1987) também utilizaram fluorocromos para caracterizar a linhagem Trinidad-30 de *Ae. aegypti*, realizando bandamento sequencial por Q, H e C e revelando resultados diferentes dos encontrados por Marchi & Rai (1986). Wallace & Newton (1987) indicaram diferenças entre as respostas das bandas intercalares dos cromossomos X e Y. A banda intercalar do X mostrou duas respostas diferentes, uma para a região distal e outra para a região proximal da banda. A região proximal mostrou fluorescência H normal e menor fluorescência Q do que as regiões adjacentes, enquanto a região distal da banda não diferiu da região adjacente, com nenhum dos dois marcadores. No Y, a banda intercalar correspondente não mostrou fluorescência com Q ou H. Dessa forma observa-se que

não há ainda um conhecimento adequado das regiões cromossômicas de *Aedes* que se marcam por bandamento C.

Outro problema é a variabilidade de marcação, por banda C, da região centromérica do cromossomo Y. A função da heterocromatina centromérica tem sido assunto de muitas especulações. Devido à sua ocorrência comum, uma das especulações iniciais, é a de que estaria relacionada de algum modo com a atividade cêntrica (John, 1988).

Para Sumner (1990, 1994) parte da heterocromatina centromérica parece estar associada aos cinetócoros e suas funções incluiriam o reconhecimento de centrômeros homólogos e pareamento meiótico, mantendo as cromátides irmãs unidas até a anáfase, e a proteção estrutural dos centrômeros e dos genes ribossômicos. No entanto, estas seriam apenas algumas funções e não poderiam explicar todo o papel da heterocromatina.

Os resultados de Bianchi (1971), para células de *Ae. albopictus*, revelou que a heterocromatina parece desempenhar algum papel no processo de pareamento somático e na associação dos cromossomos à membrana nuclear, além de estar envolvida com quebras cromossômicas.

Se a heterocromatina centromérica é crucial para o pareamento dos cromossomos homólogos, é de se supor que deleções da mesma deveriam levar a problemas de pareamento. Em *D. melanogaster*, cuja quantidade de heterocromatina foi modificada experimentalmente, deleções substanciais e rearranjos de blocos heterocromáticos não causaram qualquer efeito no pareamento de autossomos ou dos cromossomos X (revisão em John, 1988).

Vários autores (Hilliker *et al.*, 1980; Manuelidis, 1982 apud John, 1988) especularam que a heterocromatina pode desempenhar um papel importante na determinação da estrutura tri-dimensional do núcleo interfásico e afetar a expressão gênica, tanto diretamente quanto indiretamente. Um arranjo ordenado dos cromossomos nos núcleos interfásicos também foi proposto como meio pelo qual a atividade genética é coordenada dentro do genoma. A existência de cromocentros compostos, de pareamento ectópico e de "hot spots" para troca têm contribuído para

a opinião de que um arranjo cromossômico ordenado é parcialmente atribuível à associação não específica da heterocromatina.

No presente trabalho, durante a intérfase, um único corpúsculo heterocromático é geralmente visível e parece ser decorrente da associação das regiões heterocromáticas intercalares e centroméricas. A indicação desse fato é dada pela visualização de dois corpúsculos ligados, de tamanhos diferentes, em indivíduos heteromórficos para a banda intercalar e pela observação mais tardia, na prófase, de cinco corpúsculos separados, que corresponderiam às regiões centroméricas e intercalares. Uma das possibilidades funcionais dessa associação está relacionada com a síntese do nucléolo. Como foi observado nos cistócitos de ovário, o nucléolo se associa à banda C intercalar, mais especificamente ao seu segmento distal, o qual provavelmente abriga a região organizadora nucleolar. Essa observação suporta a diferenciação, observada por Wallace & Newton (1987) entre as regiões proximais e distais da banda intercalar do cromossomo X.

O envolvimento da heterocromatina no controle da síntese nucleolar foi demonstrado em *Drosophila hydei* em que a deleção de um segmento particular da heterocromatina do cromossomo X ou Y (portadores de RONS) leva a um aumento de 3 vezes no conteúdo de DNAr, nas células de gânglios cerebrais de larvas, nas células musculares torácicas de adultos, ou ambas, dependendo de qual porção da heterocromatina sexual tinha sido deletada. Isso indica que a heterocromatina sexual está envolvida, de alguma forma, no controle da replicação dos genes para RNAr, nessa espécie (Grimm *et al.*, 1984).

Em *Anopheles labranchiae* a heterocromatina também parece ter um papel funcional na sub-replicação do DNAr, embora outros fatores, provavelmente estejam também envolvidos (Marchi & Pili, 1994). Por outro lado, a sub-replicação não acontece em *Orthopodomyia pulcripalpis*, mas a heterocromatina pode estar relacionada à atividade transcricional. Nesse último mosquito, uma banda heterocromática, no cromossomo politênico 1, contém RNAr e está associada ao nucléolo de onde se estendem fibras e grânulos (Marchi & Pili, 1994).

Em *Sciara*, o sexo é determinado na sétima ou oitava clivagem da embriogênese, quando o indivíduo, cujo genoma é a soma de $3A+1X$ do óvulo e

3A+2X do espermatozóide, sofre eliminação de um ou ambos os cromossomos X paternos. Os cromossomos eliminados não se separam completamente e são perdidos no meio do fuso durante a anáfase. Esta eliminação seletiva é dependente de um elemento controlador presente em uma região heterocromática (H2) localizada ao lado do centrômero, no braço curto do cromossomo X. A região H2 também contém 50% dos cístrons de RNAr. Se essa região for transportada para os cromossomos II ou IV, estes sofrerão atraso na migração e eliminação, mas não se a mesma for transportada para o cromossomo III que já carrega um segmento heterocromático na extremidade proximal (Crouse, 1979).

Em uma série de trabalhos realizados em roedores, verificou-se que os cromossomos se separam, em seus centrômeros, em uma sequência geneticamente determinada e que a heterocromatina centromérica desempenha um papel fundamental no controle dessa sequência, sendo que a posição de um dado centrômero na sequência de separação é determinada pela interação entre os aspectos quantitativos e qualitativos da heterocromatina centromérica (Vig, 1982, 1983; Vig & Broccoli, 1988).

Em *Aedes*, cujos cromossomos apresentam pareamento somático característico, a presença ou ausência de heterocromatina centromérica, detectável por banda C, não parece interferir no grau de proximidade cromossômica, que se mostra, no par sexual, de forma semelhante ao dos demais pares de cromossomos, nos quais a presença daquela banda é constante, como verificamos no presente trabalho.

Por outro lado, ocorre grande variabilidade no conteúdo de heterocromatina dentro e entre espécies, aparentemente sem qualquer efeito fenotípico. Por exemplo, os mamíferos *Microtus agrestis* e *M. pennsylvanicus* apresentam 15% de diferença no conteúdo de heterocromatina e mesmo assim possuem características anatômicas idênticas e a distinção só é possível na presença de dados citológicos (Schmid, 1967 apud John, 1988). Também em espécies de *Triatoma* foram constatadas variações quanto à presença de heterocromatina, envolvendo perda ou ganho de regiões C-positivas (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997a).

De acordo com vários autores, a heterocromatina desempenharia um papel importante, na evolução de novos cariótipos e novas espécies, por facilitar rearranjos estruturais que subsequentemente levariam ao isolamento reprodutivo, e por conferir um mecanismo efetivo contra a hibridação (revisão em John, 1988).

É interessante destacar que no presente trabalho, as populações de Franca e de São José do Rio Preto diferiram quanto à presença de banda C no cromossomo Y, e dessa forma, essa banda constitui um aspecto da diferenciação das duas populações.

Estudando *Anopheles* do sudeste Asiático, Baimai *et al.* (1996), atribuíram ao ganho de heterocromatina um papel vital na evolução cromossômica e possivelmente no processo de especiação desses mosquitos.

Bonaccorsi *et al.* (1980), sugeriram que, em *Anopheles*, as diferenças no padrão de heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais podem estar relacionadas a diferentes respostas na capacidade vetorial de duas espécies intimamente relacionadas, *An. gambiae* e *An. arabiensis*. Se estas variações afetam as bases da susceptibilidade, então medidas para o controle de vetores devem considerar também esse aspecto.

A aplicação da técnica de impregnação pelo nitrato de prata nos mesmos órgãos de *Ae. aegypti*, analisados com bandamento C, mostrou alguns aspectos da atividade organizadora nucleolar, nesse organismo.

Embora a localização de regiões organizadoras nucleolares, pela prata, identifique os sítios de DNAr no cromossomo, é conhecido que a prata não se associa ao próprio DNAr ou ao RNAr, mas a proteínas específicas presentes nas regiões organizadoras nucleolares (Howell, 1975 apud Howell, 1977). Trata-se de proteínas ácidas não histônicas, as proteínas Ag-NOR (Goodpasture & Bloom, 1975; Howell, 1977; Olert *et al.*, 1979). Acredita-se que parte destas proteínas ribossômicas permaneçam em volta de RONS que estiveram ativas na interfase precedente (Miller *et al.*, 1976). No nucléolo, uma das principais proteínas que se coram pela prata é a C23, também chamada nucleolina que, diretamente ou indiretamente, está associada ao DNAr (Ochs & Busch, 1984). Existem outras proteínas envolvidas, como a fosfoproteína B23 (Hubbell *et al.*, 1979 apud Sumner,

1990) e a subunidade maior da RNA polimerase I (Rodrigo *et al.*, 1994); entretanto, há várias outras possíveis proteínas que ainda não foram adequadamente caracterizadas (Sumner, 1990).

Não se sabe, ao certo, qual o componente protéico responsável pela coloração. Buys & Osinga (1980) verificaram que grupos sulfidril e dissulfeto, de proteínas não histônicas, estavam envolvidos. Grupos carboxil de proteínas ácidas também têm sido implicados (Olert *et al.*, 1979; Buys & Osinga, 1984). Hubbell (1985) atribuiu possível ligação dos íons prata a grupos fosfato de certas fosfoproteínas.

Como mencionamos, proteínas nucleolares Ag-NOR positivas permanecem aderidas às regiões organizadoras nucleolares durante a mitose, sendo responsáveis pela impregnação pela prata nessas regiões dos cromossomos. Este material corado pela prata é considerado como restos das partes não cromossômicas do nucléolo (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

A quantidade de proteínas que se cora pela prata é indicativa da atividade dos genes ribossômicos e pode indicar o grau de atividade celular (Hubbell, 1985; Mello, 1997). Assim, células com intensa atividade sintética apresentam nucléolos maiores.

As células dos túbulos de Malpighi, como já foi mencionado, estão envolvidas com uma atividade fundamental na vida do inseto que é a economia de água. Esta atividade envolve trocas iônicas e a ação de receptores de membrana, além da ação de enzimas. Um dos aspectos de destaque na análise dessas células, realizada no presente trabalho, é o tamanho acentuado do nucléolo, ocupando uma extensa área do núcleo, reforçando a idéia de que a sua intensa atividade pode estar relacionada com a síntese de enzimas e receptores de membrana mencionados. O próprio fato dessas células apresentarem cromossomos endorreduplicados já é indicativo das altas taxas de atividade sintética necessárias para sua fisiologia.

Embora, na literatura, esses núcleos sejam considerados politênicos não foi possível obter preparações adequadas para sua análise, nas fases do desenvolvimento estudadas. Os filamentos cromossômicos se mostraram, na melhor

das hipóteses, altamente ligados por conexões ectópicas apresentando-se com aspecto de rede.

Também foram observadas alterações morfológicas no nucléolo, passando de uma estrutura compacta para uma estrutura mais difusa, acompanhando alterações do aspecto da cromatina, no sentido de apresentar uma organização mais “aberta”. Aparentemente, à medida em que a cromatina se estrutura em uma rede de filamentos, as regiões organizadoras nucleolares e os componentes nucleolares se separam e estes últimos se difundem no núcleo. As mesmas observações realizadas nas células primárias ocorrem também com as células estreladas, apesar da grande diferença de tamanho.

De acordo com Mathew & Rai (1976) que analisaram a ultraestrutura dos túbulos de Malpighi em *Ae. aegypti*, ambos os tipos celulares possuem características ultraestruturais envolvidas com o balanço iônico e a osmorregulação, incluindo extensos dobramentos basais e a diferenciação de um bordo em escova (microvilosidades). Nas células primárias ou principais, o citoplasma apresenta numerosos vacúolos, que não são visíveis nas células estreladas. Além dessa diferença, os referidos autores detectaram densa presença de mitocôndrias nas microvilosidades das células primárias, que também não foram encontradas nas células estreladas, observação que deve se relacionar com a diferença de funções entre elas.

O uso da impregnação pelo nitrato de prata, em ovários de pupas, no presente trabalho, mostrou padrões diferenciados de coloração do nucléolo, entre os cistócitos e as células intersticiais. Nestas últimas predomina o padrão de uma única marcação nucleolar. Já nos cistócitos há uma ou múltiplas marcações, de tamanhos variados, abrangendo, na sua totalidade, uma parte considerável do núcleo. Essas marcações são mais condensadas nos cistócitos em que a cromatina apresenta-se com um aspecto de granulação fina, e vão se tornando mais difusas e espalhadas à medida em que os cromossomos vão se visualizando no interior do núcleo. Nos núcleos em que a membrana já desapareceu, o material nucleolar aparece sob a forma de corpúsculos arredondados, variáveis em número e tamanho, aparentemente associados a diferentes regiões cromossômicas, como já foi mencionado.

Essa presença de grandes regiões nucleolares é indicativa de atividade sintética intensa. A correspondência entre intensidade de síntese ou atividade dos genes RNAr e grau de marcação pela prata é indicada por estudos em diversos organismos, como em vertebrados (Howell, 1977; Hofgärtner *et al.*, 1979; Buys *et al.*, 1979 apud Buys & Osinga, 1980) e insetos (Privitera, 1980; Lentzios & Stocker, 1979). Como já foi mencionado, ocorre síntese de RNA ribossômico (RNAr) em *Aedes*, tanto nos oócitos quanto nas células nutritivas, e na fase analisada, neste trabalho, a literatura informa que não é possível diferenciar esses dois tipos de células. Assim não se pode dizer se essa grande quantidade de RNAr caracteriza ou não os dois tipos de células. Porém, à vista de dados de outros organismos, acreditamos que essas células ricas em RNAr já estejam se diferenciando em células nutritivas. Os nossos resultados, obtidos com a utilização do nitrato de prata, revelaram uma única marcação densa e pequena numa porcentagem de cistócitos que corresponde à porcentagem esperada para o número de oócitos que se diferenciarão, em relação às células nutritivas (1:7). Assim os cistócitos que darão origem às células nutritivas já estariam, nessa fase, em maior atividade sintética, em relação aos cistócitos que darão origem a oócitos. Nesse caso teríamos um meio de diferenciar os 2 tipos de células com base neste aspecto.

Na literatura, o estudo da espermiogênese em *Ae. aegypti*, realizado através de microscopia eletrônica de transmissão, mostra que o núcleo das espermatogônias preenche quase toda a célula e possui um nucléolo localizado centralmente ou levemente acêntrico. No início do estágio de pupa, a maioria das espermatogônias aumenta em tamanho para se tornar espermatócitos primários. O núcleo de um espermatócito maduro é redondo ou triangular, com um grande nucléolo esférico (Krafsur & Jones, 1967).

Os resultados da aplicação da técnica de nitrato de prata nas células testiculares, obtidos no presente trabalho, revelaram uma única marcação nucleolar nos espermatócitos com núcleos arredondados e "triangulares". No entanto alguns núcleos menores apresentaram várias marcações nucleolares, indicando alta atividade sintética. Acreditamos que estes núcleos possam corresponder aos núcleos de espermatogônias, visto que estas aumentam em tamanho para se tornarem

espermátocitos. Os núcleos em início de zigóteno apresentam um único corpúsculo nucleolar marcado, associado a um só cromossomo através de um filamento. Estes resultados estão de acordo ao que foi descrito por Motara *et al.* (1985), que encontraram um único corpúsculo nucleolar nos núcleos em paquíteno e que, também apresenta pedúnculo. O corpúsculo marcado pela técnica de nitrato de prata, nas células testiculares, pode estar associado aos cromossomos sexuais, assim como foi visto nos núcleos de ovários, nesta mesma fase, em preparações tratadas com banda C, onde foi possível diferenciar esses cromossomos.

Uma única marcação nucleolar ocorreu na maioria das células interfásicas da região cefálica, nas células intersticiais do ovário e na maioria das células testiculares, sendo, portanto, indicativa da presença de um único nucléolo nestas células. No entanto, alguns núcleos da região cefálica apresentaram duas marcações nucleolares, refletindo, assim, atividade celular diferenciada. Um outro padrão de marcação pela prata foi encontrado em alguns núcleos presentes na região cefálica e em núcleos de células testiculares, como já mencionado, que apresentaram várias regiões coradas, com diferentes intensidades, e de tamanhos variáveis.

A aplicação da técnica de impregnação pelo nitrato de prata a células em divisão tem permitido a localização das regiões organizadoras nucleolares (RONs) em muitos organismos, incluindo alguns insetos, tais como grilos (Garcia *et al.*, 1997), besouros (Almeida *et al.*, 1997) e triatomíneos (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997b). Em outros insetos, porém, como por exemplo em *Drosophila*, essa marcação não tem sido obtida.

As tentativas de aplicar a técnica a cromossomos de *Ae. aegypti*, no presente trabalho, foram relativamente satisfatórias. Foram marcadas as regiões centroméricas como aconteceu com trabalhos anteriores, realizados no mesmo organismo, por Motara *et al.* (1985) e Wallace & Newton (1987). Mas em algumas células em divisão da região cefálica, o cromossomo X mostrou banda de nitrato de prata que parece estar localizada na mesma posição da banda C intercalar, à qual se liga o nucléolo, como observamos na análise de células ganglionares dessa região (Fig. 17) e em cistócitos do ovário (Fig. 25), reiterando a idéia de que essa região contém a RON no organismo analisado.

A tendência da prata corar as regiões centroméricas foi inicialmente notada por Goodpasture & Bloom (1975) em *Mus musculus*. A natureza precisa do material corado pela prata nas regiões centroméricas é desconhecida, embora, segundo os resultados de Buys & Osinga (1980) a deposição da prata pode ser devida a grupos sulfidril de proteínas associadas a essas regiões. Utsumi & Takehisa (1974) encontraram que algumas bandas heterocromáticas eram marcadas pela prata em cromossomos de plantas e sugeriram que as histonas presentes nas regiões heterocromáticas estavam sendo coradas e que estas diferiam das histonas da eucromatina. Howell & Denton (1974) aplicaram a técnica de coloração pela prata, com modificações, para corar a heterocromatina do cromossomo 9 humano e acreditaram que a prata estava reagindo com proteínas não histônicas. Outra explicação possível para a marcação nas regiões centroméricas de todos os cromossomos é que a prata estaria corando o cinetócoro, que, na maioria dos organismos, é um complexo multiprotéico que pode ser visto em microscopia eletrônica como uma estrutura trilaminar (Alberts, 1994). Segundo Sumner (1990), esses trabalhos apenas indicaram que as proteínas da heterocromatina são distintas daquelas da eucromatina.

Contudo, não se pode descartar algum envolvimento das regiões centroméricas com a síntese do nucléolo. Como vimos na análise do bandamento C, as regiões heterocromáticas, na intérfase, parecem estar todas associadas e essa associação incluiria as regiões centroméricas e a região de banda C intercalar tida como local portador dos cístrons ribossômicos, e mesmo o material nucleolar.

Em células interfásicas humanas, o nucléolo é frequentemente visto em associação com a heterocromatina dos cromossomos 1 e 9. A prevalência de tais associações levou à sugestão de que as regiões heterocromáticas desses cromossomos participem da elaboração dos constituintes nucleolares (Stahl *et al.*, 1976 apud Tuck-Muller, 1984). A associação entre nucléolo e heterocromatina também foi relatada em células meióticas (Stahl *et al.*, 1975; Driscoll *et al.*, 1979).

Motara *et al.* (1985), utilizando a técnica de impregnação pelo nitrato de prata, obtiveram também, em *Ae. aegypti*, marcações correspondentes às regiões pericentroméricas de todos os cromossomos e uma marcação intercalar no

cromossomo X correspondente à posição da banda C intercalar. Wallace & Newton (1987), utilizando a mesma técnica, obtiveram marcações apenas nas regiões centroméricas de todos os cromossomos desse mesmo organismo.

No presente trabalho, obtivemos ambos os resultados, porém a marcação intercalar no cromossomo X foi encontrada em um pequeno número de células.

Motara *et al.* (1985) atribuíram a coloração pela prata, nas 6 regiões centroméricas de todos os 3 pares de cromossomos e na região intercalar do X, à heterocromatina. Entretanto o cromossomo Y, pela técnica de bandamento C não mostrou nenhuma marcação na região centromérica e os autores explicaram essa diferença pela possibilidade de haver dois tipos de heterocromatina, nesta espécie.

Wallace & Newton (1987) atribuíram a marcação do centrômero, em todos os cromossomos, aos grupos sulfidril de proteínas adjacentes a essa região. Os autores descartaram a possibilidade da prata corar os cinetócoros devido à obtenção de uma marcação única sobre cada par cromossômico.

No presente trabalho obtivemos marcações únicas e duplas sobre cada par cromossômico. Por exemplo, nas figuras 13C, 17A, 14A-E de gânglios cerebrais e 23A-C de ovário, observamos marcações duplas em cada par cromossômico. No entanto, em outras células tais como na figura 14F de gânglio cerebral e 30E-G de testículo, essa marcação aparece única sobre cada par. O pareamento somático, que ocorre com maior ou menor intensidade, pode explicar a presença de marcações únicas ou duplas, respectivamente, sobre os pares cromossômicos.

Até 1989 a única informação sobre a localização cromossômica da região organizadora nucleolar, em *Ae. aegypti*, era a de que estaria presente em um local do cromossomo 3 que se cora mais levemente com corantes convencionais, conhecida como uma região de constrição secundária (McDonald & Rai, 1970). A associação de constrição secundária e região organizadora nucleolar é comum em vários organismos (Henderson *et al.*, 1972, 1974; Hsu *et al.*, 1975; Pardue & Hsu, 1975), porém, não se confirmou para *Ae. aegypti* nos experimentos de hibridização “in situ”.

A localização do organizador nucleolar em um dos braços do cromossomo X, como demonstrado, no presente trabalho, pela associação do nucléolo à região de

banda C intercalar, nos citócitos de ovário e em núcleos em prófase da região cefálica, está de acordo com as observações de Kumar & Rai (1990) obtidas por hibridização “in situ” para genes ribossômicos em cromossomos metafásicos de gânglios cerebrais da mesma espécie. Em outras espécies de *Aedes*, a região organizadora nucleolar foi encontrada só no par 2, só no par 3 ou nos pares 1 e 3 (Kumar & Rai, 1990; Marchi & Pili, 1994).

A hibridização “in situ” com uma sonda de DNAr marcada com 3H em espécies pertencentes a 8 gêneros de mosquitos, mostrou que a maioria delas apresenta um só organizador nucleolar. Os genes ribossômicos estavam situados no cromossomo 1 na maioria das espécies de *Aedes*, em *Culex quinquefasciatus*, *Sabethes cyaneus* e *Wyeomyia smithii*; no cromossomo 2 em *Ae. mediovittatus* e *Haemagogus equinus*; e no cromossomo 3 em *Armigeres subalbatus* e *Tripteroides bambusa*. Em *Ae. triseriatus*, a sonda hibridizou com os cromossomos 1 e 3 e em *Anopheles quadrimaculatus* com os cromossomos X e Y, justamente na região heterocromática de ambos os cromossomos (Kumar & Rai, 1990). Embora a localização dos genes ribossômicos não seja conhecida para todas as espécies de mosquitos, os resultados obtidos por Marchi & Pili (1994) e Kumar & Rai (1990), com hibridização “in situ”, sugerem sua localização preferencial nos cromossomos sexuais, principalmente dentro de regiões heterocromáticas ou adjacentes a ela.

Nos eucariotos superiores, os genes ribossômicos estão presentes em múltiplas cópias em uma ou mais regiões dos cromossomos, denominadas regiões organizadoras nucleolares. Ritossa & Spiegelman (1965) foram os primeiros a estabelecer a relação entre o número de regiões organizadoras nucleolares e o número de sítios de grupos gênicos ribossômicos codificando para moléculas de RNAr 18S e 28S em *Drosophila melanogaster*. Os genes que codificam RNA ribossômico 18S, 5,8S, 28S em *Ae. aegypti* estão agrupados e têm sequências repetidas em “tandem” como todos os outros organismos eucariotos (Gale & Crampton, 1989). Em *Ae. aegypti*, o número de cópias de genes RNAr por genoma haplóide, estimado para o estágio de larva, é de 350 a 500 e cerca de 1200 cópias nas pupas e adultos. Esse aumento foi verificado em fêmeas e machos dessa espécie (Park & Fallon, 1990).

A estrutura e evolução dos genes RNAr em insetos é de grande interesse devido a propriedades incomuns que têm sido identificadas neste grupo de organismos. A replicação dos genes RNAr parece ser regulada independentemente do resto do genoma em tecidos de insetos tais como ovário (nas células nutritivas), bem como em outros tecidos que contém núcleos politênicos ou poliplóides, tais como glândula salivar e corpo gorduroso (Kunz *et al.*, 1982 apud Park & Fallon, 1990).

Em uma célula, o número de nucléolos pode corresponder ao número de cromossomos portadores de regiões organizadoras nucleolares, ou esses cromossomos podem associar-se para formar um só nucléolo. Nas preparações metafásicas mitóticas de cromossomos humanos, esse tipo de associação é frequente e é denominada associação satélite, por envolver as regiões satélites dos cromossomos acrocêntricos (Ferguson-Smith & Handmaker, 1961). Os cromossomos associados nas preparações metafásicas são conectados por filamentos nucleoprotéicos que se estendem entre as RONS, ou por restos do nucléolo. Essas associações são consideradas remanescentes da relação desses cromossomos com o nucléolo. Os filamentos que conectam os cromossomos associados contém DNAr (Henderson *et al.*, 1973).

A demanda celular de grandes quantidades de RNA, está, muitas vezes, associada à presença de multinúcléolos. No ortóptero *Apotetamenus sp.* existem 2 RONS, mas, vários nucléolos pequenos proliferam durante a ovogênese originando posteriormente um nucléolo bem desenvolvido (Levada, 1992).

No presente trabalho, também encontramos nucléolos múltiplos em cystócitos de ovário. Não foi possível estabelecer associação desses corpúsculos nucleolares com locais específicos dos cromossomos, porém, em células tratadas com a técnica de bandamento C, em que houve marcação de uma região intercalar do cromossomo X, o corpúsculo nucleolar, que pelo seu tamanho pode ser considerado o nucléolo principal, associa-se claramente a essa região. Essa região marcada positivamente com banda C, dista do centrômero aproximadamente $1/3$ do comprimento do braço. Em algumas células em que é possível ver que essa região é composta de 2 cromômeros, o corpúsculo nucleolar se associa ao mais distal. Essas observações

sugerem, como hipótese, que essa região seja o organizador nucleolar “principal” e que nas células portadoras de múltiplos nucléolos, outras regiões possam estar atuando como organizadores nucleolares secundários, em virtude de demanda aumentada de RNA ribossômico para as atividades sintéticas celulares. Não se descarta, também, a hipótese de amplificação do DNAr.

A ativação de organizadores nucleolares secundários, suposta no presente trabalho, encontra respaldo em trabalhos realizados com outros organismos como é o caso, encontrado em glândulas salivares, de espécies do complexo Mulleri de *Drosophila* (Bicudo, 1982b).

O aumento da atividade sintética nas RONS, a ativação de organizadores nucleolares secundários ou mesmo a amplificação de DNAr, são mecanismos reguladores presentes na fase de formação do oócito em vários organismos (Miller & Beatty, 1969; Brown & Dawid, 1968; Stahl *et al.*, 1975).

O caso clássico de amplificação de cístrons ribossômicos durante a ovogênese foi descrito em *Xenopus*, em que há presença de um nucléolo nas células interfásicas e ao redor de 1000 nucléolos nos oócitos, em prófase I da meiose (Brown & Dawid, 1968; Miller & Beatty, 1969).

No que se refere às anomalias cromossômicas observadas, no presente trabalho, as alterações numéricas (poliploidia) podem ter sido ocasionadas pelo uso da colchicina para bloquear as células na metáfase. Porém outras anomalias como “gaps” e cromossomos morfológicamente alterados podem estar realmente presentes na população, pois já foram encontradas anteriormente, na mesma, por Lima-Catelani & Bicudo (1994) sem uso do alcalóide, tendo sido atribuídas, dada a sua alta frequência, ao uso de inseticidas para o controle populacional do mosquito. No presente estudo, o número e a frequência de alterações encontradas foi bem menor que no trabalho de Lima-Catelani & Bicudo (1994), provavelmente devido à eliminação de pulverizações ambientais com organofosforados, anteriormente realizadas pela SUCEN.

Na literatura, foram relatados “satélites” ou elementos cromossômicos extras, semelhantes às estruturas observadas no presente trabalho, durante a prófase, em mosquitos tais como *Orthopodomyia* e *toxorhynchites* (Breland, 1961; Kitzmiller,

1963), em *Psophora signipennis* (Mukherjee *et al.*, 1970), e também em *Ae. atropalpus* (Rai, 1963) e *Ae. vittatus* (Rai, 1966). Esses satélites, entretanto, não foram encontrados, pelos pesquisadores mencionados, na metáfase; Breland (1961) propôs que eles se tornam invisíveis após a prófase devido à extrema condensação dos cromossomos metafásicos. No presente trabalho encontramos satélites em cromossomos metafásicos constituindo, portanto, uma alteração rara nesse material.

Nos cromossomos em prófase mitótica de testículos e ovários, no presente trabalho, encontramos quebras, que aparentemente estavam associadas à constrição secundária no cromossomo 3. Este tipo de alteração foi encontrado, com frequência, em células em cultura de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* que apresentavam um grande número de outras anormalidades, por Bianchi *et al.* (1972b). Uma possível explicação para sua ocorrência, é que representem uma porção do braço cromossômico do par 3, quebrado na região de constrição secundária, que apresenta maior fragilidade.

De modo geral, os autores reconhecem que as populações de *Ae. aegypti* podem variar em sua morfologia, ecologia, fisiologia e genética (Machado-Allison & Craig, 1972, McClelland, 1974 apud Jupp *et al.*, 1991; Trpis & Hausermann, 1975; Tabachnick *et al.*, 1979, 1985; Ballinger-Crabtree *et al.*, 1992). Assim, é importante aprofundar o conhecimento biológico desse culicídeo, para se obter melhores perspectivas de controle e sucesso nas campanhas de erradicação. Com esse objetivo, estudos envolvendo a diferenciação de populações, bem como a análise de espécies intimamente relacionadas são muito importantes. Conhecimentos biológicos básicos podem mostrar diferenças que refletem a variabilidade existente entre populações quanto à capacidade vetorial, não só de *Ae. aegypti*, mas também de *Ae. albopictus* e outras espécies vetores potenciais, e eventualmente contribuir para o desenvolvimento de métodos visando ao bloqueio da transmissão de vírus. Portanto, esses trabalhos devem ter continuidade.

V- RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo básico deste trabalho foi o de contribuir para o conhecimento da biologia de *Ae. aegypti*. Foram estudados aspectos citogenéticos que auxiliaram na caracterização cromossômica, bem como da atividade organizadora nucleolar, em alguns órgãos, abrangendo cérebro, gônadas e túbulos de Malpighi. Analisamos principalmente amostras de São José do Rio Preto, mas também, algumas amostras de Franca. As técnicas utilizadas foram a coloração com orceína-lacto-acética, Feulgen e predominantemente nitrato de prata e bandamento C. Os dados mostraram, basicamente, o seguinte:

1. O bandamento C, em todos os tecidos estudados, revelou um padrão de heterocromatina, nas células interfásicas comum a todos, constituído por uma única marcação C-positiva. As observações sugerem que essa marcação representa a junção das regiões heterocromáticas do todos os cromossomos para o desempenho de atividades específicas, incluindo, provavelmente a síntese nucleolar.

2. O bandamento C, aplicado aos cromossomos, permitiu diferenciar o padrão de marcação entre *Ae. aegypti* de São José do Rio Preto e Franca. Os cromossomos 2, 3 e X apresentaram bandas centroméricas, sendo mais intensamente evidenciadas nesse último. Uma leve marcação centromérica no cromossomo Y foi encontrada em algumas células de indivíduos da população de São José do Rio Preto, porém não foi encontrada em nenhum indivíduo da população de Franca. O cromossomo X das duas populações e o cromossomo Y de todos os indivíduos analisados da população de São José do Rio Preto apresentaram uma banda intercalar em um dos braços, que variou em intensidade de coloração e largura. Também observamos a presença, não constante, de banda intercalar no cromossomo 3, na região de constrição secundária. Essa banda foi constatada, até o presente, somente nessas duas populações brasileiras, como mostra a comparação desses dados com os de outras populações de *Ae. aegypti* da África, Índia, Tailândia e U.S.A., analisadas anteriormente por outros autores. Também foram constatadas,

nessa comparação, diferenças interpopulacionais quanto a presença ou ausência de banda centromérica e intercalar, nos cromossomos sexuais.

3. As células em divisão dos cistócitos do ovário, submetidas à técnica de bandamento C, mostraram associação do nucléolo à região intercalar C-positiva do cromossomo X, indicando a localização da RON na região distal dessa banda.

4. As colorações com orceína lacto-acética e Feulgen, aplicada aos túbulos de Malpighi nos permitiram observar diferentes graus de condensação e organização da cromatina e tamanhos nucleares, nas células primárias, principalmente provavelmente refletindo graus de atividade celular diferentes.

5. O uso da impregnanção pelo nitrato de prata revelou uma única marcação nucleolar na maioria das células da região cefálica, nas células intersticiais do ovário e na maioria das células testiculares, indicando a presença de um único nucléolo. Alguns núcleos da região cefálica apresentaram duas marcações nucleolares, indicando provável atividade celular diferenciada. Outro padrão de marcação pela prata foi encontrado em alguns núcleos presentes na região cefálica e em núcleos de células testiculares. Esses núcleos apresentaram múltiplas regiões coradas, com intensidades de coloração e tamanhos variáveis.

6- Os túbulos de Malpighi apresentaram nos núcleos das suas células, uma grande área marcada, pela técnica de impregnanção pelo nitrato de prata, indicando, em virtude da grande massa nucleolar, que ela representa, atividade celular intensa, abrangendo tanto as células primárias como as estreladas.

7. A utilização do nitrato de prata em cistócitos de ovário revelou basicamente dois padrões de coloração: uma única marcação densa e pequena, ou múltiplas marcações abrangendo uma parte considerável do núcleo. Ambas foram observadas em porcentagens de cistócitos que correspondem às porcentagens esperadas para o número de oócitos que se diferenciarão, em relação às células

nutritivas (1:7). Assim, admitimos que essa diferença morfológica possa, eventualmente, ser utilizada para permitir a diferenciação dos dois tipos de células, nas fases do desenvolvimento anteriores à emergência, nas quais essa diferenciação é atualmente considerada não ser possível.

8. O nitrato de prata aplicado aos cromossomos de *Ae. aegypti* impregnou as regiões centroméricas dos 6 cromossomos, incluindo o X e o Y, e em algumas células de alguns indivíduos, também a região intercalar do cromossomo X, correspondente à região de banda C intercalar. Esses dados reforçaram a idéia de localização do organizador nucleolar nessa região heterocromática intercalar do X. Além disso, como vimos, tanto em lâminas coradas com bandas C (cistócitos) como com nitrato de prata (região cefálica) foi possível observar um corpúsculo nucleolar associado àquela região, mais especificamente à sua porção distal.

2- The C-banding pattern of the *Ae. aegypti* population from São José do Rio Preto differed from that from Franca. The chromosomes 2, 3 and X showed centromeric C-bands. A slightly stained centromeric band in the Y chromosome was observed in some individuals from São José do Rio Preto, but was absent in the Franca population. The X chromosome in both populations, and the Y chromosome of all individuals examined from São José do Rio Preto showed an intercalary band in one of the arms. This band varied in size, width, and staining intensity. An intercalary band, lying on the secondary constriction of chromosome 3, was also present in some mosquitoes of both populations. This band has not been reported previously. The comparison of the present data with data obtained in populations of *Ae. aegypti* from Africa, India, Thailand and U.S.A. also showed differences as to the presence or absence of the centromeric and interstitial bands in sex chromosomes.

3- C-banding analysis in ovary cystocytes showed an association of the nucleolus to the distal region of the intercalary C-band in the X chromosome. This

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The aim of the present study was basically to contribute to the knowledge of *Ae. aegypti* biology. We studied cytogenetic aspects, comprising chromosomal and nucleolar characterization, in brain, testes, ovary and Malpighian tubules. The staining techniques used were lacto-acetic orcein, Feulgen, and mainly Ag-staining and C-banding. We analysed samples of *Ae. aegypti* from São José do Rio Preto and Franca, the former being more numerous than the second.

The data showed basically the following:

1- C-banding technique revealed a single heterochromatic small body in the interphasic cells of all tissues studied. The observations suggested that the heterochromatic regions of all chromosomes are joined to constitute the single C-banded body in interphase cells.

2- The C-banding pattern of the *Ae. aegypti* population from São José do Rio Preto differed from that from Franca. The chromosomes 2, 3 and X showed centromeric C-bands. A slightly stained centromeric band in the Y chromosome was observed in some individuals from São José do Rio Preto, but was absent in the Franca population. The X chromosome in both populations, and the Y chromosome of all individuals examined from São José do Rio Preto showed an intercalary band in one of the arms. This band varied in size, width, and staining intensity. An intercalary band, lying on the secondary constriction of chromosome 3, was also present in some mosquitoes of both populations. This band has not been reported previously. The comparison of the present data with data obtained in populations of *Ae. aegypti* from África, Índia, Tailândia and U.S.A. also showed differences as to the presence or absence of the centromeric and interstitial bands in sex chromosomes.

3- C-banding analysis in ovary cystocytes showed an association of the nucleolus to the distal region of the intercalary C-band in the X chromosome. This



observation indicates location of the nucleolus organizer region in that part of the mentioned band.

4- Lacto-acetic orcein and Feulgen applied to the Malpighian tubules allowed us to observe different levels of condensation and organization of the chromatin and different nuclear sizes suggesting different degrees of cell activity.

5- Silver staining in interphase cells was restricted to a single nucleolar body, in most of the cells from brain and testes and in ovary interstitial cells. Some brain nuclei showed two stained regions. Another pattern of silver staining was detected in brain and testis cells that exhibited several stained bodies which varied in staining degree and size.

6- The nuclei of the Malpighian tubule cells stained with silver nitrate showed a single large nucleolar body, reflecting an intense activity in both primary and stellate cells.

7- Silver staining in ovary cystocytes showed two basic patterns: (1) one single compact small body and (2) multiple bodies encompassing great nuclear areas. Their percentages were as expected for the ratio number of oocytes: number of nurse cells, suggesting the possibility of eventually using such a morphological difference to recognize both cell types in developmental stages before emergence.

8- Silver nitrate staining in metaphase chromosomes showed centromeric bands in all of the six chromosomes, including X and Y. In some individuals, the X chromosome also showed an intercalary band in the same place where an intercalary C-band was detected.



VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. New York: Garland Publishing, Inc., 1994. 1294p.
- ALMEIDA, M. C. *et al.* *Epicauta grammica* (Coleoptera, Polyphaga, Meloidae): sex determination system, C-banding pattern and NOR-bearing chromosomes. **Rev. Bras. Genet.**, v.20, n.3, suppl., p.68, 1997.
- ALVES, M. C. G. P., GURGEL, S. M., ALMEIDA, M. C. R. R. Plano amostral para cálculo de densidade larvária de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.25, n.4, p.251-256, 1991.
- ANNIS, B. *et al.* Supression of larval *Aedes aegypti* populations in household water storage containers in Jakarta, Indonesia, through releases of fish instar *Toxorhynchites splendens* larvae. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v.5, p.235-238, 1989.
- ANNIS, B. *et al.* *Toxorhynchites amboinensis* larval released in domestic containers fail to control vectors in a rural village in Central Java. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v.6, p.75-78, 1990.
- BAIMAI, V., KIJCHALAO, U., RATTANARITHIKUL, R. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and southeast Asia: V. The *Myzomyia* series, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v.12, n.1, p.97-105, 1996.
- BALLINGER-CRABTREE, M. E., BLACK IV, W. C., MILLER, B. R. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.47, n.6, p.893-901, 1992.
- BARBOSA, M. L. Dengue: Revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.56, n.1, p.27-45, 1996.
- BERTRAM, D.S. The ovary and ovarioles of mosquitos. In: DETINOVA, T. S. **Age-grouping methods in Diptera of medical importance**. Geneva: World Health Organization, 1962. p.195-204.



- BESANSKY, N. J., COLLINS, F. H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol. Today**, v.8, n.6, 1992.
- BHALLA, S. C. Meiotic behavior of diploid and tetraploid *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v.31, n.3, p.397-401, 1971.
- BIANCHI, N. O., SWEET, B. H., AYRES, J. Heterochromatin in cells derived from *Aedes albopictus* (Skuse) mosquito tissue culture. **Exp. Cell Res.**, v.69, p.236-239, 1971.
- BIANCHI, N. O., SWEET, B. H., AYRES, J. P. Chromosome characterization of three cell lines derived from *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.) (36409). **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.140, p.130-134, 1972a.
- BIANCHI, N. O., BIANCHI, M. S., SWEET, B. H. Chromosome replication in cells of a continuous line derived from *Aedes albopictus* (Skuse) larvae. **Experientia**, v.28, n.12, p.1495-1496, 1972b.
- BICUDO, H. E. M. C. Silver staining and the nucleolar organizing activity in *Drosophila* species of the Mulleri complex and their hybrids. **Rev. Bras. Genet.**, v.1, p.31-50, 1982a.
- BICUDO, H. E. M. C. Estudos citogenéticos de espécies de *Drosophila* do Complexo Mulleri (Grupo Repleta). A regulação da atividade organizadora nucleolar. São José do Rio Preto: UNESP/IBILCE, 1982b. 208p. (Série monografias, teses e dissertações, 1).
- BICUDO, H. E. M. C., RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis*, and their hybrids: The nucleolar organizer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.74, p.3498-3502, 1977.
- BONACCORSI, S. *et al.* Intraspecific polymorphism of sex chromosome heterochromatin in two species of the *Anopheles gambiae* complex. **Chromosoma**, v.76, p.57-64, 1980.
- BOQUIST, L. L. V. Nucleolar organizer regions in normal, hyperplastic and neoplastic parathyroid glands. **Virchows Arch. A Pathol. Anat.**, v.417, p.237-241, 1990.
- BRELAND, O. P. Studies on the chromosomes of mosquitoes. **Ann. Ent. Soc. Am.**, v.54, p.360-375, 1961.



- BROWN, D. D., DAWID, I. B. Specific gene amplification in oocytes. **Science**, v.160, p.272-280, 1968.
- BROWN, S. W. Heterochromatin. **Science**, v.151, p.417-425, 1966.
- BUYS, C. H. C. M., OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. **Chromosoma**, v.77, p.1-11, 1980.
- BUYS, C. H. C. M., OSINGA, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. **Chromosoma**, v.89, p.387-396, 1984.
- CHEN, W. C. *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in Orally and parenterally infected mosquitoes. **J. Med. Entomol.**, v.30, n.3, p.524-530, 1993.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction.** London: CHAPMAN & HALL, 1992. v.1, 509p.
- CRAIG JR., G. B., HICKEY, W. A., VANDEHEY, R. C. An inherited male-producing factor in *Aedes aegypti*. **Science**, v.132, p.1887-1889, 1960.
- CROUSE, H. V. X heterochromatin subdivision and cytogenetic analysis in *Sciara coprophila* (Diptera, Sciaridae). II. The controlling element. **Chromosoma**, v.74, p.219-239, 1979.
- DARNE, J. F. *et al.* Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma in situ and invasive adenocarcinoma of the cervix. **J. Clin. Pathol.**, v.43, p.657-660, 1990.
- DEMEREC, M., KAUFMANN, B. P. **Drosophila guide.** Baltimore: Baltimore Press, 1945.
- DERENZINI, M. *et al.* Ultrastructural organization of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. **Virchows Arch. B Cell Pathol.**, v.52, p.343-352, 1986.
- DERENZINI, M., BETTS, C. M. Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumors. **Ultrastruct. Pathol.**, v.14, p.223-245, 1990.

- DERENZINI, M., PESSION, A., TRERE, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab. Invest.**, v.63, n.1, p.137-140, 1990.
- DRISCOLL, D. J., PALMER, C. G., MELMAN, C. Nonhomologous associations of C-heterochromatin at human male meiotic prophase. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.23, p.23-32, 1979.
- FERGUSON-SMITH, M. A., HANDMAKER, D. Observation on satellited human chromosomes. **Lancet**, v.1, p.638-640, 1961.
- FIGUEIREDO, L. T. *et al.* Encuesta serológica sobre el dengue en Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. **Bol. Of. Sanit. Panam.**, v.118, n.6, p.499-509, 1995.
- FILL, A. Structural and functional modifications of the nucleus during oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Cell Sci.**, v.14, p.51-67, 1974.
- ✱ FORATTINI, O. P. Gêneros *Aedes* e *Psorophora*. In _____. **Entomologia médica: Culicini: Culex, Aedes e Psorophora**. São Paulo: EDUSP, 1965. v.2, cap.2, p.230-496.
- FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.20, n.3, p.244-245, 1986.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: EDUSP, 1996. v.1, 548p.
- FRENCH, W. L., BAKER, R. H., KITZMILLER, J. B. Preparation of mosquito chromosomes. **Mosq. News**, v.22, n.4, p.377-383, 1962.
- GALE, K., CRAMPTON, J. The ribosomal genes of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Eur. J. Biochem.**, v.185, p.311-317, 1989.
- GARCIA, P. C., KASAHARA, S., MESA, A. Karyotype and banding in a new species of *Anurogryllus* (Orthoptera, Gryllydae). **Rev. Bras. Genet.**, v.20, n.3, suppl., p.65, 1997.
- GILLHAM, N. W. Genetic studies in *Aedes*. I- The distribution of polytene chromosomes in *Aedes aegypti*. **Am. Nat.**, v.91, n.859, p.265-268, 1957.
- GONÇALVES, N. Rio Preto tem o primeiro caso de dengue hemorrágica. **Diário da Região**, São José do Rio Preto, 15 fev. 1997. Cidades, p.7.

- GOODPASTURE, C., BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organiser regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, v.53, p.37-50, 1975.
- GRATZ, N. G. What must we do to effectively control *Aedes aegypti*. **Trop. Med.**, v.35, n.4, p.243-251, 1993.
- GRATZ, N. G., JANY, W. C. What role for insecticides in vector control programs? **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, n.6, p.11-20, 1994.
- GRIMM, C., KUNS, W., FRANZ, G. The organ-specific rRNA gene number in *Drosophila hydei* is controlled by sex heterochromatin. **Chromosoma**, v.89, p.48-54, 1984.
- GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: Top down or bottom up. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.40, n.6, p.571-578, 1989.
- GUBLER, D. J., TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect. Agents Dis.**, v.2, p.383-393, 1994.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v.239, n.4839, p.476-481, 1988.
- HENDERSON, A. S., WARBURTON, D., ATWOOD, K. C. Location of ribosomal RNA in the human chromosome complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.68, p.3394-3398, 1972.
- HENDERSON, A. S., WARBURTON, D., ATWOOD, K. C. Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. **Nature**, v.245, p.95-97, 1973.
- HENDERSON, A. S. *et al.* The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. **Chromosoma**, v.49, p.155-160, 1974.
- HERRERA-BASTO, E. *et al.* First reported outbreak of classical dengue fever at 1700 meters above sea level in guerrero state, Mexico, June 1988. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.46, n.6, p.649-653, 1992.
- HILLIKER, A. J., APPELS, R., SCHALET, A. The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin. **Cell**, v.21, n.3, p.607-619, 1980.

- HOFGÄRTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, W. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analysed by silver-staining. **Chromosoma**, v.71, p.197-216, 1979.
- HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, v.62, p.361-7, 1977.
- HOWELL, W. M., DENTON, T. E. An ammoniacal silver stain technique for satellite III DNA regions on human chromosomes. **Experientia**, v.30, p.1364-1365, 1974.
- HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I step method. **Experientia**, v.36, p.104-105, 1980.
- HSU, T. C. *et al.* Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, v.53, p.25-36, 1975.
- HUBBELL, H. R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Technol.**, v.60, n.5, p.285-294, 1985.
- JAMES, A. A. Dengue hemorrhagic fever. **Science**, v.272, p.829, 1996.
- JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: VERMA, R.S. **Heterochromatin: Molecular and structural aspects**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p.1-147.
- JOHN, B., MIKLOS, G. L. G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. **Int. Rev. Cytol.**, v.58, p.01-114, 1979.
- JONES, J. C. The feeding behavior of mosquitoes. **Sci. Am.**, v.238, p.112-120, 1978.
- JUPP, P. G., KEMP, A., FRANGOS, C. The potential for dengue in South Africa: morphology and the taxonomic status of *Aedes aegypti* populations. **Mosq. Syst.**, v.23, n.3, p.182-190, 1991.
- KEMP, A., JUPP, P. G. Potential for dengue in South Africa: mosquito ecology with particular reference to *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v.7, n.4, p.574-583, 1991.



- KITZMILLER, J. B. Mosquito cytogenetics. A review of the literature, 1953-62. **Bull. W. H. O.**, v.29, p.345-355, 1963.
- KRAFSUR, E. S., JONES, J. C. Spermiogenesis in *Aedes aegypti* (L.). **Cytologia**, v.32, n.2/3, p.450-462, 1967.
- KREUTZER, R. D. A mosquito with eight chromosomes: *Chagasia bathana* dyar. **Mosq. News**, v.38, n.4, p.554-558, 1978.
- KUMAR, A., RAI, K. S. Chromosomal localization and copy number of 18S+28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). **Hereditas**, v.113, p.277-289, 1990.
- LEDUC, J. Global situation of dengue haemorrhagic fever. **Trop. Med.**, v.36, n.4, p.118-121, 1994.
- LENTZIOS, G., STOCKER, A. J. Nucleolar relationships in some Australian *Chironomus* species. **Chromosoma**, v.73, p.235-258, 1979.
- LEVADA, M. M. O. Desenvolvimento ovariano: ovogênese e aspectos citológicos da partenogênese de *Apotetamenus* sp (Henicidae: Orthoptera). Rio Claro, 1992. 128p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA, J. T. F. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.1, n.3, p.377-384, 1985.
- LIMA-CATELANI, A. R. A., BICUDO, H. E. M. C. Chromosome studies in two Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Cytobios**, v.79, p.241-251, 1994.
- MACHADO-ALLISON, C. E., CRAIG, G. B. Geografic variation in resistance to desiccation in *Aedes aegypti* and *Ae. atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.65, p.542-547, 1972.
- MARCHI, A., RAI, K. S. Chromosomes banding homologies in three species of *Aedes* (*Stegomyia*). **Can. J. Genet. Cytol.**, v.28, p.198-202, 1986.
- MARCHI, A., PILI, E. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Heredity**, v.72, p.599-605, 1994.
- MARQUES, C. C. A. *et al.* Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. **Rev. Saúde Pública**, v.27, n.4, p.237-241, 1993.

- MARZOCHI, K. B. F. Dengue- a mais nova epidemia "de estimação". **Cad. Saúde Pública**, v. 2, n.3, p.133-141, 1987.
- MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil - situation, transmission and control - A proposal for ecological control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.89, n.2, p.235-245, 1994.
- MATHEW, G., RAI, K. S. Fine structure of the Malpighian tubule in *Aedes aegypti*. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.69, n.4, p.659-661, 1976.
- MATTHEWS, T. C., MUNSTERMANN, L. E. Chromosomal repatterning and linkage group conservation in mosquito karyotypic evolution. **Evolution**, v.48, n.1, p.146-154, 1994.
- McDONALD, P. T., RAI, K. S. Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito, *Aedes aegypti*. **Genetics**, v.66, n.3, p.475-485, 1970.
- MELLO, M. L. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Rev. Bras. Genet.**, v.20, n.2, p.257-264, 1997.
- MESCHER SR., A. L., RAI, K. S. Spermatogenesis in *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v.26, n.1, 1966.
- MILLER, B. R., BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, p.476-477, 1988.
- MILLER, D. A. *et al.* Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse human somatic cell hybrid cells. **Exp. Cell Res.**, v.101, p.235-243, 1976.
- MILLER, D. A. *et al.* Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. **Am. J. Hum. Genet.**, v.29, p.490-502, 1977.
- MILLER, O. L. JR., BEATTY, B. R. Extrachromosomal nucleolar genes in amphibian oocytes. **Genetics**, v.61, p.133-143, 1969.
- MONATH, T. P. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Virology**, v.5, p.133-145, 1994a.
- MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.2395-2400, 1994b.

- MONDET, B., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., VASCONCELOS, P. F. Les risques d'épidémisation urbaine de la fièvre jaune au Brésil par les vecteurs de la dengué *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.89, n.2, p.107-113, 1996.
- MOTARA, M. A. Fine structure of the mosquito sex locus. **Nucleus**, v.25, n.3, p.113-116, 1982a.
- MOTARA, M. A. Giemsa C-banding in four species of mosquitoes. **Chromosoma**, v.86, p.319-323, 1982b.
- MOTARA, M. A., RAI, K. S. Chromosomal differentiation in two species of *Aedes* and their hybrids revealed by giemsa C-banding. **Chromosoma**, v.64, p.125-132, 1977.
- MOTARA, M. A., RAI, K. S. Giemsa C-banding patterns in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Chromosoma**, v.70, p.51-58, 1978.
- MOTARA, M.A. *et al.* Argentophilic structures of spermatogenesis in the yellow fever mosquito. **J. Hered.**, v.76, p.295-300, 1985.
- MUKHERJEE, A. B., REES, D. M., MUKHERJEE, A. B. A comparative study of the mosquito karyotypes. **Cytologia**, v.35, n.1, p.57-61, 1970.
- MUKHERJEE, A. B., REES, D. M. Spermatogenesis in the mosquito, *Aedes dorsalis* (Meigen). **Cytologia**, v.35, n.2, p.213-219, 1970.
- MULLA, M. S., SING, N. Delayed mortality and morphogenetics anomalies induced by the microbial control agent *Bacillus thuringiensis* ser. (H-14) in *Culex quinquefasciatus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v.7, p.420-423, 1991.
- MUNSTERMANN, L. E., CRAIG, G. B. Jr. Genetics of *Aedes aegypti*. **J. Hered.**, v.70, p.291-296, 1979.
- NANYA, S., BICUDO, H. E. M. C. Variation of nucleolar area in fat tissue of *Drosophila mulleri* during development. **Cytobios**, v.81, p.73-86, 1995.
- NEWTON, M. E., SOUTHERN, D. I., WOOD, R. J. X and Y chromosomes of *Aedes aegypti* (L.) distinguished by Giemsa C-banding. **Chromosoma**, v.49, p.41-49, 1974.

- NEWTON, M. E., WOOD, R. J., SOUTHERN, D. I. Cytological mapping of the M and D loci in the mosquito, *Aedes aegypti* (L.). **Genetica**, v.48, n.2, p.137-143, 1978.
- NIMMANNITYA, S. Dengue fever/dengue haemorrhagic fever: Case management. **Trop. Med.**, v.36, n.4, p.249-256, 1994.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue type 2 outbreak in the south of the state of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, n.6, p.507-510, 1995.
- OCHS, R. L., BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 kD/pI 5.1) is the nucleolar silver staining protein. **Exp. Cell Res.**, v.152, p.260-265, 1984.
- OLERT, J. *et al.* Cytological and histochemical studies on the mechanisms of the selective silver staining of nucleolous organizer regions (NORs). **Histochemistry**, v.60, p.91-99, 1979.
- OLSON, K. E. *et al.* Genetically engineered resistance to Dengue-2 virus transmission in mosquitoes. **Science**, v.272, p.884-886, 1996.
- ORDUZ, S. *et al.* Transfer of toxin genes to alternate bacterial hosts for mosquito control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.97-107, 1995.
- OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.25, n.1, p.53-54, 1983.
- PARDUE, M. L., HSU, T. C. Locations of 18S and 28S ribosomal genes in the chromosomes of the Indian Muntjac. **J. Cell Biol.**, v.64, p.251-254, 1975.
- PARK, Y. J., FALLON, A. M. Mosquito ribosomal RNA genes: characterization of gene structure and evidence for changes in copy number during development. **Insect Biochem**, v.20, n.1, p.1-11, 1990.
- PONTES, R. J. S., RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública**, v.28, n.3, p.218-227, 1994.
- PRIVITERA, E. A *Drosophila melanogaster* cell line tested for the presence of active NORs by silver staining. **Chromosoma**, v.81, p.431-437, 1980.

- RAI, K. S. A comparative study of mosquito karyotypes. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.56, p.160-170, 1963.
- RAI, K. S. Further observations on the somatic chromosome cytology of some mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.59, n.2, 1966.
- RAI, K. S. Cytogenetics of *Aedes aegypti*. **Bull. W. H. O.**, v.36, p.563-565, 1967.
- RAI, K. S. Evolutionary cytogenetics of Aedine mosquitoes. **Genetica**, v.52/53, p.281-290, 1980.
- RAO, P. N., RAI, K. S. Comparative karyotypes and chromosomal evolution in some genera of Nematoceros (Diptera: Nematocera) families. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.80, p.321-332, 1987a.
- RAO, P. N., RAI, K. S. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. **Heredity**, v.59, p.253-258, 1987b.
- RAO, P. N., RAI, K. S. Genome evolution in the mosquitoes and other closely related members of superfamily Culicoidea. **Hereditas**, v.113, p.139-144, 1990.
- REEVES, B. R., CASEY, G., HARRIS, H. Variations in the activity of nucleolar organizers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukemic cells. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.6, p.223-230, 1982.
- REYES-VILLANUEVA, F. El dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. **Ciencia**, v.41, p.45-55, 1990.
- RITOSSA, F. M., SPIEGELMAN, S. Location of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.53, p.737-745, 1965.
- RODHAIN, F. La situation de la dengue dans le monde: La situation de la dengue et de la dengue hémorragique dans le monde, dans les Amériques et en Guyane Française. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.89, n.2, p.87-90, 1996.
- RODRIGO, R. M. *et al.* An experimental approach to the study of Ag-NOR proteins. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.27, n.3, p.259-273, 1994.
- ROTH, T. F., PORTER, K.R. Yolf proteins uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* (L.). **J. Cell Biol.**, v.20, p.313-332, 1964.

- SATMARY, W. M., BRADLEY, T. J. The distribution of cell types in the malpighian tubules of *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann) (Diptera: Culicidae). **Int. J. Insect Morphol. Embryol.**, v.13, n.3, p.209-214, 1984.
- SCHWARZACHER, H. G., MIKELSAAR, A. V., SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.20, p.24-39, 1978.
- SCHWARZACHER, H. G., WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.**, v.188, p.515-536, 1993.
- SERUFO, J. C. *et al.* Dengue in the South-eastern region of Brazil: Historical analysis and epidemiology. **Rev. Saúde Pública**, v.27, n.3, p.157-167, 1993.
- SHARMA, G. P., CHAUDHRY, S., SAFAYA, A. Polytene chromosomes in *Aedes vittatus* Bigot (Culicidae: Diptera). **Microbios Lett.**, v.33, p.153-156, 1986.
- SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: A review of their interactions with the human population. **Soc. Sci. & Med.**, v.23, n.3, p.249-257, 1986.
- SOUZA, R. V. *et al.* An outbreak of dengue in the state of Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.90, n.3, p.345-346, 1995.
- STAHL, A. *et al.* Constitutive heterochromatin and micronucleoli in the human oocyte at the diplotene stage. **Humangenetik**, v.26, p.315-327, 1975.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v.75, p.304-306, 1972.
- SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Hyman, 1990. 434p.
- SUMNER, A. T. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. **Eur. J. Histochem.**, v.38, n.2, p.91-109, 1994. (Abstract).
- SUTTON, E. Salivary gland type chromosomes in mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.28, p.268-272, 1942.
- TABACHNICK, W. J., MUNSTERMANN, L. E., POWELL, J. R. Genetic distinctness of sympatric forms of *Aedes aegypti* in east Africa. **Evolution**, v.33, n.1, p.287-295, 1979.

- TABACHNICK, W. J. *et al.* Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geografic variation and genetic considerations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.34, n.6, p.1219-1224, 1985.
- TANTRAVAH, R. *et al.* Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. **Chromosoma**, v.56, p.15-27, 1976.
- TAUIL, P. L. Editorial. O problema do *Aedes aegypti* no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.19, n.1, p.1-3, 1986.
- 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.
- TUCK-MULLER, C. M. *et al.* NOR associations with heterochromatin. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.38, p.165-170, 1984.
- TRPIS, M. *et al.* Diel periodicity in the landing of *Aedes aegypti* on man. **Bull. W. H. O.**, v.48, p.623-629, 1973.
- TRPIS, M., HAUSERMANN, W. Demonstration of differential domesticity of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Africa by mark-release-recapture. **Bull. Entomol. Res.**, v.65, p.199-208, 1975.
- UTSUMI, S., TAKEHISA, S. Heterochromatin differentiation in *Trillium kamtschaticum* by ammoniacal silver reaction. **Exp. Cell Res.**, v.86, p.398-401, 1974.
- VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Clinical and ecopidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciênc. Cult.**, v.44, n.2/3, p.117-124, 1992.
- VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.35, n.2, p.141-148, 1993.

- VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara state, Brazil, 1994. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, n.3, p.253-255, 1995.
- VAUGHN, D. W. *et al.* Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. **Vaccine**, v.14, n.4, p.329-336, 1996.
- VEZZA, A. C. *et al.* Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.29, p.643-652, 1980.
- VIG, B. K. Sequence of centromere separation: role of centromeric heterochromatin. **Genetics**, v.102, p.795-806, 1982.
- VIG, B. K. Sequence of centromere separation occurrence, possible significance, and control. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.8, n.3, p.249-274, 1983. (Abstract)
- VIG, B. K., BROCCOLI, D. Sequence of centromere separation: differential replication of pericentric heterochromatin in multicentric chromosomes. **Chromosoma**, v.96, p.311-317, 1988.
- WALLACE, A. J., NEWTON, M. E. Heterochromatin diversity and cyclic responses to selective silver staining in *Aedes aegypti* (L.). **Chromosoma**, v.95, p.89-93, 1987.
- WANDALL, A., SVENDSEN, A. Transition from somatic to meiotic pairing and progression changes of the synaptonemal complex in spermatocytes of *Aedes aegypti*. **Chromosoma**, v.92, p.254-264, 1985.
- WARBURTON, D., ATWOOD, K. C., HENDERSON, A. S. Variation in the number of genes for rRNA among human acrocentric chromosomes. Correlation with frequency of satellite association. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.17, p.221-230, 1976.
- WHITE, G. B. Chemosterilization of *Aedes aegypti* (L.) by pupal treatment. **Nature**, v.210, n.5043, p.1372-1373, 1966.



