

Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar

**Estudo Citogenético em Espécies do Gênero
Triatoma (Heteroptera, Reduviidae) com ênfase à
Heterocromatina e às Regiões Organizadoras
Nucleolares**



1910001023



GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Triatoma (HETEROPTERA, REDUVIIDAE) COM ÊNFASE À
HETEROCROMATINA E ÀS REGIÕES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES**

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



T1.023/02

Tese apresentada para
obtenção do título de
Doutor em Genética.

São José do Rio Preto – SP
2001



576.3:575
S498es

Assunto CAPES:

2.02.04.00 - 0 - Genética animal

Citogenética animal

O programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração em Genética, passou a denominar-se
Programa de Pós-Graduação em Genética pela Resolução
UNESP nº R.U. 10/01 de 08/03/2001, DOE de 09/03/2001

Severi-Aguiar, Grasiela Dias de Campos.

Estudo citogenético em espécies do gênero *Triatoma* (Heteroptera, Reduviidae), com ênfase à heterocromatina e às regiões organizadoras nucleolares / Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2001.

194 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

I. Citogenética animal. 2. Triatomíneos. 3. Cromossomos holocêntricos. 4. Nucléolos. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.3:575

GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Triatoma (HETEROPTERA, REDUVIIDAE) COM ÊNFASE À
HETEROCROMATINA E ÀS REGIÕES ORGANIZADORAS
NUCLEOLARES**

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR _____
Profª. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

1º EXAMINADOR _____
Profª. Dra. Shirlei Recco Pimentel

2º EXAMINADOR _____
Profª. Dra. Silvia das Graças Pompolo

3º EXAMINADOR _____
Profª. Dra. Miriam de Magalhães Oliveira Levada

4º EXAMINADOR _____
Profª. Dra. Maria Aparecida Marin Morales



Dedico aos filhos

queridos, Víctor e

Vinícius, por quem tenho

um grande amor.

"Certa vez, dois homens estavam seriamente doentes na mesma enfermaria de um grande hospital. O cômodo era bastante pequeno e nele havia uma janela que dava para o mundo. Um dos homens tinha, como parte de seu tratamento, permissão para sentar-se na cama por uma hora durante as tardes (algo a ver com a drenagem de fluido de seus pulmões). Sua cama ficava perto da janela. O outro, contudo, tinha de passar todo o seu tempo deitado de barriga para cima. Todas as tardes, quando o homem cuja cama ficava perto da janela era colocado em posição sentada, ele passava o tempo descrevendo o que via lá fora. A janela dava para um parque onde havia um lago, em que viviam patos e cisnes, que eram alimentados por várias crianças e também onde colocavam seus barquinhos de brinquedo. Jovens namorados caminhavam de mãos dadas entre as árvores, e havia flores, gramados e jogos de bola. E ao fundo, por trás da fileira de árvores, avistava-se o belo contorno dos prédios da cidade. O homem deitado ouvia o outro descrever tudo isso, apreciando todos os minutos. Ouviu sobre como uma criança quase caiu no lago e sobre como as garotas estavam bonitas em seus vestidos de verão. As descrições do amigo, eventualmente, o faziam sentir que quase podia ver o que estava acontecendo lá fora... Então, em uma bela tarde, ocorreu-lhe um pensamento: Por que o homem que ficava perto da janela deveria ter o prazer de ver tudo aquilo? Por que ele não tinha essa chance? Sentiu-se envergonhado, mas quanto mais tentava não pensar assim, mais queria uma mudança. Faria qualquer coisa! Numa noite, enquanto olhava para o teto, o outro homem subitamente acordou tossindo e sufocando, sem que pudesse chamar a enfermeira. Ele o observou sem se mover... mesmo quando o som da sua respiração parou. De manhã, a enfermeira encontrou o outro homem morto e, silenciosamente, levou o seu corpo. Logo que pareceu apropriado o homem perguntou se poderia ser colocado na cama perto da janela. Então lá o colocaram e fizeram com que se sentisse confortável. Quando saíram, ele apoiou-se sobre o cotovelo e, mesmo com dor, olhou para fora da janela. Viu apenas um muro..."

Autor desconhecido

"A beleza é a única coisa preciosa na vida. É difícil encontrá-la – mas, quem consegue, descobre tudo"

Charles Chaplin

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira pela orientação segura, pelo incentivo contínuo e pela mão sempre amiga, por quem tenho grande admiração e que constitui exemplo de humildade e bondade.

Às Profas. Dras. Shirlei Recco Pimentel e Sílvia das Graças Pompolo pelas valiosas sugestões que fizeram para melhorar os trabalhos para publicação, e também, pela disponibilidade e presteza em auxiliar na execução das técnicas durante o desenvolvimento do projeto.

Às Profas. Dras. Maria Aparecida Marin Morales e Miriam Magalhães de Oliveira Levada pela cooperação imprescindível que realizaram para a melhora e aprimoramento da forma definitiva.

Às Profas. Dras. Marlene Kyioni H. Kobayashi e Mary Massumi Itoyama pela ajuda constante na solução de muitas dificuldades.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo L. Simões e à Prof. Dra. Nívea D. Conforti Froes pela oportunidade de iniciar o curso de Doutorado.

A todos os Professores do Departamento de Biologia, em especial ao Prof. Dr. Sebastião R. Taboga e às Profas. Dras. Ana Elizabete Silva e Cláudia M. A. Carareto.

Às colegas de laboratório Ana Paula Marques, Alessandra Morielle, Andréa Petrolini e Patrícia Hassan Casseb pelo apoio de sempre.



Às Profas. Ana Regina Chinelato, Paula e Rosa do Vale Bosso
pela ajuda nos momentos difíceis no início do Doutorado.

À secretária do Departamento Simone Carvalho por todas as
gentilezas prestadas sempre com um sorriso aberto.

À Kikue que muito cooperou nas fases iniciais do Doutorado e
também ao Josué Rodrigues..

Ao Alexandre Ramos Cardelichio pelo trabalho de digitalização
das imagens da tese.

À Mariza Branco da Silva pela presteza em traduzir os trabalhos
em tempo hábil para a defesa.

À Maria Helena Carabolanti que ajudou a confeccionar as fotos
dos insetos.

A CAPES e à FAPESP (processo nº 98/12876-6) pelo auxílio
financeiro ao desenvolvimento e divulgação desse projeto.

Ao Instituto de Biociências e seus dirigentes por possibilitarem a
realização desse projeto de pesquisa.

Às minhas irmãs Isabela e Daniela que, muitas vezes,
assumiram compromissos com meus filhos para que eu pudesse realizar algumas
tarefas.

Aos meus queridos pais, Milton e Darcy, que sempre me
incentivaram para o progresso intelectual e que, constituem exemplo de
qualidades morais, agradeço, de coração, por tudo pela vida.

Ao esposo Wallace que, além de muito me auxiliar na execução de trabalhos no computador, ajudou-me a não desistir diante das dificuldades em conciliar as tarefas do trabalho e do estudo com as do dia-a-dia e cultivar o amor e o carinho em nossas vidas.

A Deus e à espiritualidade amiga pelo amparo incondicional.

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Considerações sobre a importância médico sanitária e citogenética em triatomíneos.....	11
1.2 Presença de cromossomos holocêntricos	15
1.3 Investigações em cromossomos holocêntricos	18
1.4 Orientação e segregação dos cromossomos em Heteroptera	23
1.5 Sequência invertida da meiose em Heteroptera	28
1.6 Abordagens especulativas a serem realizadas em citogenética de insetos	30
1.6.1 Investigação da estrutura cromossômica das regiões heterocromáticas e organizadoras nucleolares	30
1.6.2 Investigação do ciclo nucleolar na meiose	36
2. OBJETIVOS	42
2.1 Justificativa	42
2.2 Objetivos gerais	42
3. TRABALHOS ORIGINADOS	43
➤ Cytogenetic study of holocentric chromosomes in three species of triatomines (Heteroptera, Reduviidae).....	44
➤ Cytogenetic study on three species of the genus <i>Triatoma</i> (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions.....	54

➤ Comparative study of C-banding and restriction endonucleases (<i>Hae</i> III and <i>Alu</i> I) in germinative cell lines in three species of triatomines (HETEROPTERA, REDUVIIDAE).....	73
➤ Study of the chromosomal structure of triatomines (Triatominae, Heteroptera) after differential fluorochrome staining.....	98
➤ Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (HETEROPTERA, TRIATOMINAE).....	118
➤ Meiosis aspects and nucleolar activity in <i>Triatoma vitticeps</i> (Triatominae Heteroptera).....	131
4. DISCUSSÃO GERAL.....	160
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	180
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185
APÊNDICE	192
ABSTRACT.....	193

SEVERI-AGUIAR, G.D.C. *Estudo citogenético em espécies do gênero Triatoma (Heteroptera, Reduviidae), com ênfase à heterocromatina e às regiões organizadoras nucleolares*. São José do Rio Preto, 2001. 194p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A organização e a estrutura dos núcleos das células da linhagem germinativa e dos cromossomos holocêntricos de indivíduos machos de quatro espécies de triatomíneos (*T. platensis*, *T. protacta*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*) foram investigadas em nível de microscopia de luz, após a utilização de técnicas citoquímicas clássicas e de citogenética molecular. Em todas as espécies estudadas foi observada uma associação entre nucléolos e regiões heterocromáticas, o que evidencia uma íntima relação entre essas estruturas. Os dados obtidos permitiram a diferenciação da estrutura química das regiões heterocromáticas podendo-se inferir que o bloco heterocromático dos cromossomos sexuais, é composto por seqüências ricas em bases GC no cromossomo X e múltiplos de X, e por bases AT no cromossomo Y, confirmando, dessa forma, o processo de fragmentação ou dissociação de um único cromossomo X pré-existente como o mecanismo de origem dos múltiplos cromossomos X. Os resultados gerados possibilitaram, também, localizar sítios ativos de DNAr, homólogos à seqüência 28S, nos cromossomos sexuais e nas regiões teloméricas de um ou dois autossomos, confirmando esses cromossomos como portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Um corpúsculo extra fortemente corado, evidenciado desde o final da prófase até as fases iniciais da espermiogênese, teve sua origem e natureza química identificadas como sendo o produto da atividade nucleolar (moléculas de RNAr) associado à proteínas ácidas, formando corpúsculos de ribonucleoproteínas (RNPs). A manutenção desse bloco de RNP, durante todo o ciclo meiótico até o início da espermiogênese, indica que esse corpúsculo talvez desempenhe importantes funções no metabolismo celular durante o processo de diferenciação de espermatíde a espermatozóide. As características diferenciais relacionadas à espermatogênese e, principalmente, à quantidade, disposição e natureza química das bases das regiões heterocromáticas e, também, à variabilidade dos corpúsculos nucleolares e à localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), sugerem um importante papel dessas estruturas nos mecanismos que atuaram na evolução das espécies hematófagas da subfamília Triatominae.

Palavras-chave: Citogenética; triatomíneos; cromossomos holocêntricos; heterocromatina; regiões organizadoras nucleolares.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a importância médico-sanitária e citogenética em triatomíneos

A importância dos triatomíneos, especialmente do gênero *Triatoma* em parasitologia humana, deve-se ao fato de serem transmissores do *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas. Essa patologia, inicialmente, restringia-se ao ambiente silvestre, infectando apenas mamíferos de pequeno porte em vastas extensões do continente americano, sendo transmitida por triatomíneos também silvestres. Em geral, a presença do *T. cruzi* não parece afetar significativamente os triatomíneos e mamíferos silvestres naturalmente infectados, sugerindo um certo equilíbrio entre as espécies, fruto de longos períodos de adaptação. Sendo assim, a doença de Chagas humana é um fato "acidental", pois, à medida que o homem invadiu focos naturais e provocou desequilíbrios ecológicos, os triatomíneos infectados passaram a se adaptar em casas rurais de má qualidade. Esse contexto ecológico explica, em parte, o processo de desencadeamento dos mecanismos que levaram ao aparecimento da doença em seres humanos. São também importantes os fatores econômicos, sociais e culturais, pois assim como outras moléstias, a doença de Chagas é própria da pobreza, caracterizada por condições precárias de moradia, saneamento e educação.

Disseminada por grandes extensões do Brasil e de outros países latio-americanos, essa doença representa um grave e importante problema de saúde pública, não apenas pelos elevados índices de prevalência, como pelos danos que causa à população. Deve-se considerar, ainda, que a doença humana apresenta limitações e dificuldades aos tratamentos específico e sintomático, o que é agravado pela precariedade geral da vida dos contingentes humanos mais expostos à infecção. Portanto, o caráter crônico da doença e a população afetada ou sob risco, predominantemente rural e sem qualquer poder de reivindicação, determinam que a prioridade conferida ao controle da endemia chagásica seja "instável e precária".

Essa enfermidade é a terceira causa de óbito (13,5%) no grupo das doenças infecciosas e parasitárias e o número de óbitos por ela causado na década passada (1980/90) foi de aproximadamente 6000/ano, o que justifica todo e qualquer investimento no controle da doença (SILVEIRA E RESENDE, 1994; TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1996). Estima-se que no Brasil cerca de oito milhões de pessoas são chagásicas, principalmente no meio rural (NEVES, 1988), e 10.000 a 20.000 novos casos surgem anualmente (REICHE *et al.*, 1996).

Existem aproximadamente 100 espécies de triatomíneos, todos capazes de albergar o *T. cruzi*. Segundo SILVEIRA (1983), no Brasil, das cerca de 44 espécies identificadas, as mais importantes pelo seu grau de contágio são: *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*. São espécies

secundárias: *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma vitticeps*.

A profilaxia da Doença de Chagas pode ser otimizada quando associada a dados biológicos desses insetos, que informam sobre a distinção entre espécies silvestres de baixo risco e espécies domiciliares nocivas, hábitos e horários de hematofagia, capacidade reprodutiva, resistência a inseticidas, ciclo evolutivo, reservatórios silvestres e domésticos do agente etiológico, bem como as inter-relações entre espécies e gêneros estudados no contexto evolutivo, por meio de ensaios citogenéticos que comparam padrões cromossômicos que podem ser aplicados à filogenia dos triatomíneos.

Além da importância médica, os triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae) são de interesse citogenético, porque seus cromossomos possuem cinetócoros difusos, isto é, distribuído ao longo do cromossomo e não com um único cinetócoro localizado na região do centrômero (SCHRADER, 1947; HUGHES SCHRADER & SCHRADER, 1961) e, ainda, uma forma não usual de meiose (John e Lewis, 1965), onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (SCHREIBER & PELLEGRINO, 1950; BARTH, 1956; UESHIMA, 1966; SOLARI, 1979).

A grande maioria dos triatomíneos tem 10 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais, porém há espécies com múltiplos cromossomos sexuais, que são causados pela simples fragmentação do X original (HUGHES-SCHRADER & SCHARADER, 1961; UESHIMA, 1966) e também



existem aquelas que apresentam nove ou 11 pares de autossomos, como em *Panstrongylus megistus*, *Triatoma nitida* e *T. rubrofasciatus* com respectivamente 9, 9 e 11 autossomos.

Restrospectivamente, as pesquisas citogenéticas em triatomíneos iniciaram-se no Brasil em 1948, quando SCHREIBER & PELLEGRINO estudaram o cariótipo de oito espécies de *Triatoma*, uma de *Panstrongylus*, uma de *Rhodnius* e uma de *Psammolestes*. Foram evidenciados fenômenos heteropicnóticos em certos autossomos de *Triatoma infestans* e fenômenos análogos menos evidentes em *T. platensis*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *T. nitida*. Em *T. infestans* ficou evidente que dos dez autossomos que esta espécie apresenta, três, de tamanho maior do que os demais, aparecem nitidamente heteropicnóticos e ligados ao grupo X e Y na fase inicial da diacinese, logo após o longo estágio denominado "estágio confuso" - estágio da prófase meiótica que precede imediatamente a diacinese. Provavelmente, esses três cromossomos diferenciados indicam a existência de um ciclo de duplicação precoce em relação aos demais cromossomos dessa espécie e, nesse comportamento, assemelham-se aos cromossomos sexuais com os quais aparecem ligados por delgados filamentos.

A maior parte das publicações versam sobre investigação comparativa por meio de coloração convencional dos cromossomos. Nesses trabalhos os critérios de comparação considerados são basicamente o número e a morfologia dos cromossomos, bem como a disposição desses na placa metafásica.



Os dados provenientes destas investigações fornecem essencial suporte a respeito da evolução cromossômica desses insetos.

1.2 Presença de cromossomos holocêntricos

No passado, o cinetócoro era visto como um sítio estruturalmente diferenciado na constrição primária com função de ligar os cromossomos aos microtúbulos do fuso durante a mitose e a meiose. Todavia, tal idéia mudou e, atualmente, o cinetócoro é um ativo participante em muitos dos eventos da divisão celular. Além da sua função de ligação, há sugestões de que o cinetócoro desempenha um papel tanto na formação do fuso como nos movimentos cromossômicos que ocorrem durante a mitose. Juntas, essas propriedades do cinetócoro ajudam na precisa distribuição dos cromossomos que ocorre durante os processos de divisão celular (BALCZON & BRINKLEY, 1990).

Os termos cinetócoro e centrômero foram, todavia, sinonimamente usados por muitos pesquisadores até bem pouco tempo, tornando incorreto o uso desses dois vocábulos. O termo centrômero refere-se a uma região do cromossomo que inclui o sítio de ligação dos microtúbulos, a constrição primária e a sua heterocromatina associada. A heterocromatina centromérica tem algumas propriedades singulares que a distingue de outra heterocromatina. Ela é altamente condensada, resistente à digestão com endonucleases e a tratamento hipotônico e geneticamente silenciosa. Além disso, a heterocromatina



centromérica em muitas, mas não em todas as espécies, é composta de seqüências altamente repetidas de DNA satélite. Sua função não é totalmente conhecida, embora seja postulado que ela deva estar envolvida tanto nos eventos de sinapse como de recombinação da meiose e também em manter as cromátides-irmãs pareadas até o início da anáfase (BRINKLEY *et al.*, 1989).

O termo cinetócoro, por outro lado, refere-se a uma estrutura específica nos cromossomos onde se ligam as fibras do fuso e é a região na qual agem as forças mitóticas e meióticas para mover os cromossomos aos seus respectivos pólos. Ultra estruturalmente, o cinetócoro é identificado nos cromossomos mitóticos, como um disco trilaminar proteico localizado na constrição primária de muitos cromossomos de eucariotos. A camada interna tem, aproximadamente, 40 a 60 nm de espessura e está situada na superfície da heterocromatina centromérica, onde se liga firmemente. A camada mediana tem de 25 a 30 nm de espessura, é composta de fibrilas de cromatina intimamente organizadas e parece ligar as placas interna e externa. E, finalmente, a camada externa, com 40 a 60 nm de espessura, onde terminam os microtúbulos e existe uma superfície fibrilar conhecida como corona. A composição bioquímica da corona é desconhecida mas, sabe-se que as finas fibrilas têm a habilidade de ligar tubulina, que são as sub-unidades proteicas formadoras dos microtúbulos do fuso (BALCZON & BRINKLEY, 1990).

A organização tridimensional do cinetócoro varia dependendo do estágio do ciclo celular. Os cinetócoros são duplicados durante S tardio ou G₂



inicial e, assim que a célula entra em prófase, podem ser vistos ocupando os lados opostos da constrição primária. Em metáfase, os cinetócoros são organizados na estrutura trilaminar, descrita no parágrafo anterior, que persiste durante a mitose. Além de variar em organização durante o ciclo celular, os cinetócoros também diferem em tamanho de acordo com o cromossomo de que fazem parte.

Alguns eucariotos inferiores, como as leveduras, não parecem conter um cinetócoro morfológicamente distinto em seus cromossomos. Porém, de forma geral, cromossomos de organismos eucariotos superiores contêm um cinetócoro morfológicamente distinto que pode ser classificado como sendo difuso ou localizado.

Em muitos organismos, o cinetócoro está localizado em um sítio específico no cromossomo, que é chamado monocêntrico, e pode ser facilmente identificado pela proeminente constrição primária. Em alguns grupos de plantas superiores e de insetos, os cinetócoros são difusos. Seus cromossomos perderam a constrição primária e os microtúbulos do fuso ligam-se por todo o comprimento do cromossomo. Como resultado, quando os cromossomos estão migrando para os pólos durante a anáfase, eles permanecem perpendiculares ao fuso, não formando a tradicional figura em V dos cromossomos monocêntricos.

Os cromossomos com cinetócoros difusos são conhecidos como holocêntricos. Eles estão presentes em protozoários, algas, algumas ordens de insetos (Homoptera, Heteroptera e Lepidoptera) e em algumas famílias de plantas (Cyperaceae e Juncaceae).



1.3 Investigações em cromossomos holocêntricos

Espécies que têm cromossomos holocêntricos são freqüentemente tratadas como casos citogeneticamente excepcionais. O termo holocêntrico é usado pela maioria dos autores em referência aos cromossomos que perderam a constrição primária (centrômero), possuindo um cinetócoro difuso ao longo de toda cromátide. Embora esse termo seja inadequado devido à sugestão etimológica do centrômero, ele tem sido empregado pelos autores para denotar o contrário de monocêntrico, referente ao cromossomo com centrômero localizado, uma condição comum aos vertebrados e à maioria das plantas. Alguns preferem o termo holocinético para referirem-se ao mesmo fenômeno (LUCENÓ & GUERRA, 1996).

SCHRADER (1933 *apud* MANNA, 1995) observou que o heteróptero, *Protenor belfragei* possui um grande cromossomo X que é orientado paralelamente ao equador da célula e que as fibras cromossomais são organizadas ao longo de todo seu comprimento.

ALBERTSON & THOMSON (1993) descreveram a segregação meiótica dos cromossomos holocêntricos do nematodo *Caenorhabditis elegans*, tanto na espermatogênese como na oogênese. Na metáfase I, os bivalentes orientaram-se axialmente e a atividade cinética restringiu-se a uma das extremidades de cada par das cromátides-irmãs.

HUGHES-SCHRADER & SCHRADER (1961) inferiram, pela primeira vez, a presença de cromossomos holocêntricos em Heteroptera depois de



detectarem que cromossomos de coccídeos e afídeos, quando submetidos à radiação ionizante, originam fragmentos cromossômicos capazes de persistirem ao longo da divisão celular, sem serem perdidos, sendo que fragmentos acêntricos geralmente falham em orientar-se na placa metafásica.

MURAMOTO (1985) utilizou um método de coloração diferencial das regiões centroméricas em espécies de cinco diferentes ordens (Colcoptera, Dermaptera, Heteroptera, Lepidoptera e Orthoptera) corroborando a presença de cromossomos holocêntricos em dermápteros, heterópteros e lepidópteros.

PARK *et al.* (1995) analisaram o cariótipo de seis espécies de “psilídeos coreanos” (Homoptera) e demonstraram a presença de cromossomos holocêntricos em todas elas.

PAZY & PLITMANN (1995) estudaram, através da divisão mitótica das células somáticas e do comportamento dos fragmentos cromossômicos induzidos por raios-X, três subgêneros do gênero *Cuscuta*, ervas dicotiledôneas holoparasitas, e puderam demonstrar que, somente um deles (*Cuscuta*) apresenta cromossomos holocêntricos, enquanto que nos outros dois (*Monogyma* e *Grammica*) os cromossomos são monocêntricos. Além disso, evidenciaram que os cromossomos holocêntricos podem tolerar fragmentação e danos que seriam letais aos sistemas monocêntricos e sugeriram que tal tolerância deva permitir redução no número cromossômico pela fusão e perda de segmentos cromossômicos, ou aumento de número em decorrência de fissão, o que propicia

um sistema de grande habilidade para a evolução do cariótipo no subgênero *Cuscuta*. E vão mais além, sugerindo que os cromossomos holocêntricos derivaram dos monocêntricos baseados no fato de que a segunda condição (presença de cromossomos monocêntricos) é comum e, que a primeira (presença de cromossomos holocêntricos), aparece esporadicamente em entidades taxonômicas, assim como em casos de câncer.

Um outro aspecto interessante verificado nesse gênero foi a presença de um cromossomo super ou extranumerário (cromossomo B) descrito por PAZY (1997), um fenômeno comum em espécies de plantas e animais, porém nunca descrito em organismos com cromossomos holocêntricos.

O comportamento mitótico e meiótico de 16 espécies do gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) foi estudado por LUCEÑO *et al.* (1998) sugerindo a presença de cromossomos holocêntricos nesse gênero. Os autores, com base na presença de cromossomos holocêntricos, sugeriram que tal condição é sinapomórfica na família e induziram alterações na taxonomia do grupo.

Um outro aspecto que tem sido investigado é uma característica bioquímica interessante sobre o significado biológico da metilação do DNA em cromossomos monocêntricos. O consenso geral é de que genes que são ativamente transcritos são submetilados enquanto que os não transcritos são altamente metilados. MANICARDI *et al.* (1994) realizaram um estudo em *Megoura viciae* ((Homoptera), que apresenta cromossomos holocêntricos, com endonucleases de restrição (*MspI* e *HpaII*) que clivam sítios CpG e verificaram que tais sítios não

formam *clusters* em cromossomos holocêntricos, mas estão espalhados pelo cromossomo inteiro. Sugeriram que na cromatina de insetos, os sítios metilados CpG, quando presentes, estão confinados a domínios de heterocromatina, postulando a existência de dois domínios na heterocromatina de insetos, um metilado e outro não metilado ou submetilado. Surpreendentemente, os sítios metilados estão diretamente relacionados a genes transcricionalmente ativos que determinam resistência a inseticidas nesses homópteros.

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar que os cromossomos do heteróptero *Oncopeltus fasciatus* apresentaram cinctócoros abrangendo 75% de toda sua extensão e os de *Dysdercus intermedius* de 23 a 27% do comprimento cromossômico (WOLF, 1996).

A ausência de um centrômero, morfologicamente diferenciado, dificulta o estudo da evolução cromossômica entre espécies. PANZERA *et al.* (1995) estudaram três espécies de Heteroptera do gênero *Triatoma* (*T. platensis*, *T. delpontei* e *T. infestans*), cujos cromossomos são holocêntricos, com base em vários aspectos citogenéticos e verificaram que a quantidade e distribuição da heterocromatina C representam importante aspecto na diferenciação do cariótipo, mas não parecem desempenhar uma papel direto nos processos de especiação. Dois anos mais tarde, um grupo liderado pelo mesmo autor (PANZERA *et al.*, 1997), trabalhou com três outras espécies do mesmo grupo (*T. sordida*, *T. guasayana* e *T. patagonica*), utilizando, também, dados isoenzimáticos, um

método mais direto de análise molecular, que colaborou no estudo da taxonomia dessas três espécies.

RIEDER *et al.* (1990) estudaram a mitose do Hemiptera *Agallia constricta* e demonstraram que numerosos e pequenos cromossomos monocêntricos podem agregar-se, transitoriamente, durante a prometáfase para formar uma massa composta de cromatina policinética contendo múltiplos ou discretos cinetócoros difusos. Nessa situação, o mecanismo fundamental pelo qual esses cromossomos ativam uma ligação bipolar normal durante a prometáfase deve ser o mesmo para os cromossomos contendo cinetócoros localizados (que pode exceder 1 μ m em comprimento). Entretanto, não há clara evidência indicando que um único cromossomo, quando definido como um estável grupo de genes, possa conter numerosos cinetócoros discretos e funcionais.

Pelo menos teoricamente, os mecanismos que geram alterações numéricas (poliploidia, aneuploidia, disploidia) parecem ocorrer igualmente tanto em sistemas monocêntricos como holocêntricos.

Condições holocêntricas permitem que mecanismos particulares de variação numérica possam operar. Em dois gêneros, *Luzula* e *Carex*, foi observado que em algumas ploidias, os cromossomos parecem ter a metade do tamanho dos diplóides, o que levou à suposição de que a duplicação do número de cromossomos nessas espécies ocorreu pela fragmentação de conjuntos cromossômicos inteiros. O fenômeno de fragmentação cromossômica, associado à



natureza holocêntrica dos cromossomos, representa um mecanismo alternativo de evolução que foi designado agmatoploidia (LUCENÕ & GUERRA, 1996).

Na evolução do mecanismo dos cromossomos sexuais o papel da fragmentação tem sido enfatizado. SCHRADER (1947 *apud* UESHIMA, 1966) apontou que uma simples quebra nos cromossomos sexuais holocinéticos pode resultar em múltiplos cromossomos sexuais. A sub-família Heteroptera apresenta espécies com múltiplos cromossomos X e a hipótese mais aceita para essa origem é a da fragmentação de um cromossomo sexual original (UESHIMA, 1979; MANNA, 1995).

Os cromossomos holocêntricos dos Heteroptera constituem um excelente material para estudo, podendo representar um modelo nas investigações desse tipo de cromossomo, pois apresentam características bastante peculiares e interessantes: a atividade cinética é restrita às extremidades cromossômicas, presume-se que ocorra terminalização dos quiasmas e a primeira divisão é reducional para os autossomos e equacional para os cromossomos sexuais.

1.4 Orientação e segregação dos cromossomos em Heteroptera

O uso de técnicas de bandamento nos cromossomos de eucariotos tem permitido a diferenciação de domínios específicos que podem ser reconhecidos dependendo de sua reação com agentes físicos e substâncias químicas e enzimáticas. O bandamento C constitui um bom marcador



cromossômico em alguns autossomos para analisar seu comportamento durante ambas as divisões meióticas (PÉREZ *et al.*, 1997).

A heterocromatina desempenha essencial função celular e parece participar dos mecanismos de pareamento e segregação cromossômica e na regulação da expressão gênica. Estudos desse tipo de bandamento em diversos organismos com cromossomos holocêntricos indicam uma “interdispersão” da heterocromatina e da eucromatina, com nenhuma diferença óbvia de coloração dos cromossomos metafásicos do afídeo *Myzus persicae* (SPENCE *et al.*, 1998). Talvez isso se deva ao fato dos cromossomos holocêntricos apresentarem regiões C-positivas com uma distribuição bastante espalhada, ao contrário dos cromossomos monocêntricos que têm áreas heterocromáticas localizadas em grandes blocos, o que responde a grande dificuldade na obtenção de bandas-C em cromossomos holocêntricos (MANICARDI & GAUTAM, 1994).

Em heterópteros, é possível detectar uma pequena quantidade de heterocromatina-C localizada, preferencialmente, nas extremidades cromossômicas (CAMACHO *et al.*, 1985). Com base nessa informação, PÉREZ *et al.* (1997) realizaram uma investigação bastante interessante no comportamento meiótico de três espécies do gênero *Triatoma*, e acompanharam a orientação e segregação do cromossomo 3, que apresenta uma banda heterocromática em somente uma das extremidades, o que permitiu a diferenciação do envolvimento das extremidades (eucromática e heterocromática) na cinética desse cromossomo.



Na metáfase I, esse bivalente mostra duas orientações alternativas: tanto a extremidade eucromática como a heterocromática de cada homólogo pode ser dirigida para cada pólo. Na anáfase I, a atividade cinética estava localizada tanto em uma quanto em outra extremidade, porém, não observaram segregação em que tal atividade estivesse localizada na extremidade eucromática de um, e na heterocromática do outro homólogo. Isto significa que a extremidade que mostra atividade cinética na primeira divisão está inativa na segunda. Isso parece razoável se considerarmos que a extremidade que mostra atividade na primeira anáfase é, depois, envolvida na associação do pseudobivalente no final da telófase e da segunda metáfase. A associação das cromátides X e Y poderia inibir, de algum modo, a capacidade de mostrar atividade cinética na segunda divisão (PÉREZ *et al.*, 2000).

Com o objetivo de verificar se a atividade cinética de ambas as extremidades era um processo casual, esses autores (PÉREZ *et al.*, 1997) acompanharam as possíveis configurações em cinco indivíduos. Os resultados mostraram que, em mais de 50% das células em metáfase I, tal bivalente tinha atividade cinética restrita à extremidade eucromática. Essas frequências mostram diferenças significativas entre os cinco indivíduos. As porcentagens de extremidades eucromáticas ativas variam entre 60,3% e 82,8% e aquelas de heterocromáticas entre 39,7% e 17,2%.

Na metáfase/anáfase II, foi observada atividade cinética restrita à extremidade eucromática ou heterocromática. Todavia, é interessante que as

freqüências em cada indivíduo são invertidas se comparadas àquelas obtidas na metáfase I. Este resultado claramente sugeriu que a extremidade que está ativa durante a primeira divisão meiótica torna-se inativa durante a segunda. Essa observação levanta a questão de como as extremidades adquirem essa capacidade cinética. Essa situação é pouco comum e muito interessante uma vez que, em muitas espécies de Heteroptera, não há estágio de descondensação entre a primeira e a segunda divisão meiótica, ou seja, não existe intercinese, e as células começam a segunda divisão logo após a telófase I. É necessário explicar como as proteínas motoras, dependentes de microtúbulos, localizadas em cada extremidade cromossômica, e requeridas para essa atividade cinética, perdem a funcionabilidade ou se recolocam durante a transição entre ambas as divisões meióticas, e como as extremidades opostas ativam a capacidade de dirigir os movimentos cromossômicos durante a segunda divisão. De qualquer forma, os resultados de tais pesquisadores evidenciam que a presença de heterocromatina constitutiva não é um obstáculo para localização das proteínas motoras que propiciam a atividade cinética.

Num estudo posterior, PÉREZ *et al.* (2000), utilizando o corante DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) e obtendo melhor resolução, observaram que a presença de um grande bloco heterocromático parece produzir uma mudança na atividade cinética para a outra extremidade (eucromática). Além disso, eles detectaram um outro fenômeno: presença de atividade cinética em extremidades opostas de ambas as cromátides.



GONZÁLEZ-GARCIA *et al.* (1996) mostraram que na metáfase I de espermátócitos de *Gramphosoma italicum* (Heteroptera), as cromátides também são orientadas com seus eixos longos perpendiculares ao eixo polar. Embora a atividade cinética estivesse restrita a somente uma extremidade em ambas as cromátides, a probabilidade de exibir essa habilidade era a mesma para ambas as extremidades das cromátides.

1.5 Sequência invertida da meiose em Heteroptera

A primeira divisão meiótica em sistemas monocêntricos é caracterizada pela orientação bipolar dos bivalentes com os dois cinetócoros irmãos migrando para o mesmo pólo. Assim, a primeira divisão meiótica é reducional para cinetócoros irmãos. Subseqüentemente, durante a segunda divisão meiótica, cinetócoros irmãos de um dos bivalentes orienta-se para pólos opostos e segregam equacionalmente. Esta seqüência, que é considerada padrão, não é seguida por todas as espécies. Em muitas espécies de Heteroptera, essa seqüência meiótica é invertida para os cromossomos sexuais. Os univalentes sexuais segregam equacionalmente durante a primeira divisão meiótica e reducionalmente na segunda. Não se sabe, até o momento, se essa seqüência é seguida pelos autossomos e os resultados, até então obtidos, são baseados em observações especulativas (PÉREZ *et al.*, 1997).

Em espermátócitos de *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae), por exemplo, cujos cromossomos também são holocêntricos, os



autossomos segregam reducionalmente na primeira divisão e equacionalmente na segunda divisão, seguindo o padrão normal de divisão durante a meiose (GOH *et al.*, 1988).

Os cromossomos sexuais seguem um modo diferente de segregação. Na metáfase I, eles são individualizados e não formam um verdadeiro bivalente, já que não estão presentes quiasmas entre eles. Seu eixo longo parece perpendicular à placa equatorial. As cromátides de cada cromossomo sexual migram para polos opostos na anáfase I, mostrando uma segregação equacional. As cromátides sexuais são observadas individualizadas na prometáfase II, entretanto elas apresentam uma associação “ponta-a-ponta” na metáfase II, com seus eixos longos perpendiculares à placa equatorial. Durante a anáfase II, as cromátides sexuais segregam para os pólos opostos (PÉREZ *et al.*, 1997).

As observações realizadas por PÉREZ *et al.* (1997), em *Triatoma infestans*, corroboram o que foi descrito para os cromossomos sexuais de heterópteros. Ao contrário, os autossomos não seguem a mesma sequência invertida dos cromossomos sexuais. Sendo assim, os modos alternativos de segregação observados na anáfase I, deixam evidente que a distinção entre segregação reducional e equacional não é aplicável nesse caso. Cromossomos holocêntricos com atividade cinética restrita nem sempre reduzem o mesmo segmento cromossômico como fazem os cromossomos monocêntricos. Isto vai depender de qual extremidade cromossômica está dirigindo a segregação dos membros dos bivalentes na anáfase I.



É importante ressaltar que as combinações genéticas resultantes tanto da sequência meiótica padrão como daquela descrita para heterópteros é a mesma. Dessa forma, nenhuma delas oferece aumento na variabilidade meiótica. Assim, algumas espécies de Heteroptera desenvolveram um mecanismo meiótico especial que produz os mesmos resultados daqueles presentes em espécies com cromossomos monocêntricos. Nesses sistemas, a sequência de segregação cromossômica através da meiose não é um evento meiótico fundamental. Há sugestões de que é necessária a supressão de estruturas cinetocóricas em heterópteros para permitir a terminalização dos quiasmas (COMINGS & OKADA, 1972), porém em *T. infestans* (PÉREZ *et al.*, 1997), essa terminalização não ocorre e existem dois diferentes modos de orientação dos bivalentes na metáfase I. Sendo assim, a ausência de estruturas cinetocóricas em cromossomos holocêntricos meióticos não está fundamentalmente associada à terminalização dos quiasmas. A perda de cinetócoros em posições estabelecidas nos cromossomos permite duas possíveis orientações dos bivalentes durante a primeira divisão meiótica. Essa situação possibilita a alternância da atividade cinética nas duas extremidades cromossômicas durante ambas as divisões meióticas.

Para maior elucidação dos mecanismos que envolvem o comportamento dos cromossomos holocêntricos durante a divisão celular, serão necessárias novas pesquisas sobre a ultra estrutura e a natureza química de suas



regiões cinctocóricas, bem como dos processos mitóticos e meióticos das espécies que apresentam esse tipo de cromossomos.

1.6 Abordagens especulativas a serem realizadas em citogenética de insetos

1.6.1 Investigação da estrutura cromossômica das regiões heterocromáticas e organizadoras nucleolares

A introdução científica do termo heterocromatina foi impulsionada pelos estudos de Heitz que demonstraram que a cromatina de partes específicas de certos cromossomos permanecia condensada durante a intérfase, retendo propriedade intensa de coloração, característica dos cromossomos metafásicos. Ele propôs tal termo para descrever e diferenciar segmentos ou cromossomos inteiros que se mantinham condensados durante a intérfase mitótica e apareciam formando um cromocentro. De forma geral, pode ser considerado que a heterocromatina é a cromatina mantida condensada durante todo o ciclo celular e a eucromatina é aquela cujo ciclo de condensação e descondensação é paralelo ao ciclo celular (GUERRA, 1988).

Inúmeras são as técnicas que diferenciam regiões heterocromáticas em cromossomos metafásicos. A mais simples é a técnica para obtenção de bandas C descrita por SUMNER (1972), específica para heterocromatina constitutiva, que após o tratamento específico é corada pelo Giemsa. A princípio não é codificadora e comporta, se não todo, a maior parte de DNA satélite (GUERRA, 1988).



A distribuição das bandas C^+ varia conforme o organismo, porém na maior parte dos heterópteros as banda C^+ têm sido localizadas, principalmente, nas regiões teloméricas e subteloméricas, mas também em porções intersticiais dos cromossomos (PAPESCHI, 1995).

Em uma variedade de organismos, a heterocromatina é completamente eliminada das células somáticas, sendo sempre retida em células da linhagem germinativa. Sua função, em células meióticas, parece estar relacionada à formação dos quiasmas, pois *crossing-over* raramente ocorre em regiões heterocromáticas (JOHN & MIKLOS 1979, SUMNER 1990a).

Com a finalidade de obtenção de informações mais detalhadas sobre as características das regiões de heterocromatina constitutiva, foi introduzido, na década de 70, o uso de endonucleases de restrição (ERs) (GUERRA, 1988).

Tais enzimas são produzidas por bactérias com função de defesa contra infecções por fagos de DNA ou RNA, impedindo, assim, sua lise, e são utilizadas como importantes ferramentas no estudo de DNA uma vez que são capazes de reconhecer sítios específicos e clivar a dupla hélice (PETITPIERRE 1996).

As enzimas de restrição têm sido empregadas para produzir bandamento em cromossomos de uma grande variedade de organismos como insetos, vertebrados e algumas espécies de plantas. Em insetos, as enzimas de restrição mais comumente usadas são *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III e *Hinf* I. Na maior



parte dos casos, são produzidos padrões semelhantes ao bandamento C e cada enzima revela subconjuntos de bandas característicos (SUMNER, 1990a). A extensão em que é extraído DNA das regiões cromossômicas depende da frequência e do acesso das seqüências de reconhecimento àquela região. Regiões que são resistentes à digestão ou que contêm poucos sítios acessíveis não apresentam padrão de bandas significativo e, muitas vezes, tal padrão é semelhante ao bandamento C. Em mamíferos, anfíbios e insetos, o emprego das ERs tem fornecido evidências da presença de subclasses de DNA repetido na heterocromatina constitutiva intra e interespecífica (HARTLEY, 1991).

A atividade das endonucleases de restrição pode ser diferente nos componentes homólogos dos pares cromossômicos. A existência de tais polimorfismos revelados pelas ERs, nem sempre identificados pelas bandas-C convencionais, indica a presença de diferentes seqüências de bases em áreas homólogas dos cromossomos, apontando, assim, diferenças em regiões supostamente complementares.

Sendo assim, o emprego de uma técnica de citogenética molecular, o bandamento por fluorocromos, pode auxiliar enormemente a distinção da composição específica de bases dessas regiões heterocromáticas. Aproximadamente 15 tipos de fluorocromos são usados para bandamento cromossômico, muitos deles mostrando especificidade de base. A quinacrina mostarda, que produz as chamadas bandas Q, não é específica para



heterocromatina, intercala-se ao DNA ligando-se preferencialmente à regiões de DNA ricas em A-T (SUMNER, 1990b).

O DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), inicialmente usado por SCHWEIZER & NAGL (1976), tem mecanismo de ação ainda incerto, provavelmente semelhante ao Hoechst 33258, também mostra alta especificidade por regiões ricas em A-T.

Outro fluorocromo, a cromomicina A₃, que oferece um bandamento complementar aos anteriores, é específica para regiões ricas em G-C e tem efeito semelhante ao de banda R, nas partes eucromáticas dos cromossomos, inverso ao bandamento G, sendo muito utilizada para caracterizar a heterocromatina. A combinação da distamicina A a esses fluorocromos aumenta os efeitos fluorescentes do bandamento, em consequência da exclusão competitiva entre duas substâncias, permitindo melhor reconhecimento das regiões heterocromáticas (SUMNER, 1990b).

A heterocromatina é uma estrutura específica dos cromossomos dos eucariotos que está associados aos cinetócoros cuja interação estrutural e fisiológica é responsável pela independência e movimento dos cromossomos durante a divisão celular, que, em triatomíneos, ainda não é bem compreendida.

Há descrições na literatura, em plantas e animais, de uma evidente associação entre constrições secundárias marcadas pela prata e heterocromatina rica em GC. Esse fenômeno é comum em vertebrados inferiores e, provavelmente, é devido ao alto conteúdo de bases GC nos genes espaçadores



ribossomais ou no DNA reperido adjacente (GUERRA 1988, SUMNER 1990a). A cromomicina A₃ cora heterocromatina conectada tanto às Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) ativas como inativas, enquanto o material corado pela prata não é DNAr em si, mas é composto de proteínas cromossomais nas RONs ativas ou nos RNAr transcritos e na estrutura fibrilar do nucléolo (ANJUM *et al.* 1997).

Como é de conhecimento geral, o nucléolo é organizado ao redor de sítios cromossomais heterocromáticos contendo muitas cópias de genes de RNAr, comumente referidos como região organizadora nucleolar (RON) (MÈLÈSE & XUE 1995). Essas regiões, assim como o nucléolo dos núcleos interfásicos, são reconhecidas pela clássica coloração de impregnação por íons prata, descrita por HOWELL & BLACK (1980), cujo substrato são proteínas acídicas denominadas proteínas Ag-NOR (WACHTLER & STAL, 1993). Porém, não parece haver uma única proteína ou conjunto de proteínas responsáveis pela coloração pela prata. Nem a presença de NOR nem a atividade transcricional são características de todas as estruturas com afinidade argêntica (MEDINA *et al.*, 1986).

As Regiões Organizadoras Nucleolares coradas pela prata (AgRONs) representam, então, as regiões cromossômicas que contém um *cluster* de cópia múltipla de genes de RNA ribossomal (rDNAs) 18S, 5,8S e 28S (*major*) que formam nucléolos ativos, enquanto que a prata não detecta a região de rDNA 5S (*minor*), um outro gene ribossomal de cópia múltipla, porém não envolvido na

formação do nucléolo. As AgRONS não são rDNAs em si, mas representam um complexo de proteína residual acídica associado com o centro fibrilar do nucléolo, sendo então utilizadas para investigar a expressão do rDNA. A determinação do número e da localização dos *loci* de rDNA/AgRONS, que são espécie específicos, constitui importante marcador cariotípico (Fujiwara *et al.*, 1998).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas específicas para rDNA possibilita localizar, de maneira exata, sítios da cromatina onde estão inscritos os genes codificadores de proteínas ribossomais que darão origem aos nucléolos e, portanto, deixando pouca ou quase nenhuma dúvida acerca da relação da coloração pela prata com verdadeiras regiões organizadoras nucleolares.

Em se tratando dos triatomíneos, onde as informações sobre a composição da cromatina são muito escassas, os resultados que podem ser obtidos com base na identificação de quantas são e onde estão localizadas as regiões organizadoras nucleolares por meio da técnica de FISH, juntamente com resultados obtidos pela impregnação por prata, a afinidade pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI, como também, a localização e natureza das regiões heterocromáticas devem contribuir para o esclarecimento da estrutura de seus cromossomos.



1.6.2 Investigação do ciclo nucleolar na meiose

O nucléolo é uma estrutura nuclear comum a todas as células eucarióticas responsável pela biogênese dos ribossomos. A biogênese ocorre através de uma série de eventos que envolvem a transcrição de genes RNAr, processamento dos pré-RNAs ribossômicos e reunião de partículas pré-ribossomais (SCHEER *et al.* 1997).

A formação do nucléolo é um processo dinâmico no desenvolvimento da vida da célula sendo denominado nucleologênese. Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG) (*pars granulosa*), contudo, durante a nucleologênese, estes domínios desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular (ZATSEPINA *et al.* 1997).

Em ciclos celulares de plantas e de animais, quando as células entram em mitose e cessa-se a transcrição do DNAr na prófase, os nucléolos desintegram-se estruturalmente e a maior parte das proteínas nucleolares migra para o citoplasma. Uma quantia relativamente pequena de proteínas nucleolares permanece associada às Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) de cromossomos mitóticos ou ligam-se à periferia cromossômica. Todavia, imediatamente, após a segregação dos cromossomos na anáfase, a transcrição do DNAr é reativada e os nucléolos gradualmente reorganizam-se (OCHS *et al.* 1985, FAKAN & HERNÁNDEZ-VERDÚM 1986, WACHTLER & STAHL



1993, SCHWARZACHER & WACHTLER 1993, GONZÁLEZ-GARCIA & RUFAS 1995).

A reorganização do nucléolo inicia-se quando o material nucleolar aparece próximo e sobre a superfície dos cromossomos e, às vezes, na forma de uma bainha pericromossomal. Este material, semelhante ao nucléolo, condensa-se ou reúne-se em estruturas discretas denominadas de corpos pré-nucleolares (PNBs) que, subsequente, fundem-se nas RONS cromossômicas na telófase e início da interfase fornecendo a base para a formação de nucléolos interfásicos maduros (OCHS *et al.* 1985, FAKAN & HERNANDEZ-VERDUM 1986, WACHTLER & STAHL 1993, SCHWARZACHER & WACHTLER 1993, GONZÁLEZ-GARCIA & RUFAS 1995).

MELLO (1995), utilizando células somáticas de mamíferos e baseando-se no padrão metacromático das células devido à presença de RNA, por meio da técnica variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC), observou que durante a prometáfase/metáfase inicial havia "deslocamento" de material nucleolar metacromático para as proximidades dos cromossomos que "se moviam" para a placa celular equatorial. Observou também, além da presença de revestimento cromossômico por uma fina camada de material metacromático, corpos pré-nucleolares metacromáticos que permaneciam nas extremidades da placa cromossômica, ou afastados dos cromossomos. Esta última situação foi verificada em fases subsequentes da mitose. A autora pôde observar ainda que, durante a anáfase, a reação de metacromasia deslocava-se das bordas da placa

cromossômica para a região entre os dois conjuntos de cromossomos em movimento e que, durante a telófase inicial, a zona celular envolvida com esta reação adquiria um formato de ampulheta.

No estudo realizado por MELLO (1995), os nucléolos em reorganização não foram vistos como corpos distintos durante a telófase tardia, mas em citocinese avançada, pequenos corpos pré-nucleolares metacromáticos tornavam-se gradualmente evidentes dentro do núcleo das células-filhas. Além disso, os sítios de resposta metacromática durante a mitose não foram coincidentes com as regiões Ag-NOR positivas. Baseando-se nos vários aspectos observados a autora discute o fato de que normalmente o RNA responsável pela camada pericrossomal metacromática não é de origem nucleolar, pois, outros RNAs podem estar participando da resposta metacromática. Entretanto, a migração e a íntima associação dos corpos nucleolares com os cromossomos são sugestivos da participação do RNA desta organela no padrão de metacromasia detectado.

A relação entre estrutura e função das sub-estruturas nucleolares foram estudadas em embriões pré-implantados de coelhos, onde a nucleologênese estende-se além dos primeiros quatro ciclos celulares e não pode ser sincrônica em cada blastômero. Métodos imunocitoquímicos, utilizando microscopia de luz e eletrônica, foram aplicados para a localização de proteína e de RNA, bem como, técnicas para a detecção de DNA. Neste estudo foi observado que o DNA apresentava-se gradualmente associado com a periferia de corpos precursores de



nucléolos (PNBs) compactos mas nunca eram encontrados dentro dos PNBs nos quatro estágios celulares. Nas células embrionárias, alguns PNBs exibiam periferia reticulada formando redes de ramificações do componente fibrilar denso (CFD) envolvendo o "corpo residual" (remanescente do PNB) no processo de ativação. O RNA foi primariamente detectado em íntimo contato com o CFD assim como dentro do "corpo residual", o qual não se apresentava imunomarcado com os anticorpos para DNA usados. Quando observados em nível da microscopia de luz, a fibrilarina, a nucleolina e a proteína B23 exibiam uma mudança no padrão de distribuição durante a nucleogênese. Em estágios iniciais, pequenos pontos e marcas semelhantes às estruturas eram distribuídos dentro de todo o núcleo. Em algumas células embrionárias, estas proteínas começavam a acumular-se em finas camadas irregulares rodeando os PNBs no processo de ativação. O processo de reorganização descrito pode ser uma relação com a redistribuição da cromatina e componentes da matriz nuclear/nucleolar durante ativação da transcrição do DNA ribossômico localizado na superfície do PNB (BARAN *et al*, 1997).

A presença do nucléolo através da divisão celular, conhecida como "persistência do material nucleolar", também já foi observada nos dinoflagelados e em células malignas de mamíferos (WACHTLER & STHAL 1993).



A persistência de PNBs durante a mitose também dá suporte à idéia de que o material nucleolar não se rompe completamente durante a metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro.

Pode ser hipotetizado que estes corpos carregam um "primeiro" ou "novo" material ou represente uma fonte de RNA nucleolar para as células-filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (MELLO 1995).

BARTH (1956a) descreveu, em várias fases de células meióticas de *Triatoma infestans*, coradas com hematoxilina, a presença de um corpúsculo fortemente impregnado com nitrato de prata, melhor evidenciado na anáfase II. À época, o autor interpretou este fato como devido a uma maior afinidade do corpúsculo ao corante, cuja função era completamente obscura. Também, BARTH (1956b) esquematizou em câmara clara esse corpúsculo em *T. maculata*, *Panstrongylus megistus* e *T. vitticeps*, nas primeiras e segundas placas metafásicas e nas anáfases II e, em *Rhodnius neglectus*, nas primeiras placas metafásicas. O autor, no entanto, não fez qualquer menção, no texto ou nas legendas das figuras, a respeito desse corpúsculo.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) acompanhando a meiose de algumas espécies de triatomíneos observou a presença de corpúsculos ou fragmentos corados pela orceína e fortemente impregnados pela prata e apresentou algumas hipóteses iniciais quanto à natureza deste corpúsculo: 1) restos de nucléolos; 2) micronúcleolos; 3) corpos pré-nucleolares em formação; 4) micronúcleos; 5) elementos cromossômicos em fase de eliminação e 6) um ou

mais cromossomos ou segmentos cromossômicos supernumerários ou não, portadores de RON.

Durante a espermatogênese de mamíferos e de outros vertebrados há evidências sobre a síntese celular de RNA e, simultaneamente, aparece uma organela característica – o “corpo cromatóide” – que apresenta típica forma lobulada. Estudos com radioatividade, derivada de uridina tritiada, e estudos imunohistoquímicos de alta resolução indicaram a presença de actina e RNA no “corpo cromatóide”. Foi sugerido que o “corpo cromatóide” deva ser uma organela de estocagem de RNA tipo “longa-vida” que garanta a síntese protéica durante o final da espermiogênese, quando o genoma da espermátide está inativo. É, ainda, possível, que proteínas pré-sintetizadas sejam estocadas no “corpo cromatóide” para que, no momento apropriado, sejam transformadas em estruturas próprias da espermátide (Revisão em PARVINEN *et al.* 1986).

A análise da espermatogênese dos triatomíneos buscando observar a presença e o comportamento desses corpúsculos, por meio das técnicas descritas no item anterior, pode trazer novas e preciosas informações sobre o ciclo nucleolar durante a meiose desses insetos.

Nota: Parte da INTRODUÇÃO (itens 1.2 a 1.5) constitui uma monografia sobre “Cromossomos Holocêntricos” que foi submetido, na forma de revisão, à revista *Naturalia*.

SEVERI-AGUIAR, G.D.C. e AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cromossomos Holocêntricos. *Naturalia*, 2001 (submetido).



2. OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Com base na escassez de dados da literatura acerca da estrutura dos cromossomos holocêntricos, propôs-se o estudo dos triatomíneos, como modelo biológico, para investigar a estrutura e a composição dos mesmos, uma vez que, além de possuírem esse tipo de cromossomos, representam, na América Latina, um aspecto preocupante em relação à saúde pública por serem vetores da Doença de Chagas.

2.2 Objetivos Gerais

- a. Analisar comparativamente as diversas fases da espermatogênese em espécies do gênero *Triatoma*;
- b. Estudar o ciclo nucleolar durante a divisão celular (meiose) e detectar as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), bem como a localização de sítios de DNA ribossômicos 28S em seus cromossomos;
- c. Analisar e comparar o padrão de distribuição e a composição de bases das regiões heterocromáticas nos núcleos interfásicos e nos cromossomos meióticos das espécies estudadas;
- d. Buscar, por meio da correlação de diferenças e semelhanças da estrutura cromossômica, o entendimento dos processos de evolução e adaptação ocorridos nesse gênero.

3. Trabalhos

**CYTOGENETIC STUDY OF HOLOCENTRIC CHROMOSOMES IN
THREE SPECIES OF TRIATOMINES (HETEROPTERA, REDUVIIDAE)**

**Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar* e Maria Tercília Vilela de Azeredo-
Oliveira**

G.D.C. Severi-Aguiar and M.T.V. Azeredo-Oliveira, Department of Biology –
Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto,
University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São
José do Rio Preto, S.P., Brazil.

***Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar**

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do
Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail:
grasielaguilar@aol.com

Running Title: Holocentric chromosomes in triatomines.



CYTOGENETIC STUDY OF HOLOCENTRIC CHROMOSOMES IN THREE SPECIES OF TRIATOMINES (HETEROPTERA, REDUVIIDAE)

Summary

In the present work, spermatogenesis was analyzed in three species of the genus *Triatoma* (*T. platensis*, *T. proctata* and *T. tibiamaculata*). Lacto-acetic orcein staining was used in order to investigate chromosomal meiotic behavior of these species. It allowed the identification of the *T. tibiamaculata* karyotype (20,X₁X₂Y), the observation that in *T. proctata* doesn't occur late migration of sexual chromosomes and corroborated knowledgments about holocentric chromosome nature.

Key words: Triatomines, Meiosis, Holocentric Chromosomes



Introduction

The importance of triatomines in human parasitology, specially those of the genus *Triatoma*, lies on the fact that they are vectors of *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas' disease. This disease is a serious public health problem, not only for its high prevalence, but also for the harm it causes to the population in Brazil and other Latin American countries, where it is widely spread. Triatomines are also of genetic interest due to the fact that their chromosomes present diffuse kinetochores, distributed along the chromosome, and an unusual form of meiosis with postreductional segregation of sex chromosomes (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999).

The great majority of triatomines have 10 autosome pairs and one pair of sex chromosomes. However, some species have multiple sex chromosomes derived from the fragmentation of the original X, while other species have nine or 11 autosome pairs (Hughes-Schrader and Schrader, 1961; Ueshima, 1966).

In the present work, three species of the genus *Triatoma* (*T. platensis*, *T. proctata* and *T. tibiamaculata*) were compared with emphasis on the analysis of several spermatogenesis stages and the correlation of the differences and similarities found in order to achieve a better understanding of the evolution of this group of insects.



Material and Methods

The species studied were *T. platensis*, *T. protacta* and *T. tibiamaculata*. These hematophagous insects pertain to the order Heteroptera, family Reduviidae and sub-family Triatominae (Lent and Wygodzinsky, 1979; Manna, 1995). The testes of 6-8 young adult males (provided by the Insectary of the Special Health Service (SESA), Araraquara (SP, Brazil) were fixed in acetic acid and stained with lacto-acetic orcein (De Vaio *et al.*, 1985). For documentation was used KODAK TMAX 100ASA film. Black-and-white photomicrographs were taken under an OLYMPUS BX40 microscope.

Results

The polyploid nuclei of the testicular tubule wall showed a single heteropycnotic corpuscle in *T. protacta* (Figure 1a) and *T. tibiamaculata* (figure 3a). However, in *T. platensis*, several corpuscles were observed (Figure 2a). Spermatogonial metaphases presented 20 autosomes and three sex chromosomes in *T. protacta* (Figure 1b-c) and *T. tibiamaculata* (Figure 3b) whereas only two sex chromosomes were observed in *T. platensis* (Figure 2b-c). During the "confused stage", the nuclei displayed a single corpuscle but in *T. platensis*, which exhibited a bipartite corpuscle (Figure 2d-e). At metaphase I, 10 autosomal bivalents and three sex chromosomes (X_1X_2Y) were seen in *T. protacta* (Figure 1e-f) and *T. tibiamaculata* (Figure 3e-f) whereas *T. platensis* showed only two sex chromosomes (XY) (Figure 2f-g). At metaphase II, an autosomal ring was

formed and sex chromosomes were located in its center in *T. protacta* (Figure 1g) and *T. tibiamaculata* (Figure 3g) whereas in *T. platensis* they could be either center-positioned or not (Figure 2h-i). At anaphaseII, late migration was not observed only in *T. protacta*.

Discussion

In the three species investigated, chromosomes behaved as holocentric as they showed no primary constriction neither the traditional V-shaped figure during metaphase. Instead, they resembled small, round structures. Autosomes were radially arranged at the periphery of the metaphase plate (MII) and sex chromosomes could be located or not in the ring center. Chromosomes, as whole blocks, migrated to the cell poles during anaphase.

The three species studied (*T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*) showed polyploid nuclei of the testicular tubule wall with one or several heteropycnotic corpuscles that might represent the sex chromosomes. Such nuclei seem to reflect the high metabolic rate necessary to keep cell division (De Vaio *et al.*, 1985). In *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*, chromosomal behavior was similar to that in the remaining Heteroptera. They were connected by chromatin filaments at spermatogonial metaphase. Sex chromosomes formed a corpuscle, that could be bipartite, and characterized the nuclei at the "confused stage". During meiosis II, autosomes were radially located at the periphery of the metaphase plate and sex chromosomes could be found, or

not, in the autosomal ring center. And, finally, during anaphase, two species (*T. platensis* and *T. tibiamaculata*) showed late chromosomal migration, i.e., sexual chromosomes did not migrate synchronically with autosomes (Banergee, 1958; Ueshima, 1966; Manna, 1995).

Conventional analysis with lacto-acetic orcein staining allowed the identification of the *T. tibiamaculata* karyotype $20+X_1X_2Y$, which had not been previously cytogenetically described in the literature. It corroborated, too, those reported for the other two species (*T. protacta* and *T. platensis*), whose karyotype were described in mitotic cells by Ueshima (1966) and Schrieber and Pellegrino (1950), that are equivalent to the modal number of chromosomes in the sub-family Triatominae. In two of the species investigated (*T. protacta* and *T. tibiamaculata*), fragmentation of the X chromosome was very likely the mechanism responsible for chromosomal derivation (Ueshima, 1979; Manna, 1995).

Aknowledgements

The authors are thankful to Dr. José M. Soares Barata (director) and the technicians João Luís Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho of the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology – São Paulo, Public Health School (São Paulo, SP) for supplying the insects. The support of FAPESP (98/12876-6) and CAPES is gratefully acknowledged.



Figure 1a to 1n. *T. protacta* testicular tubules stained with lacto-acetic orcein. (a) Polyploid nucleus of the tubular wall nutritive cells with a larger heterochromatic corpuscle. Notice the vesicles inside the corpuscle with a less stained halo around it. (b-c) Spermatogonial metaphase. (d) Nuclei at the beginning of prophase I (confused stage) with an heteropycnotic corpuscle formed by sex chromosomes. (e-f) Meiotic metaphase I with 10 autosomal bivalents and 3 sex chromosomes. (g-h) Meiotic metaphase II – frontal and lateral view – with 10 autosomes and 3 sex chromosomes (arrows). Notice the ring formed by the autosomes and the sex chromosomes in its center. (i) Meiotic telophase. (j) Spermatids at the beginning of spermiogenesis. (k-l) Spermatids at more advanced stages of spermiogenesis. Bar=18 μ m.



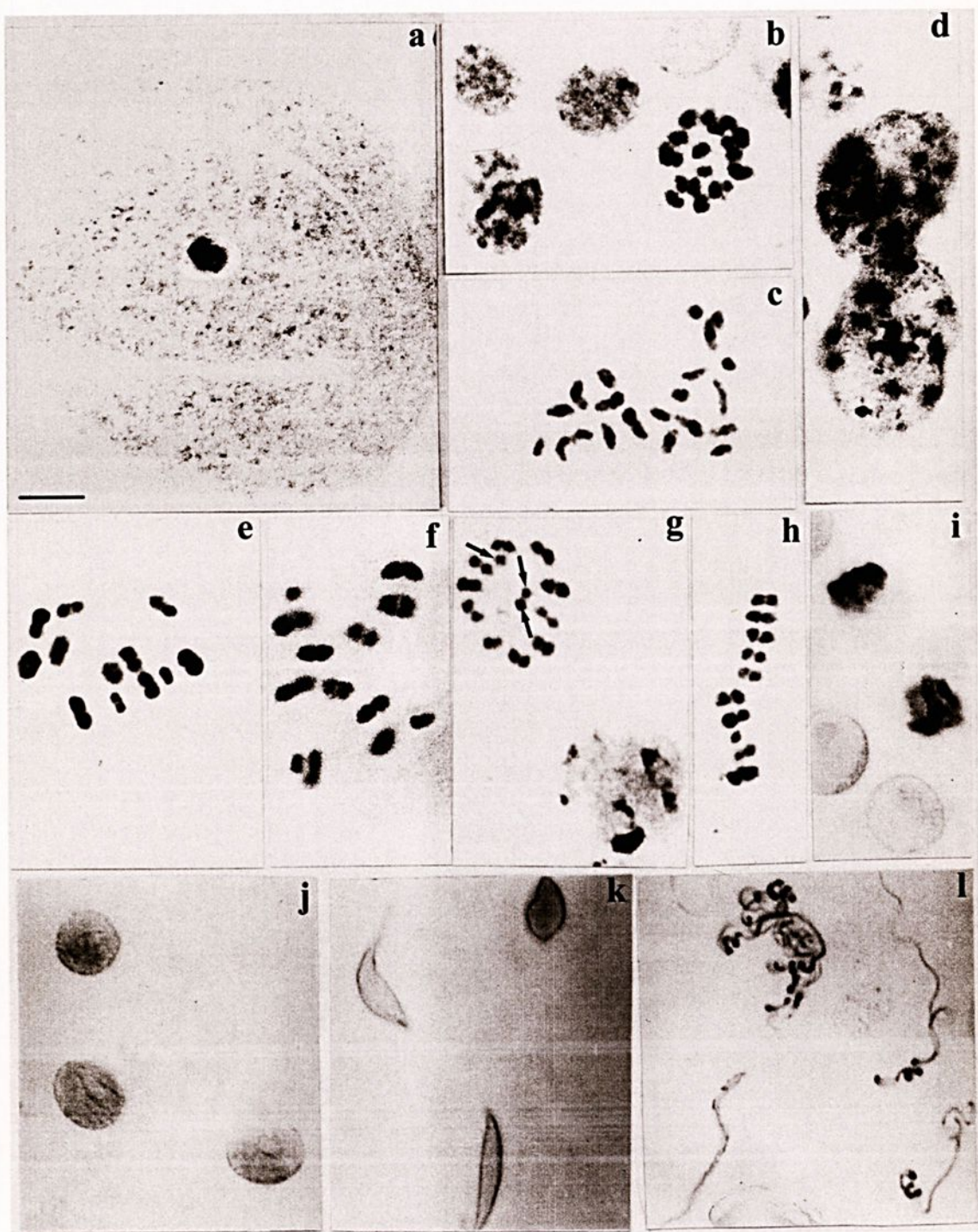


Figure 2a to 2q. *T. platensis* testicular tubules stained with lacto-acetic orcein. (a) Polyploid nucleus of the tubular wall nutritive cells with several heterochromatic corpuscle. (b-c) Spermatogonial metaphase. Arrow indicates chromatin filaments connecting chromosomes. (d-e) Nuclei at the beginning of prophase I (confused stage). Arrow indicates the sex chromosomes. (f-g) Meiotic metaphase I with 10 autosomal bivalents and 2 sex chromosomes. (h-i) Meiotic metaphase II with 10 autosomes and 2 sex chromosomes. Notice the ring formed by the autosomes and the sex chromosomes in its center. (j-l) Meiotic anaphases II. The arrow indicates chromosomes with late migration. (m) Meiotic telophase II. (n-o) Spermatids at the beginning of spermiogenesis. (p-q) Spermatids at more advanced stages of spermiogenesis. Bar=18 μ m.

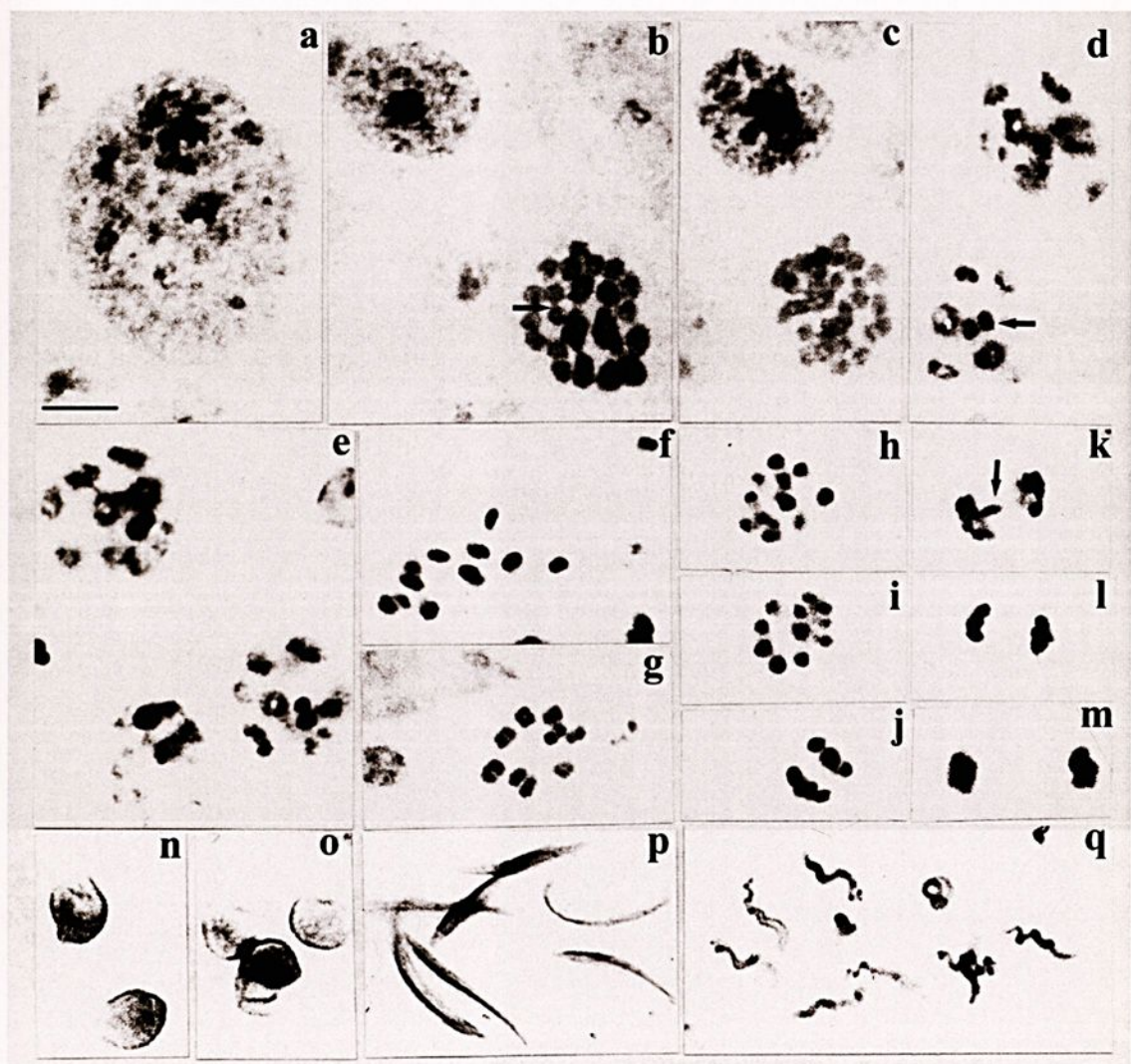
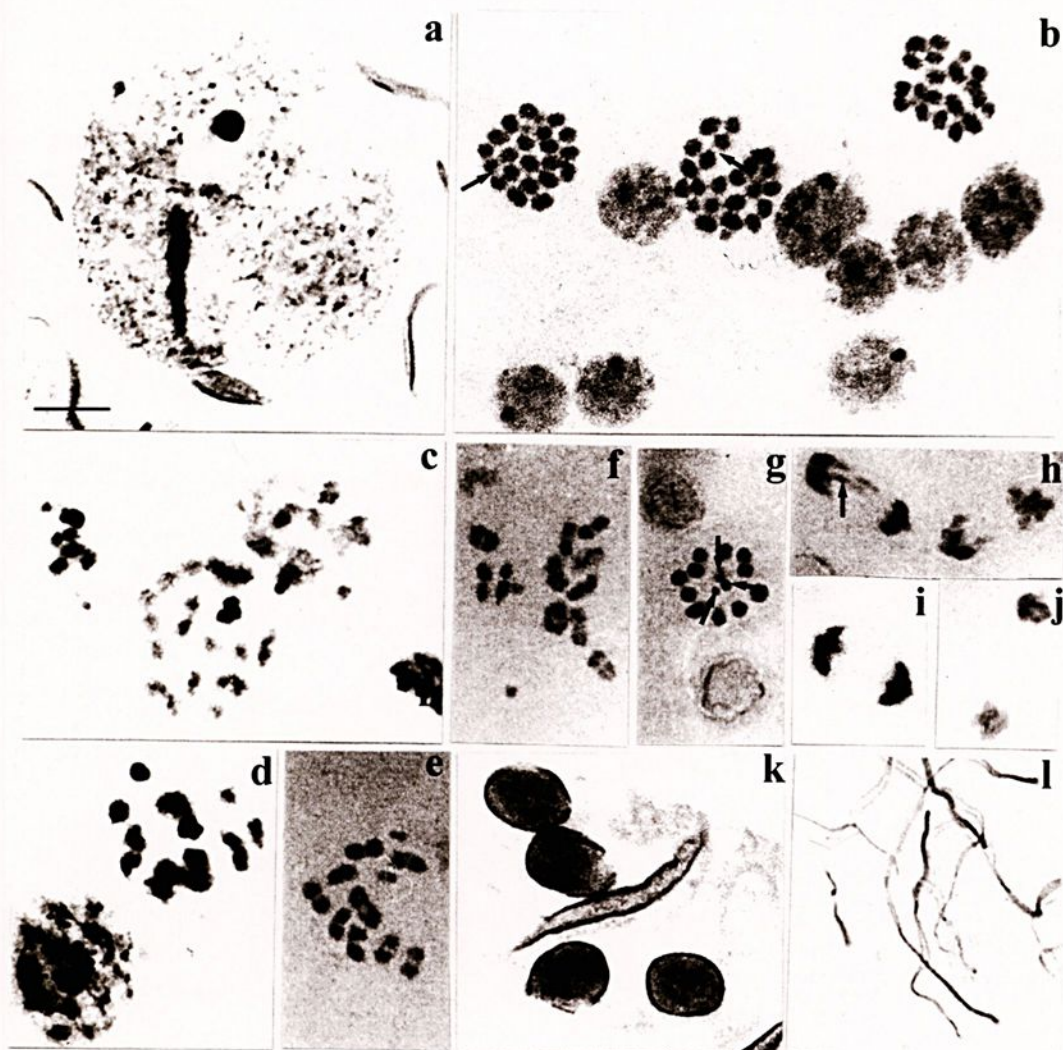


Figure 3a to 3m. *T. tibiamaculata* testicular tubules stained with lacto-acetic orcein. (a) Polyploid nucleus of the tubular wall nutritive cells with a larger heterochromatic corpuscle. Notice the corpuscle with a less stained halo around it. (b) Spermatogonial metaphases. Arrows indicate chromatin filaments connecting chromosomes. (c-d) Nuclei at the beginning of prophase I (confused stage) with an heteropycnotic corpuscle formed by the sex chromosomes. (e-f) Meiotic metaphase I with 10 autosomal bivalents and 3 sex chromosomes. (g) Meiotic metaphase II with 10 autosomes and 3 sex chromosomes. Notice that autosomes formed a ring and sex chromosomes are located in its center (indicated by arrows). (h-i) Meiotic anaphase II. Arrow indicates chromosomes with late migration. (j) Meiotic telophase II. (k) Spermatids at the beginning of spermiogenesis. (l) Spermatids at spermiogenesis final stage. Bar=18 μ m.





References

- Banergee, M. R. 1958. A study of chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). *Proc. Zool. Soc.* **11**: 2-21.
- De Vaio, E. S., Grucci, B., Castagnino, A. M., Franca, M. E. and Martinez, M. E. 1985. Meiotic differences between three species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica* **67**: 185-191.
- Hughes-Schrader, S., Schrader, F. 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* **12**: 327-350.
- Lent, H., Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Amer. Museum of Natural History* **163**: 127-497.
- Manna, G. K., 1995. *Chromosomes in Evolution in Heteroptera*. In: Sharma A. K. and Sharma A., (Eds.) "Chromosomes in Evolution in Eukaryotic Groups", Florida, Boca Raton 189-225.
- Schneider, G., Pellegrino, J. 1950. Eteropcnosi di autosomi come possibile mecanismo di speciazione. *Scientia Genética* **3**: 215-226.
- Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, M. T. V. 1999. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia* **64**: 235-240.
- Ueshima, N. 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* **18**: 97-122.
- ____ 1979. Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal Cytogenetics*. Berlin, Gebrüder Borntraeger **3** 1-117.

This paper will be submitted to *Cytologia*.



**Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera:
Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions.**

**GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR* and MARIA
TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA**

G.D.C. Severi-Aguiar and M.T.V. Azeredo-Oliveira, Department of Biology –
Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto,
University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São
José do Rio Preto, S.P., Brazil.

*Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do
Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail:
grasielaguiar@aol.com

Running Title: Nucleolar organizer regions (RONs) in the genus *Triatoma*.



Cytogenetic study on three species of the genus *Triatoma* (Heteroptera: Reduviidae) with emphasis on nucleolar organizer regions.

Abstract - The use of banding techniques allows the recognition of chromosomal pairs and karyotypical arrangements. However, its application in Heteroptera holocentric chromosomes is limited. Thus, little is known about their structure, specially their Nucleolar Organizer Regions (NORs). A comparative analysis of the nucleolar characteristics present during spermatogenesis in *Triatoma platensis*, *Triatoma protacta* and *Triatoma tibiamaculata* seems to indicate that in this group of insects nucleolar fragmentation occurs after prophase I. The study of chromosomal structure of these triatomines indicates that NORs are located at some telomeric and interstitial autosome regions and at sexual chromosomes (X/X₁X₂).

Key words: silver impregnation, NOR, holocentric chromosomes, triatomines, nucleolar fragmentation, spermatogenesis.

INTRODUCTION

Chagas' disease is a parasitosis of endemic nature that plays a major role in heart diseases in South America. Its vectors are the hematophagous heteroptera of the family Reduviidae, subfamily Triatominae. These insects are of great cytogenetic interest because they present an unusual form of meiosis, in which the segregation of sex chromosomes is postreductional, and chromosomes with diffuse kinetochores, known as holocentric (TAVARES AND AZEREDO-OLIVEIRA 1997, TARTAROTTI AND AZEREDO-OLIVEIRA 1999a).

The silver-ion impregnation staining technique has been known for nearly half a century. It is used to mark nucleolar regions, namely the fibrillar centers (FC) and the Nucleolar Organizer Regions (NORs), in the chromosomes that carry the gene loci that code for ribosomal RNA, which are synthesized and processed, in the nucleolus, into pre-ribosomal subunits that will later form the ribosomes of the cytoplasm, essential for protein synthesis. In acidic conditions, the proteins stained by this technique reduce silver. They are found in the nucleolus at interphase and are specifically located in NORs during cell division (GOODPASTURE AND BLOOM 1975).

The purpose of the present work was to comparatively analyze the distribution pattern of the Nucleolar Organizer Regions and the nucleolar activity during spermatogenesis in three species of the genus *Triatoma* (*T. platensis*, *T. protacta* and *T. tibiamaculata*).



MATERIALS AND METHODS

Three species of the genus *Triatoma* (*T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*,) all pertaining to the order Heteroptera, subfamily Triatominae and family Reduviidae (LENT AND WYGODZINSKY 1979, MANNA 1995) were studied. An average number of 10 individuals per species were analyzed. The specimens (adult males) were provided by the Insectary of the Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology, Public Health School, São Paulo University, São Paulo (SP) Brazil. Testes were crushed, fixed in acetic acid and submitted to silver-ion impregnation (HOWELL AND BLACK 1980, modified by BICUDO 1992). For documentation was used KODAK TMAX 100ASA film. Black-and-white photomicrographs were taken under an OLYMPUS BX40 microscope.

RESULTS

Triatoma protacta

The polyploid nuclei of the tubule wall nutritive cells showed one larger and several smaller nuclear corpuscles impregnated by silver ions (Figure 1a). The interphase nuclei of spermatogonial cells displayed peripheral or central nucleolar bodies (Figure 1b-c) and spermatogonial metaphase showed some slightly silver-ion marked chromosomes (Figure 1b-c). At initial meiotic prophase I (confused stage), several nucleolar dots were observed within the nuclei as well as a strongly silver-ion impregnated nucleolar corpuscle (Figure



1d). At first meiotic metaphase, some bivalents were silver impregnated (Figure 1e-f). At second meiotic metaphase, these same characteristics were observed and scattered nucleolar fragments and corpuscles were observed within the cell (arrowheads) (Figure 1g-h). At meiotic anaphase the chromosomes progressively migrated to the cell poles, though one of them showed late migration. Still at this phase, nucleolar fragments or corpuscles were observed within the cell (arrowheads) (Figure 1i-j). At meiotic telophase was possible to verify the presence of silver impregnated fragments at each pole of the dividing cell (arrowheads) (Figure 1k). Spermatids at early differentiation presented a nucleolar corpuscle at the periphery of the cell (Figure 1l). Spermatozoans (m). Bar=18 μ m.

Triatoma platensis

The polyploid nuclei of the tubule wall nutritive cells showed several nucleolar blocks of different sizes (Figure 2a). Spermatogonial metaphase showed some silver-ion impregnated chromosomes (Figure 2b-d). At initial prophase I (confused stage) several nucleolar corpuscles were seen within the nucleus as well as a nucleolar region more strongly impregnated with silver-ions (Figure 2d). At first meiotic metaphase some autosomes and sexual chromosome were marked with silver-ions (Figure 2f-g). At second meiotic metaphase, the chromosomes were interconnected and positioned in the center of the autosomal ring. Some chromosomes were silver-impregnated (Figure 2h-i). At meiotic anaphase, the chromosomes progressively migrated to the cell poles and nucleolar

fragments or corpuscles were observed within the cell (Figure 2i). At initial spermiogenesis, spermatids showed peripheral nucleolar corpuscles (Figure 2j-k).

Bar=18 μ m.

Triatoma tibiamaculata

The polyploid nuclei of the tubule wall nutritive cells showed a nucleolar corpuscle impregnated with silver-ions (Figure 3a). In the interphase nuclei of the spermatogonial cells, peripheral or central nucleolar bodies were seen (Figure 3b) and spermatogonial metaphase showed some silver-ion marked chromosomes (arrows) (Figure 3c-d). At initial meiotic prophase I (confused stage) several nucleolar dots were seen within the nuclei as well as a strongly silver-ion impregnated nucleolar corpuscle (Figure 3e). At first meiotic metaphase some of the bivalents were silver-impregnated and sex chromosomes were individualized. At this phase, scattered nucleolar fragments and corpuscles were observed within the cell (Figure 3f). At second meiotic metaphase, these same characteristics were observed (Figure 3g-j). At meiotic anaphase, the chromosomes progressively migrated to the cell poles and nucleolar fragments or corpuscles were observed within the cell (Figure 3k-m). At meiotic telophase was possible to verify the presence of silver-ion impregnated fragments at each pole of the dividing cell (Figure 3n). Spermatids at initial differentiation showed at the cell periphery a nucleolar corpuscle (Figure 3o) that disappeared as differentiation progressed (Figure 3p-q). Bar=18 μ m.



DISCUSSION

In some chromosomes of *Triatoma protacta*, *Triatoma platensis* and *Triatoma tibiamaculata* nucleolar organizer activity specially occurs at the extremities and the nucleolus is fragmented after meiotic prophase I, when the presence of nucleolar fragments or corpuscles are observed within the division cell.

MEDINA *et al.* (1986) suggested that NOR silver staining was associated with decondensation of the chromatin that carries rDNA rather than transcriptional activity. Additional support for this idea was provided using transcription inhibitors that do not weaken silver staining (HERNÁNDEZ-VERDÚN *et al.* 1984). It does not seem that a single protein or protein group is responsible for silver staining. In fact, neither the presence of NOR nor transcriptional activity are characteristics common to all silver impregnated structures (MEDINA *et al.* 1986).

The genes that code for ribosomal RNA transcription form the nucleolus (FISCHER *et al.* 1991). Within the nucleolus, the production of pre-ribosomal components takes place including the transcription of rRNA genes, primary transcript processing of 45S rRNA into mature 18S; 5,8S and 28S rRNA, protein addition to pre-ribosome synthesis and incorporation of 5S-rRNA, that transcribed outside the nucleolus (SCHEER AND WEISENBERGER 1994, HERNÁNDEZ- VERDÚN 1991).

The main nucleolar ultrastructural components are the fibrillar centers (FC), dense fibrillar components (DFC) and granular components (GC) (WACHTLER AND STAHL 1993, RASKA 1995). FC is the component most frequently stained with silver.

Even though nucleolar function has already been elucidated, the functional significance of the different nucleolar components remains unclear. The localization of early ribosome biogenesis takes place, specially rRNA transcription, is still a controversial issue (WACHTLER AND STAHL 1993).

HERNÁNDEZ-VERDÚN (1991) found that chromosomes occupy a specific territory within the nucleus, called chromosomal domain, has been recently demonstrated by chromosome painting using specific probes that correspond to a single chromosome and *in situ* hybridization to localize specific chromosomes during interphase. Therefore, it is not surprising that ribosomal genes are orderly distributed throughout the nuclear structure. Nucleolar Organizer Regions are strongly involved in nuclear polarity. Besides being a traditional cytological mark, polarity is also evident between different NORs and, between NORs and the nuclear envelope. In the metaphase plate, the NORs of the adjacent chromosomes are close to each other, better than it would be expected from a random distribution. This observation indicates that NORs of the adjacent chromosomes are in a polarized arrangement in the interphase nucleus.

The chromosomes that carry NORs may move from different parts of the nucleus to aggregate and form a nucleolus and may be



dispersed in one or two cell cycles. This means that they probably move free within the nucleus without affecting the order of the other chromosomes. This positioning seems to be associated with the presence of a specific skeletal structure where the nucleolus connects to the envelope (HERNÁNDEZ-VERDÚN 1991).

The specific compartmentalization of the nucleolar process in the nucleus demonstrates the existence of some kind of cellular mechanism that generates this nuclear and nucleolar organization. The localization of nucleolar proteins in specific regions of the nucleolus indicates that these proteins may show signs that determine their final nucleolar fate (HERNÁNDEZ- VERDÚN 1991).

WACHTLER AND STAHL (1993), has demonstrated by electron microscopy that, during mitosis, the nucleolus usually disappears at final prophase and reappears at telophase. During this process, rRNA synthesis ceases. However, this disappearance is not complete as silver-stained material can be observed in chromosomal NORs during mitosis. At telophase, the dense fibrillar component reappears and is later followed by granular material corroborating that the granular component corresponds to a later step in the ribosome biogenesis than the fibrillar component.

It is probable that the relatively quick reappearance of the nucleolus after karyokinesis is not only due to the "de novo" synthesis of the nucleolar material, but also to the reconstruction of the nucleolus from the

nucleolar material that is dispersed in the nucleus and cytoplasm at prophase. Some observations found in the literature support this idea. The increase observed in the silver stained material after mitosis is not weakened by protein synthesis inhibition, indicating that nucleolar reconstruction does not depend solely on material that is once more synthesized. The disintegration and subsequent reintegration of nucleolar material during mitosis has been corroborated by *in situ* hybridization combined with the use of antibodies against nucleolar proteins. These studies indicated that nucleolar proteins are again specifically localized around the chromosomes during mitosis (WACHTLER AND STAHL 1993, MELLO 1995). The phenomenon called nucleolar persistence, that is, the presence of nucleolus during mitosis, is observed in dinoflagellates and has been described in the malign cells of mammals. In embryo cells with carcinoma, the nucleolus is present and transcriptionally active throughout mitosis, showing mitosis itself is not an insuperable barrier for rRNA transcription (WACHTLER AND STAHL 1993).

During mitosis, proteins that play a key role in the transcription of rDNA genes, such as RNA-polymerase I and DNA topoisomerase, remain associated with chromosomal NOR, that also anchors rRNA genes. The mechanism that modulates the activity of the rRNA genes during mitosis may provide an interesting case for the analysis of the control of gene activity and structure. The post-mitotic nucleolar reformation depends on the interaction of two separate entities, NOR and pre-nucleolar bodies (PNBs). PNBs



appear at telophase and are completely dispersed at the beginning of the reformation of the son nuclei when they progress to phase G1 (SCHEER AND WEISENBERGER 1994).

The analysis of meiosis in the triatomines under study indicates that our results are in agreement with nucleolar material persistence during mitotic cell cycle. In all species studied, it was possible to observe nucleolar fragments or corpuscles at the more advanced stages of division such as anaphase and telophase. These fragments or corpuscles may be nucleolar remains. Thus, the nucleolus may not completely disappear during the spermatogenesis of triatomines, but may persist in the form of small pre-nucleolar corpuscles that reunite to form the next nucleolar cycle, that, in the case of meiosis, will only be completed if the fertilization and formation of a zygote occurs.

The persistence of bodies such as nucleoli during mitosis supports the idea that nucleolar material does not completely break at metaphase and anaphase though its functional significance is still not very clear. It may be hypothesized that these bodies carry primary or new nucleolar material or even supply nucleolar RNA to the daughter cells while the new nucleolus is being organized (MELLO 1995).

Studies on different species show that Ag-NOR staining sites on chromosomes correspond to ribosome genes sites identified by *in situ* hybridization. However, among humans, for example, all 10 rDNA sites, i.e. the acrocentric chromosomes 13,14, 15, 21 and 22 that form a characteristic



secondary constriction in each one of these chromosomes at metaphase (FAKAN AND HERNÁNDEZ- VERDÚN 1986), are very rarely stained with silver. This is likely to be due to the fact that some sites contain less rDNA genes, below the limit of silver impregnation sensitivity (SUMNER 1990). In such studies, NORs were observed at the borders of some chromosomes.

In the present work, arginophylic markings were observed in the initial spermatids of the three *Triatoma* species. The analysis of spermatogenesis in others triatomines species, with this same technique, showed similar results (TAVARES AND AZEREDO-OLIVEIRA 1997, TARTAROTTI AND AZEREDO-OLIVEIRA 1999b). This silver-ion impregnation disappeared as spermatids underwent elongation as reported in the literature about a series of vertebrates and some cephalochordates. Thus, our study corroborates the hypothesis of RNA gene post-meiotic reactivation, allowing this phenomenon to be also applied to invertebrates, and reinforcing the initial idea that RNA synthesis at gametogenesis is a possibly universal pattern among organisms with sexual reproduction.

It is probable too that many messenger RNAs that code for spermatozoa proteins are synthesized before cell division in the spermatocytes and stored in a "long-lived" form as "chromatoid bodies", for translation during late spermiogenesis where the genome is not active. Subsequently, this body moves to the area where the flagellum connects with the spermatid nucleus and forms a ring-shaped structure. Maybe, the most interesting function proposed regarding



the "chromatoid body" is the participation of RNA metabolism in spermatogenic cells. Even though very little understood, there is evidence that considerable amounts of RNA synthesized in the spermatocytes of mammals at pachytene are preserved during spermatid development until final spermiogenesis (PARVINEN *et al.* 1986). Therefore, we suggest that this same mechanism may also explain the presence of silver-ion impregnated corpuscles in initial spermatids of these *Triatoma* species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr. José M. Soares Barata (director), João Luis Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, technicians of the Insectary of the Special Health Service (SESA) (Araraquara, SP), organ of the Department of Epidemiology- São Paulo Public Health School (São Paulo, SP) for supplying the specimens studies. Special thanks to FAPESP (98/12876-6) and CAPES for their financial support.



Fig. 2 *Triatoma platensis* testicular tubules submitted to silver-ion impregnation.

(a) Polyploid nucleus of tubule wall nutritive cells with several silver-ion impregnated corpuscles. (b-c). Interphase nuclei of tubule spermatogonial cells and spermatogonial metaphase with silver-ion marked chromosomes (arrows). (d-e) Meiotic prophase I (confused stage): several nucleolar dots within the cell and a strongly impregnated nucleolar corpuscle (f-g) First meiotic metaphase: some silver-ion impregnated bivalents (arrows). (h-i) Second meiotic metaphases: silver-ion impregnated autosomal bivalents (arrows) and one nucleolar fragment or corpuscle per cell. (i) Second meiotic anaphase: presence of one nucleolar fragment or corpuscle per cell. (j-k) Spermatids at initial differentiation with one nucleolar corpuscle in every cell. (l) Spermatids at a more advanced differentiation stage: absent silver-ion impregnation. Bar= 18 μ m.

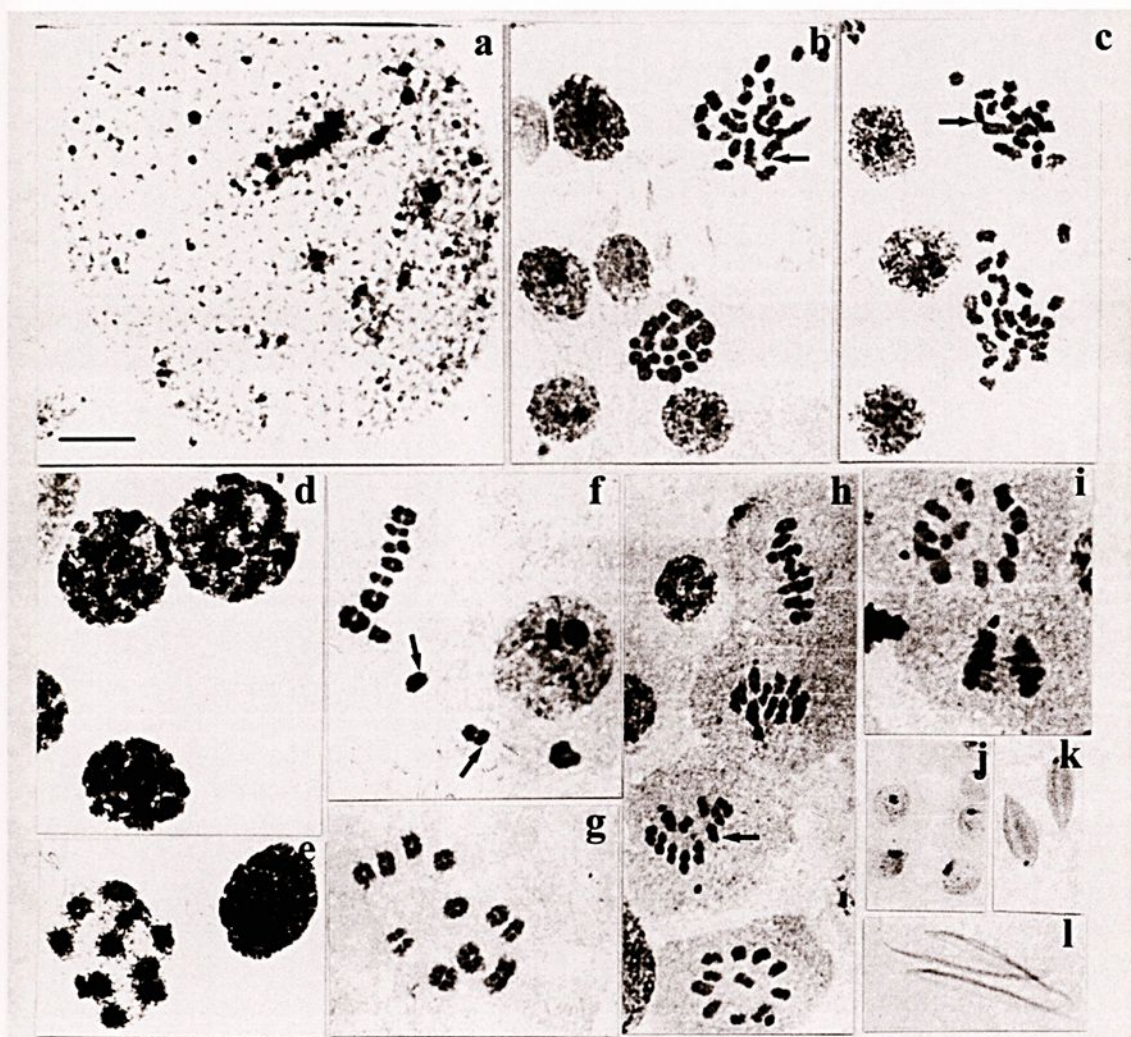
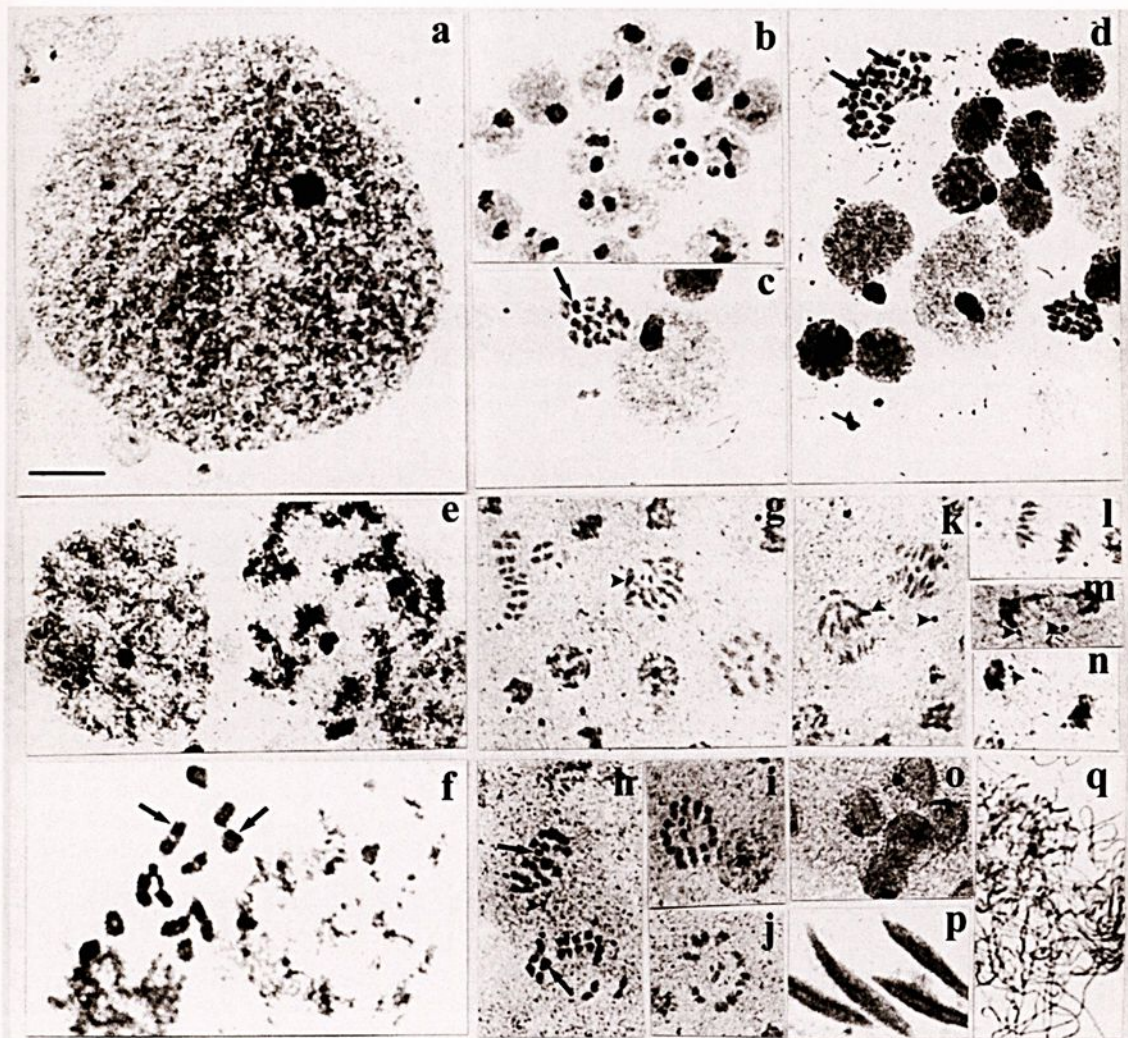


Fig.3 *Triatoma tibiamaculata* testicular tubules submitted to silver-ion impregnation. (a) Polyploid nucleus of the tubule wall nutritive cells with a larger and several smaller silver-ion impregnated corpuscles. (b) Interphase nuclei of tubule spermatogonial cells: peripheral or central nucleolar regions. (c-d) Spermatogonial metaphase with silver-ion marked chromosomes (arrows). (e) Nuclei at meiotic prophase I (confused stage): several nucleolar dots within the nucleus and a strongly impregnated nucleolar corpuscle. (f) Metaphase at first meiotic division: some bivalents marked with silver (arrows). (g-j) Metaphase at second meiotic division: some autosomal bivalents impregnated with silver (arrows) and one nucleolar fragment or corpuscle per cell (arrowheads). (k-m) Second meiotic anaphase: sexual chromosome with late migration and the presence of one nucleolar fragment or corpuscle per cell (arrowheads). (n) Second meiotic telophase: presence of one nucleolar fragment or corpuscle at each pole of the dividing cell (shown by arrowhead). (o) Spermatids at initial differentiation; one nucleolar corpuscle present in every cell. (p) Spermatids at a more advanced differentiation stage: absent silver-ion impregnation. (q) Spermatozoans. Bar= 18 μ m.



REFERENCES

- BICUDO, H. E. M. C., MADI-RAVAZZI, L., NANYA, S. 1992. *Simplified Ag-staining technique for nucleolar organizing regions and nucleoli*. Rev. Bras. Gen. 15: 199-200.
- FAKAN, S., HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. 1986. *The nucleolus and the nucleolar organizer regions*. Biology of the Cell 56: 189-206.
- FISCHER, D., WEISENBERGER, E., SCHEER, U. 1991. *Assigning functions to nucleolar structures*. Chromosoma 101: 133-140.
- GOODPASTURE, C., BLOOM, S. E. 1975. *Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining*. Chromosoma 53: 37-50.
- HERNÁNDEZ-VERDÚM, P., DERENZINI, M., BOUTEILLE, M. 1984. *Relationship between the AG-NOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis inhibition*. J. Ultrastruct. 88: 55-65.
- HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. 1991. *The nucleolus today*. Journal of Cell Science 99: 465-471.
- HOWELL, W. M., BLACK, D. A. 1980. *Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method*. Experientia, 104-105.
- LENT, H., WYGODZINSKY, P. 1979. *Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease*. Bulletin of the American Museum of Natural History, New York 163: 127-497.



- MANNA, G. K., 1995. *Chromosomes in Evolution in Heteroptera*. In: Sharma A. K. and Sharma A., (Eds.) "Chromosomes in Evolution in Eukaryotic Groups", Florida, Boca Raton 189-225.
- MEDINA, F. J., SOLANILLA, E. L., SANCHEZ-PINA, M. A., FERNANDEZ-GOMEZ, M. E., RISUNO, M. C. 1986. *Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining*. *Chromosoma* 94: 259-266.
- MELLO, M. L. S. 1995. *Relocation of RNA metachromasy at mitosis*. *Acta Histochem. Cytochem.* 28: 149-154.
- PARVINEN, M., VIHKO, K. K., TOPPARI, J. 1986. *Cell Interactions during the seminiferous epithelial cycle*. In: — "Cytology: A survey of cell biology". 3 ed. New York: Academic Press 104: 115-151.
- RASKA, I. 1995. *Nuclear structures associated with the RNA synthesis and processing*. *Journal of Cellular Biochemistry*: 59, 11-26.
- SCHEER, U., WEISENBERGER, D. 1994. *The nucleolus*. *Current opinion in Cell Biology* 6: 354-359.
- SUMNER, A. T. 1990. *Nucleolar organizers (NORs)*. In: THOMAS A. (ed.). "Chromosome banding". Pp. 39-68. Unwin, Hyman, Boston.
- TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1999a. *Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus Panstrongylus*. *Cytologia* 46: 235-240.



- TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1999b. *Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, Panstrongylus megistus and P. herreri*. Caryologia 52: 177-184.
- TAVARES, M.G., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1997. *Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines*. Cytobios 89: 93-103.
- WACHTLER, F., M., STHAL, A. 1993. *The nucleolus: A structural and functional interpretation*. Micron. 24: 473-505.

This paper will be submitted to Caryologia.



**COMPARATIVE STUDY OF C-BANDING AND RESTRICTION
ENDONUCLEASES (*Hae*III and *Alu*I) IN GERMINATIVE CELL LINES
IN THREE SPECIES OF TRIATOMINES (HETEROPTERA,
REDUVIIDAE)**

**GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR* and MARIA
TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA**

G.D.C. Severi-Aguiar and M.T.V. Azeredo-Oliveira, Department of Biology –
Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto,
University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São
José do Rio Preto, S.P., Brazil.

*Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do
Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail:
grasielaguilar@aol.com

Running Title: C-banding and endonucleases restriction treatment in holocentric
chromosomes of triatomines.



**COMPARATIVE STUDY OF C-BANDING AND RESTRICTION
ENDONUCLEASES (*Hae*III and *Alu*I) IN GERMINATIVE CELL LINES
IN THREE SPECIES OF TRIATOMINES (HETEROPTERA,
REDUVIIDAE)**

Summary

In the present work, three species of triatomines, *Triatoma protacta*, *Triatoma platensis* and *Triatoma tibiamaculata* were compared by C-banding and treatment with restriction endonucleases *Hae*III and *Alu*I. The behaviour of both enzymes was similar in all species. The formation of a chromocenter in *T. platensis* spermatogonial cells and the varying presence of highlights in *T. tibiamaculata* sex chromosomes, are phenomena not observed in other species. Restriction endonuclease banding allows the differentiation of heterochromatin classes and thus expands classic cytogenetic investigations in holocentric chromosomes of these hematophagous insects ("kissing-bugs"). The study of chromosomal structure of these triatomines indicates that some intire autosomes are heterochromatic and others present only extremities positive band-C. The sexual chromosome X is heterochromatic, CG-rich, in *T. platensis* and *T. tibiamaculata*.

Key words: triatomines, heterochromatin, C-banding, restriction endonuclease, holocentric chromosomes



Introduction

Chagas' disease is a parasitosis of endemic nature and one of the most prevalent heart diseases in South America. Its vectors are the hematophagous heteroptera of the family Reduviidae and subfamily Triatominae. These insects are of great cytogenetic interest because they present an unusual form of meiosis, in which the segregation of sex chromosomes and chromosomes with diffuse kinetochores (known as holocentric), is post-reductional (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999a).

Bacterially derived enzymes, produced to fight infections caused by phages of DNA or RNA by restricting their activity, are very useful in studying DNA for they can recognize specific sites and cleave the double helix. These enzymes are known as restriction endonucleases (REs) (PETITPIERRE, 1996).

REs have been employed to produce chromosome banding in a variety of organisms such as insects, vertebrates and some plant species. In insects, the most used restriction enzymes are *AluI*, *HaeIII*, *HindIII* and *Hinfl*. Very frequently, the resultant patterns are C band-like and each of these enzymes reveals characteristic band subsets (SUMNER, 1990b).

Restriction enzymes cleave DNA specific recognition sequences and produce a band pattern. The amount of DNA, actually extracted from the chromosomes, depends on how accessible they are to recognition



sequences and how frequent these sequences are. The regions resistant to digestion or those containing few accessible sites do not yield a significant band pattern and it very often resembles C-banding. In mammals, amphibians and insects, the use of REs has evidenced the presence of repeated DNA subclasses in both intra and interspecific constitutive heterochromatin (HARTLEY, 1991).

Restriction endonuclease banding provides more information about the characteristics of constitutive heterochromatin regions than C-banding. Using REs, IÑIGO *et al.* (1993) demonstrated that two species of the genus *Diciostaurus* (Orthoptera, Acrididae) exhibited significantly different heterochromatic contents and that, in one of them, there was an extra heterochromatic segment. GOSÁLVEZ *et al.* (1987) observed that, in locusts, DAPI-distamycin-positive heterochromatin, that should be AT-rich, was digested following treatment with *Hae* III, known for cleaving CG-rich sequences.

*Hae*III may produce G or C banding patterns or even a combination of both (MEZZANOTTE *et al.*, 1983). The restriction sites for this enzyme comprise a sequence of GG↓CC bases and the chromosomal regions found between G bands are guanine-rich, leading one to suppose that *Hae*III preferably digests interband regions and thus enhances the appearance of G-bands (BIANCHI *et al.*, 1985). G-like banding has been described in, for example, the metaphase chromosomes of the enguila *Anguilla anguilla* (VIÑAS *et al.*, 1994) and the primate *Saimiri boliviensis boliviensis* (GARCIA *et al.*, 1995). On the other hand, a C-band-like pattern has been very often reported in the fly *Culiseta*



longiareolata (MARCHI & MEZZANOTTE, 1988), in the bivalve *Mytilus galloprovincialis* (MARTÍNEZ-LAGE *et al.*, 1994) and in two triatomines species of the genus *Panstrongylus* (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999b) among others.

It is worth of note that the activity of restriction endonucleases may be different in the homologue components of chromosomal pairs. The existence of these polymorphisms revealed by REs, not always identified by conventional C-banding, indicates the presence of different base sequences in the homologue areas of chromosomes, and thus point out differences in regions supposedly complementary. The use of these enzymes can greatly contribute to the study of chromosomes and expand the understanding of the evolutive process in related species. This study analyzed comparatively the chromosomal behaviour pattern in three species of the genus *Triatoma* (*Triatoma protacta*, *Triatoma platensis* and *Triatoma tibiamaculata*) following C-banding and treatment with restriction endonucleases *Hae*III and *A*hlI.

Material and Methods

All the species studied, *Triatoma protacta*, *Triatoma platensis* and *Triatoma tibiamaculata*, belong to the order Heteroptera, subfamily Triatominae and family Reduviidae (LENT & WYGODZINSKY 1979; MANNA, 1995). The specimens (adult males) were provided by the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the

Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School. The testicular tubule cells of these insects were crushed and fixed in acetic acid. Subsequently, they were submitted to C-banding (SUMNER, 1982, modified by SALLES & CARVALHO, 1985) and treatment with restriction endonucleases *Hae*III and *Alu*I (Sigma Chemical Company) that cleave 5'-GG↓CC-3' and 5'-AG↓CT-3' sequences, respectively. Ten enzyme units were used per each 100 µl of reaction solution (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 50 mM of NaCl; 10 mM of MgCl₂ and 1 mM of dithiothreitol). The slides were placed in a moist chamber and incubated for 16 hours at 36°C±1. In the control experiments, the chromosomes were treated only with the incubation buffer (same time and temperature). Preparations were stained with 2% Giemsa in phosphate buffer, pH 6.8, for 30 minutes. For documentation KODAK TMAX 100ASA was used. Black-and-white photomicrographs were taken under an OLYMPUS BX40 microscope.

Results

The testicular tubules of *Triatoma platensis*, *Triatoma protacta* and *Triatoma tibiamaculata* were submitted to C-banding and treatment with restriction enzymes, *Hae*III and *Alu*I. The results were compared.

Triatoma protacta

C-Banding



The polyploid nuclei of testicular tubule wall germinative cells exhibited one larger and several smaller heterochromatic corpuscles (Figure 1a). The interphase nuclei of testicular tubule spermatogonial cells generally presented one to five heterochromatic corpuscles either at the periphery or spread within the nucleus. Spermatogonial metaphases generally showed highlighted spots at the extremities (Figure 1b). The nuclei at the beginning of meiotic prophase I (confused stage) had a very evident heterochromatic corpuscle and another that was not so bright. At the metaphases of first and second division, some chromosomes had stains, specially at their extremities (Figure 1c-f).

HaeIII

The polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall displayed a single heteropyknotic corpuscle (Figure 1g). Spermatogonial metaphases showed pale interstitial bands (Figure 1h). At meiotic metaphase I (MI), the autosomes exhibited highlights at their extremities (less digested by the enzyme). The sex chromosomes showed no stains (Figure 1i-j).

AluI

The polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall showed a single heteropyknotic corpuscle (Figure 1k). Spermatogonial metaphases exhibited telomeric highlights (Figure 1l). Autosomes at MI and MII showed highlights at different locations (Figure 1m-n).



*Triatoma platensis***C-banding**

The polyploid nuclei of testicular tubule wall nutritive cells presented several heterochromatic corpuscles (Figure 2a). The nuclei beginning meiotic prophase I (confused stage) had several heterochromatic corpuscles that were quite evident. Spermatogonial metaphases presented highlights (Figures 2b-c) though completely heterochromatic chromosomes were also seen (Figures 2b-c, indicated by an arrow). At metaphases I (Figure 2d-e) and II (Figures 2f-g) highlights were seen in some chromosomes, specially at the extremities (indicated by an arrow).

HaeIII

A larger and other smaller heteropyknotic corpuscles were found in the polyploid nuclei of the seminiferous tubules wall (Figure 2h). Spermatogonial prophases showed chromocentric regions, indicating association between the heteropyknotic regions of some chromosomes and fragmented euchromatic regions (Figure 2i-j). Spermatogonial metaphases exhibited telomeric highlights associated with some chromosomes, forming a chromocenter, and pale interstitial bands (Figure 2k). At metaphases I (Figure 2l-n) and II (Figure 2o) it was observed that one of the chromosomes was larger and heteropyknotic whereas the remainder had some interstitial bands (arrows).

AluI

Several large and heteropyknotic corpuscles were observed in the polyploid nuclei of seminiferous tubules wall (Figure 2p). Spermatogonial metaphases exhibited telomeric highlights associated with some chromosomes, forming a chromocenter, and pale interstitial bands (Figure 2s). Photomicrograph sequences showed the chromocenter association at spermatogonial prophase (Figure 2q*), the beginning of heterochromatic chromosomal regions separation at the prometaphases (Figure 2q★) and the subsequent chromosomal condensation and chromocenter dissociation at the spermatogonial metaphases (Figure 2r). At both MI (Figure 2t-u) and MII (Figure 2v), chromosomes with some interstitial bands were observed (arrows).

Triatoma tibiamaculata

C-banding

The polyploid nuclei of testicular tubule wall nutritive cells presented a larger and other smaller heterochromatic corpuscles (Figure 3a). The nuclei beginning meiotic prophase I (confused stage) had two quite visible heterochromatic corpuscles. Spermatogonial metaphases generally presented some heterochromatic chromosomes (Figures 3b-c). At metaphases I (Figure 3d-g) and II (Figure 3h), there were highlights in some chromosomes, specially at the extremities. In the spermatids beginning spermiogenesis there were heterochromatic dots at the periphery.

HaeIII

The polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall displayed a single heterochromatic corpuscle (Figure 3i). Spermatogonial metaphases showed chromosomes with some telomeric highlights (Figure 3j-k). At MI (Figure 3l-m) and MII (Figure 3n-q), some autosomes exhibited interstitial highlights and the sex chromosomes showed no stains.

AluI

The polyploid nuclei of the seminiferous tubules wall showed a single heterochromatic corpuscle (Figure 3r). Spermatogonial metaphases exhibited chromosomes with some telomeric highlights (Figure 3s). At MI, autosomes showed interstitial highlights and small telomeric highlights were observed in the sex chromosomes (Figure 3t - arrows). At MII, the autosomes showed small interstitial and telomeric highlights and the sex chromosomes sometimes showed highlights sometimes not (Figure 3u-x).

Discussion

The results of the present study, obtained by using C-banding in the chromosomes of *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*, corroborated that the chromosomes of Heteroptera present small amounts of C heterochromatin, preferably at their extremities (CAMACHO *et al.*, 1985).



According to LHOE & ROBERTS (1988, *apud* VERMA 1988), studies using satellite probes and restriction enzymes indicated that, within the chromosome, constitutive heterochromatin distribution, defined by C-banding, and highly repetitive DNA, defined by *in situ* hybridization, frequently, but not always, coincide. This indicates that heterochromatin does not solely consists of highly repeated DNA, which is not exclusively located in constitutive heterochromatin regions.

Condensed chromatin is transcriptionally inactive. Nonetheless, a chromosomal region may be inactive for two reasons. First, because it is in a repressed state due to the fact that it has a coding DNA that is temporarily and reversibly inactive. Second, because it is composed of non-coding DNA and therefore unable to transcribe (LHOE & ROBERTS, 1988 *apud* VERMA, 1988).

In the literature, there is information indicating that not all animals show correspondence between C-bands and heterochromatin. In the locust *Cryptobothrus chrysophorus*, several chromosomal pairs have terminal chromatin blocks, but the heterochromatin block M5 never shows C-banding (SUMNER, 1990a).

A reason for the study of C-banding during spermatogenesis is provided by the evidences that suggest that heterochromatin function may be related not to somatic but germinative cells. In *Diptera* polytene chromosomes, heterochromatin is generally sub-replicated, suggesting it is not important in these



chromosomes (SUMNER, 1990a). In a variety of organisms, heterochromatin is completely eliminated in somatic cells, but always retained in germinative cells. In germinative lines, heterochromatin plays a role in chiasma formation at meiosis. Crossing-over rarely occurs in heterochromatin itself (JOHN & MIKLOS, 1979; SUMNER, 1990a), but, maybe, the highly significant fact is that heterochromatin blocks affect crossing in the adjacent euchromatic chromosomal segments. In a species of *Australian locusts*, chiasma frequency clearly correlates with heterochromatin amount. The greater heterochromatin amount, the smaller number of chiasmata (MIKLOS, 1976 *apud* SUMNER, 1990a). Because telomeric heterochromatin causes a substantial reduction in the formation of chiasmata in the adjacent euchromatin not only crossing frequency but also its position are altered. In *Allium* species, chiasmata are preferably found adjacent to C-bands, but wherever C-bands are absent, the chiasmatic regions are not so localized (SUMNER, 1990a).

Several functions have been proposed for satellite DNA and constitutive heterochromatin. These functions include the identification of homologue centromeres, meiotic pairing, structural protection for regions such as centromeres and ribosomal genes and crossing-over regulation. Then it is well established that heterochromatin blocks influence crossing-over in euchromatin, affecting not only the frequency of chiasmata but also their position (SUMNER, 1982).



Very often, constitutive heterochromatin blocks occupy the same position in every chromosome of a given karyotype. In most species (humans, schistosomes, drosophilids, cherimoya and others), these blocks are situated in the centromere or immediately beside it. Less frequently, it is preferably or exclusively telomeric (as in onion, garlic and the species under study), and may occupy different positions in the chromosome (as in wheat and rye).

It is noteworthy that in the Heteroptera species herein analyzed, spermatids, beginning cell differentiation, presented C-band heterochromatic dots. These bandings are likely to be related with those obtained with silver-impregnation in initial spermatids (SEVERI-ÁGUIAR & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999). According to the literature, this heterochromatin, that in the case of triatomines is related to NOR, is a reflex of the post-meiotic reactivation of ribosomal genes transcription. In the spermatogenesis of rats, heterochromatic dots are observed in initial spermatids and are also present after silver dyeing (CZAKER, 1987).

Heterochromatin amount and position generally differ from species to species. Even among closely related species, different numbers and localization of heterochromatic bands, as well as different heterochromatin amounts, can be observed (SUMNER, 1990a).

The analysis performed in the present work also allowed us to observe that the three species studied showed very similar behavior following



treatment with *Hae*III and *Alu*I. This is probably due to two major factors. First, because the enzyme action was blocked by the degree of heterochromatic and chromosomal compaction. And, second, because both endonucleases cleave CG-rich regions.

SUMNER (1990b) suggested that the resistance presented by certain C-bands to restriction endonucleases is not likely to be due to lack of cleavage sites. It is known that, in some cases, DNAs located in C-bands are more difficult to be extracted than euchromatic DNA and that some enzymes may extract the entire or most part of the DNA from certain C-bands. It is probable that enzyme digestion is altered by a series of factors, such as heterochromatin compaction degree, protein-DNA interaction, size of the generated DNA fragment, enzyme conformation and methylation.

The effects of restriction endonucleases on fixed chromosomes are explained by factors such as the presence or absence of specific DNA base-sequences in some chromosomal regions, the enzyme ability to cleave a target-sequence that, depending on chromatin organization, may not be accessible and also the length of this target-sequence. Thus, the possibility of detecting highly repeated DNA sequences in other regions besides positive C-band regions shows that the combined use of restriction endonucleases and conventional cytogenetic techniques enhances our capacity to analyze the different kinds of chromatin organization and helps to disclose its heterogeneity (GOSÁLVEZ *et al.* (1987 *apud* SUMNER, 1990b). Conventional restriction



endonuclease banding does not directly detect the sites of enzyme attack but induces DNA loss, therefore they do not detect these sites efficiently. Other experimental procedures may and should be performed to determine the sites of cleavage (SUMNER, 1990b).

Several studies have been undertaken on the effect of chromatin organization on the activity of restriction endonucleases. BIANCHI *et al.* (1985), studying six different enzymes, concluded that chromatin packaging has little or no role in RE banding induction and suggested that the frequency of cleavage sites for the enzyme is the major cause of chromosome banding. Other authors, such as LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (1988), corroborate this idea.

On the other hand, in a study on triatomines, TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (2000) demonstrated a digestion pattern at the initial stages of meiosis (confused stage, pachitene and dyplotene) and observed that REs were ineffective at metaphase. Thus, they put forth the hypothesis that some kind of protein-DNA interaction or other factors in chromatin packaging might have influenced the results. In our study, *T. protacta* prometaphases showed light and dark bands resultant from enzyme digestion, whereas *T. platensis* metaphases I seemed to show failure in the enzyme functional efficiency. The fact that the chromosomes of these insects are holocentric can interfere with the enzymatic digestion pattern.

MEZZANOTTE & FERRUCI (1984) suggested that the base composition of certain chromosomal regions is required but not sufficient to



yield endonuclease digestion banding and that chromatin structure plays a primary role, in allowing or prohibiting, enzyme-DNA interaction in fixed chromosomes. As pointed out by SUMNER (1990b), the two critical factors responsible for banding are DNA accessibility to endonucleases and the ability of the digested DNA to diffuse within the chromosome.

It is interesting to note that many enzymes fail to cut their recognition sequence if it is methylated. Adenine and cytosine may be methylated, but only 5-methyl-cytosine occurs in eukaryotic DNAs (SUMNER, 1990b). This may explain the fact that in *T. tibiamaculata* metaphases II, one of the sex chromosomes, probably X, is sometimes stained but not always, probably due to the activity or inactivity of the genes there situated. This phenomenon was described in triatomines of the genus *Panstrongylus* submitted to C-banding (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999b).

SOLARI (1979) demonstrated that, in *Triatoma infestans*, the heterochromatin blocks of some autosomes together with those of the sex chromosomes, formed an heteropyknotic chromocenter during meiotic prophase. TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999b) observed the same in *Panstrongylus*, though such chromocenter consisted only of the heterochromatin regions of the sex chromosomes. In any way, constitutive heterochromatin was reported in both cases it was. In the present work, this same behaviour was observed in the spermatogonial, and therefore mitotic cells of *T. platensis*, following treatment with both enzymes, suggesting the presence of constitutive



heterochromatin in the chromosomal regions involved in the formation of the chromocenter.

In a general way, in addition to conventional methods, restriction endonucleases applied to cytological preparations are valuable tools to be used in cytogenetic analyses that allow the classification of heterochromatin subtypes, providing a source of studies and questioning about its action.

Banding may be useful in studying chromosomal evolution in several ways, as, for example, differentiation among related species. Differences in heterochromatin amount, position and type are very common. Related species may differ not only in the heterochromatin amount of their genome but also in band number, localization and staining properties (WARCHALOWSKA-SLIWA *et al.*, 1994). On the other hand, RE banding may corroborate the existing knowledge of the species evolution. The three species analyzed in this work, *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*, presented similar behavior following treatment with *Hae* III and *Alu* I, which may be an indication of great evolutive proximity among them.

Acknowledgements

The authors are thankful to dr. José M. Soares Barata, João Luís Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, respectively, director and technicians of the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public



Health School (São Paulo, SP), for providing the specimens analyzed. Special thanks to FAPESP (98/12876-6) and CAPES for their financial support.



Fig. 1. Cells testis of *Triatoma protacta* submitted to C-banding (a-f) and endonuclease restriction treatment with *Hae*III (g-j) and *Alu*I (k-n). After C-banding the polyploid nuclei of testicular tubule wall germinative cells exhibited a single heterochromatic corpuscle (Figure 1a). Spermatogonial metaphases generally showed highlighted spots at the extremities (Figure 1b). Metaphases of first and second division, some chromosomes had stains, specially at their extremities (Figure 1c-f). After *Hae*III treatment the polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall displayed a single heteropyknotic corpuscle (Figure 1g). Spermatogonial metaphases showed pale interstitial bands (Figure 1h). At meiotic metaphase I (MI), the autosomes exhibited highlights at their extremities (less digested by the enzyme). The sex chromosomes showed no stains (Figure 1i-j). After *Alu*I treatment the polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall showed a single heteropyknotic corpuscle (Figure 1k). Spermatogonial metaphases exhibited telomeric highlights (Figure 1l). Autosomes at MI and MII showed highlights at different locations (Figure 1m-n). Bar=18 μ m.

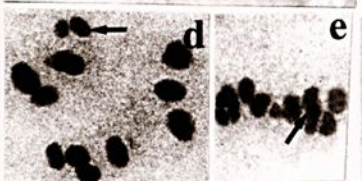
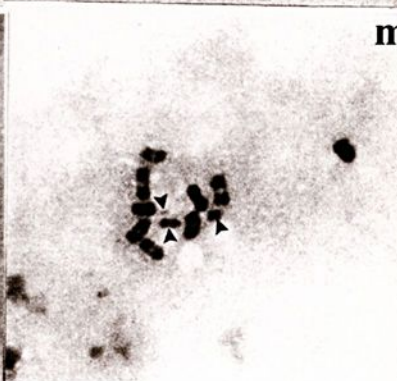
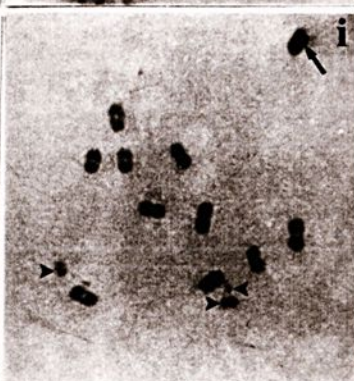
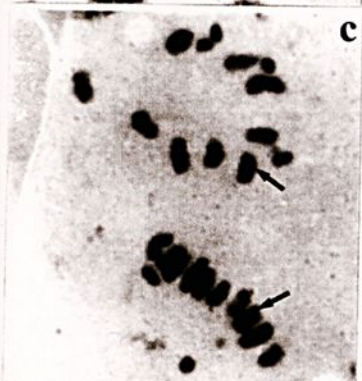
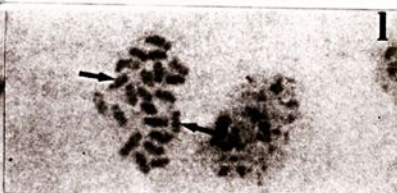
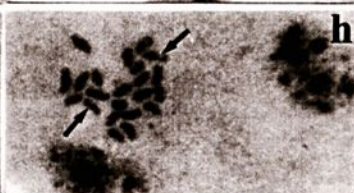
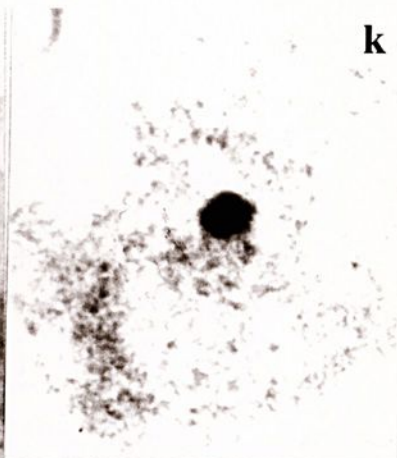
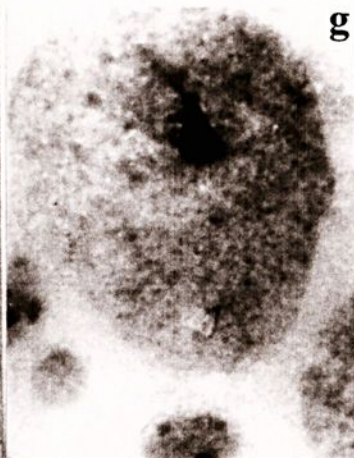
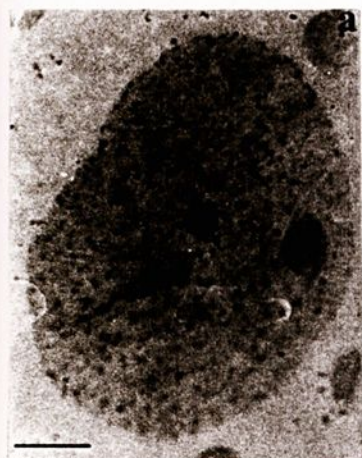


Fig. 2. Cells testis of *Triatoma platensis* submitted to C-banding (a-g) and endonuclease restriction treatment with *Hae*III (h-o) and *Alu*I (p-v). After C-banding the polyploid nuclei of testicular tubule wall nutritive cells presented several heterochromatic corpuscles (Figure 2a). Spermatogonial metaphases presented highlights (Figures 2b-c) though completely heterochromatic chromosome were also seen (Figures 2b-c, indicated by an arrow). At metaphases I (Figure 2d-e) and II (Figures 2f-g) highlights were seen in some chromosomes, specially at the extremity (indicated by an arrow). After *Hae*III treatment a larger and other smaller heteropyknotic corpuscles were found in the polyploid nuclei of the seminiferous tubules wall (Figure 2h). Spermatogonial prometaphases showed chromocentric regions, indicating association between the heteropyknotic regions of some chromosomes and fragmented euchromatic regions (Figure 2i-j). Spermatogonial prometaphases exhibited telomeric highlights associated with some chromosomes, forming a chromocenter, and pale interstitial bands (Figure 2k). At metaphases I (Figure 2l-n) and II (Figure 2o) it was observed that one of the chromosomes was larger and heteropyknotic whereas the remainder had some interstitial bands (arrows). After *Alu*I treatment several large and heteropyknotic corpuscles were observed in the polyploid nuclei of seminiferous tubules wall (Figure 2p). Spermatogonial prometaphases exhibited telomeric highlights associated with some chromosomes, forming a chromocenter, and pale interstitial bands (Figure 2s). Photomicrograph sequences showed the chromocenter association at spermatogonial initial prophase (Figure 2q*), the beginning of heterochromatic chromosomal regions separation at the final prophase (Figure 2q★) the subsequent chromosomal condensation and chromocenter association (Figure 2r) and chromocenter dissociation at the spermatogonial metaphases (Figure 2s). At both MI (Figure 2t-u) and MII (Figure 2v), chromosomes with some interstitial bands were observed (arrows). Bar=18µm.



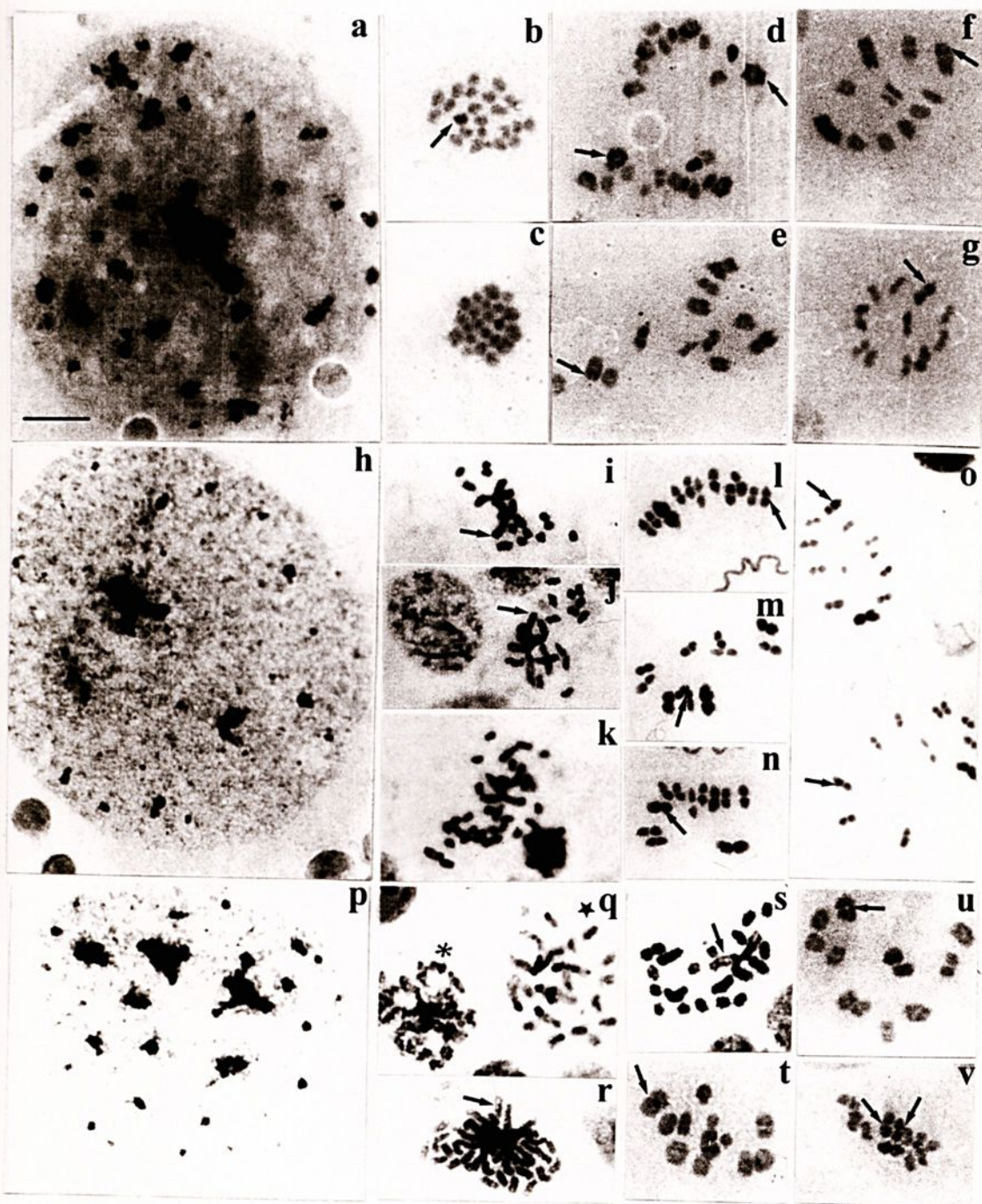
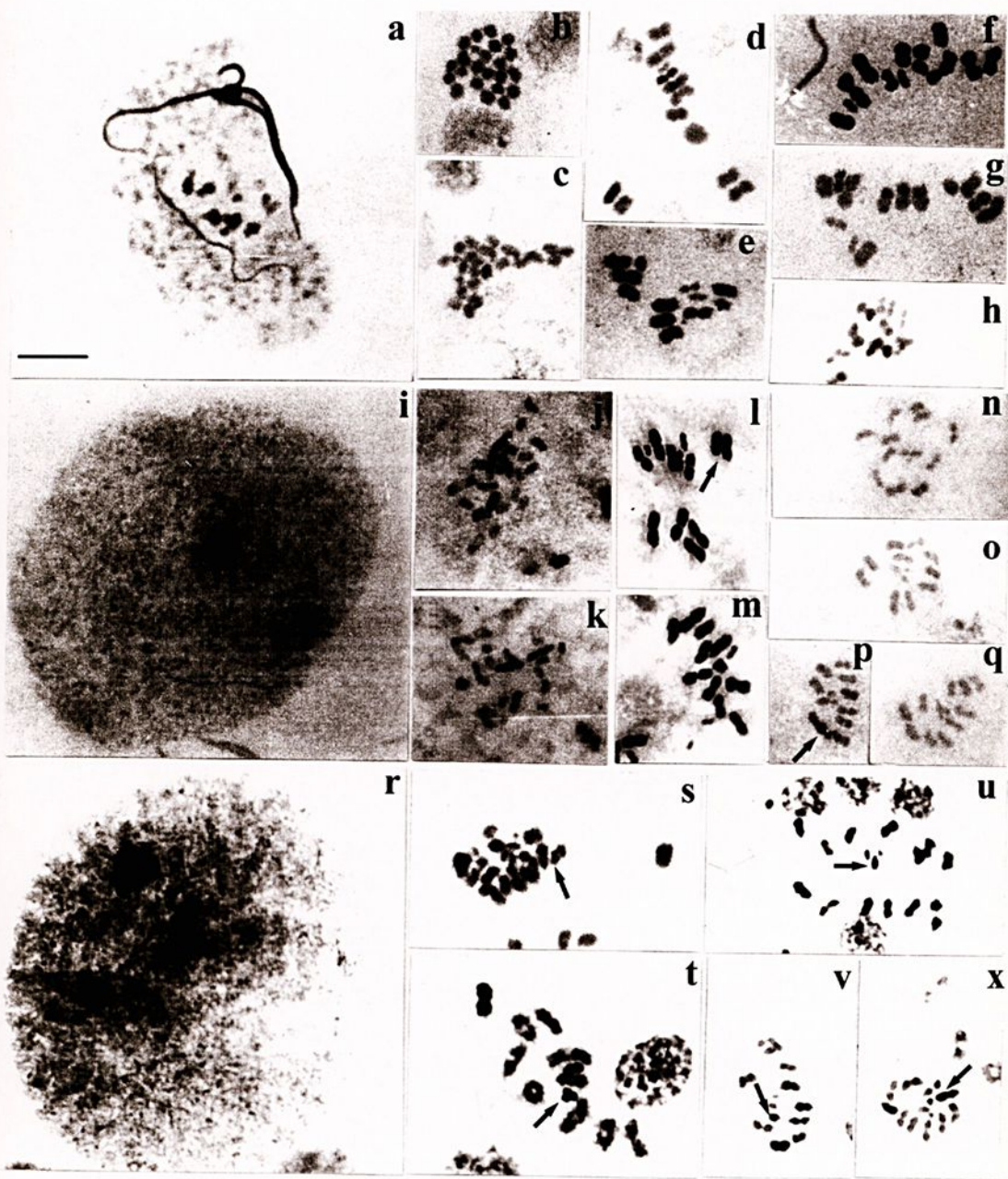


Fig. 3. Cells testis of *Triatoma tibiamaculata* submitted to C-banding (a-h) and endonuclease restriction treatment with *Hae*III (i-q) and *Alu*I (r-x). After C-banding the polyploid nuclei of testicular tubule wall nutritive cells presented a larger and other smaller heterochromatic corpuscles (Figure 3a). Spermatogonial metaphases generally presented some heterochromatic chromosomes (Figures 3b-c). At metaphases I (Figure 3d-g) and II (Figure 3h), there were highlights in some chromosomes, specially at the extremities. After *Hae*III treatment the polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall displayed a visible heterochromatic corpuscle (Figure 3i). Spermatogonial metaphases showed chromosomes with some telomeric highlights (Figure 3j-k). At MI (Figure 3l-m) and MII (Figure 3n-q), some autosomes exhibited interstitial highlights and the sex chromosomes showed no stains. After *Alu*I treatment the polyploid nuclei of the seminiferous tubules wall showed a visible heterochromatic corpuscle (Figure 3r). Spermatogonial metaphases exhibited chromosomes with some telomeric highlights (Figure 3s). At MI, autosomes showed interstitial highlights and small telomeric highlights were observed in the sex chromosomes (Figure 3t - arrows). At MII, the autosomes showed small interstitial and telomeric highlights and the sex chromosomes sometimes showed highlights sometimes not. (Figure 3u-x). Bar=18 μ m.





References

- BIANCHI, M.S., N.O, BIANCHI, G.E., PANTELAS & S. WOLFF, 1985. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases. *Chromosoma* 91: 131-136.
- CAMACHO, J. P. M., J. BELDA & J. CABRERO, 1985. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 491-497.
- CZAKER, R. 1987. Relative position of constitutive heterochromatin and of nucleolar structures during mouse spermiogenesis. *Anat. Embryol.* 175: 467-475.
- GARCÍA, M., A. BORRELL, M. MUDRY, J. EGOZCUE & M. PONSÁ, 1995. Prometaphase karyotype and restriction-enzyme banding in squirrel monkeys, *Saimiri boliviensis boliviensis* (Primates: Platyrrhini). *Journal of Mammalogy* 76: 497-513.
- GOSÁLVEZ, J., J.L. BELLA, C. LÓPEZ-FERNÁNDEZ & R. MEZZANOTTE, 1987. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). *Heredity* 59: 173-180.
- HARTLEY, S.E., 1991. Restriction enzyme banding in atlantic salmon (*Salmo solar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Genet. Res. Camb.* 57: 273-278.
- IÑIGO, E.R., J.L. BELLA & G. DE LA VEJA, 1993. Heterochromatin differentiation between two species of the genus *Dociostaururs* (Orthoptera: Acrididae). *Heredity* 70: 458-465.



- JOHN, B. & G. L. G. MIKLOS, 1979. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International Review of Cytology* 58: 1-114.
- LENT, H. & P. WYGODZINSKY, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York 163: 127-497.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., J. GOSÁVEZ, J.A. SUJA & R. MEZZANOTTE, 1988. Restriction endonuclease digestion of meiotic and mitotic chromosomes in *Pygomorpha conica* (Orthoptera: Pygomorphidae). *Genome* 30: 621-626.
- MANNA, G. K., 1995. Chromosomes in Evolution in Heteroptera. In: Sharma A. K. and Sharma A., (Eds.) *Chromosomes in Evolution in Eukaryotic Groups*, Florida, Boca Raton 189-225.
- MARCHI, A. & R. MEZZANOTTE, 1988. Restriction endonuclease digestion and chromosome banding in the mosquito *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). *Heredity* 60: 21-26.
- MARTÍNEZ-LAGE, A., A. GONSÁLEZ-TIZÓN & J. MÉNDEZ, 1994. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after G-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249.
- MEZZANOTTE, R., U. BIANCHI, R. VANNI & L. FERRUCCI, 1983. Chromatin organization and restriction endonuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 36: 562-566.



- MEZZANOTTE, R. & L. FERRUCI, 1984. Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. *Genetica*, 64: 123-128.
- PETITPIERRE, E., 1996. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 25: 115-133.
- SALLES, J. M., CARVALHO, C. R., 1985. Banda C em cariótipos somáticos de Triatomíneos. *Ciência e Cultura* 37: 725.
- SEVERI-AGUIAR, G.D.C., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., 1999. Análise da espermiogênese em duas espécies de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera), com ênfase às regiões organizadoras nucleolares e heterocromáticas. *Genetics and Molecular Biology* 22: 27-28.
- SOLARI, A. J., 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.
- SUMNER, A., T. 1982. The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Genet. and Cytogenetics* 6: 59-87.
- SUMNER, A., T. 1990a. C-banding and related methods. In: *Chromosome banding*. Boston, Unwin Hyman, cap. 4, p. 39-68.
- SUMNER, A., T., 1990b. Banding with nucleases. In: *Chromosome banding*. Boston, Unwin Hyman, cap. 12, 253-271.



- TARTAROTTI, E. & M. T. V. AZEREDO-OLIVEIRA, 1999a. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia* 64: 235-240.
- TARTAROTTI, E. & M. T. V. AZEREDO-OLIVEIRA, 1999b. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios* 99: 113-122.
- TARTAROTTI, E. & M. T. V. AZEREDO-OLIVEIRA, 2000. Restriction endonuclease banding and digestion resistant heterochromatin in triatomines, genus *Panstrongylus*. *Caryologia* 53: 235-243.
- TAVARES, M. G. & AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. , 1997 Cytogenetics study on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera:Reduviidae). *Cytobios* 89: 51-61.
- VERMA, R. S., 1988. Heterochromatin and structural aspects. Cambridge University Press.
- VIÑAS, A., C. GÓMEZ, P. MARTÍNEZ & L. SÁNCHEZ, 1994. Induction of G-banding on *Anguilla anguilla* chromosomes by the restriction endonucleases *Hae* III, *Hinf* I and *Mse* I. *Cytogenet. Cell Genet.* 65: 79-81.
- WARCHALOWSKA-SLIWA, E., A. G. BUGROV & M. NADACHOWSKA, 1994. Karyotypes, C-banding pattern and NORs of the genus *Montana zeuner* 1941 (Orthoptera, Tettigoniioidea, Decticinae). *Folia Biologica (kraków)* 42.

This paper will be submitted to *Genetica*.



**STUDY OF THE CHROMOSOMAL STRUCTURE OF TRIATOMINES
(HETEROPTERA , TRIATOMINAE) AFTER DIFFERENTIAL
FLUOROCHROME STAINING**

**Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar* and Maria Tercília Vilela de
Azeredo-Oliveira**

G.D.C. Severi-Aguiar and M.T.V. Azeredo-Oliveira, Department of Biology –
Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto,
University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São
José do Rio Preto, S.P., Brazil.

***Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar**

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do
Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail:
grasielaguilar@aol.com

Running Title: Fluorochrome staining in chromosomes of triatomines.



**STUDY OF THE CHROMOSOMAL STRUCTURE OF TRIATOMINES
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE) AFTER DIFFERENTIAL
FLUOROCHROME STAINING**

Abstract

The insects of the subfamily Triatominae are of great scientific interest because they are hematophagous specimens that cause Chagas' disease, responsible for one of the highest mortality rates in developing countries. Several cytogenetic aspects of these invertebrates have been reported in the literature. However, little is known about the composition of the bases of some specific regions of their chromosomes, such as the Nucleolar Organizer Regions and the constitutive heterochromatin regions. These work presents the pattern of affinity between some fluorochromes that are specific for GC-rich or AT-rich regions and certain chromatin regions of triatomine testicular cell nuclei (*Triatoma protacta*, *Triatoma platensis* and *Triatoma tibiamaculata*). Our results shown mainly that Y chromosome is DAPI⁺ (AT-rich) and X chromosomes are CMA₃⁺ (GC-rich), corroborating the hypothesis that the origin of multiple X chromosomes lies on the fragmentation or dissociation of a single pre-existing X chromosome.

Key words: triatomines, cytogenetics, holocentric chromosomes, chromomycin A₃ (CMA₃), DAPI, quinacrine mustard

Introduction

Currently, most researches in molecular cytogenetics focus on humans and other vertebrates, and plants. Insects, on their turn, require more attention and should be studied through these new cytogenetic methods. As the chromosomes of most insects lack euchromatic bands, such as band G, they may be identified by using DNA-specific fluorochromes to reveal their heterochromatic bands.

Approximately 15 types of fluorochromes are used in chromosome banding and many of them show base specificity. Quinacrine mustard, that produces the so called Q bands, is not specific for heterochromatin. It intercalates with DNA and preferably binds to AT-rich DNA regions (Sumner, 1990).

The DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) technique was first used by Schweizer and Nagl (1976), and also shows high AT-specificity. Its mechanism, though not clearly understood, is likely to be similar to that of Hoechst 33258.

Chromomycin A₃, another fluorochrome, complements the other banding techniques. It is specific for GC-rich regions, has an effect similar to that of the R-band on the euchromatic parts of the chromosome, and is very useful to characterize heterochromatin. Distamycin A, combined with these fluorochromes, enhances banding fluorescence, due to the competitive exclusion



that occurs between these substances, and allows the heterochromatic regions to be better identified (Sumner, 1990).

The eukaryotic chromosomes have specific structures (telomeres, centromeres, heterochromatin and Nucleolar Organizer Region) and are associated with kinetocores that are protein regions where fuse strands bind. The structural and physiological interaction of these structures is responsible for the independence and movement of the chromosomes during cell division.

Triatomines, hematophagous insects responsible for Chagas' disease in humans, possess holocentric chromosomes, that are, chromosomes that lack specifically localized centromeres and show diffuse kinetocores along the chromatid. The microtubules, therefore, interact with most part of the chromatid length during cell division. Moreover, these chromosomes present other peculiarities: they have no primary constriction; at metaphase, each chromosomal long axis runs parallel to the equatorial plate; and, at anaphase, the chromatids move while their long axes are kept parallel to the equatorial plate fuses.

The structural and physiological composition of holocentric chromosomes is still little understood. Therefore, molecular cytogenetic techniques may be important tools to elucidate the mechanisms that involve the behavior of these chromosomes during both mitotic and meiotic processes.



In the present study, testicular cells of the species *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*, were analyzed on the basis of differential banding with fluorochromes.

Materials and methods

Adult male specimens of three species of the genus *Triatoma*, *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata*, had their testes crushed, fixed and submitted to fluorescent banding with chromomycin A₃ (CMA₃), DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), that were counterstained with distamycin A (DA) (Schmid, 1980), and also quinacrine mustard. The insects were provided by the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA) (Araraquara, SP), organ of the Department of Epidemiology, Health Public School – São Paulo University (SP- Brazil). Photomicrographs were obtained with a microscope OLYMPUS BX-FLA, double filter (BP450-480) for quinacrine mustard and triple filter (BP510-550) for the other fluorochromes, and for documentation 400 ASA ULTRA film KODAK were used.

Results

The testicular tubules of *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata* were submitted to fluorescent banding with chromomycin A₃ (CMA₃), quinacrine mustard and DAPI and the results were compared.



Triatoma protacta

When submitted to CMA_3 , the polyploid testicular tubule wall nuclei presented dispersed chromatin with no regions of great CMA_3 -affinity (Figure 1a). The spermatogonial nuclei showed chromatinic portions of CMA_3 -affinity (Figure 1b) and the spermatogonial metaphase chromosomes displayed CMA_3^+ telomeric bands (Figure 1c). The nuclei at confused stage showed a chromocenter and several labeled regions (Figure 1d). At meiotic metaphase I (MI), it was observed that one of the sex chromosomes had little affinity for CMA_3 (Figure 1e-f) (arrows). At meiotic metaphases II (MII), one of the sex chromosomes was CMA_3^+ (arrow) and the other was CMA^- (figure 1 g-h).

After submission to quinacrine mustard, the polyploid testicular tubule wall nuclei presented a block of great affinity for the fluorochrome (Figure 1i). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter (Figure 1j). Spermatogonial metaphase chromosomes without bands were seen (Figure 1k). The nuclei at confused stage presented some fluorochrome-labeled regions (Figure 1l). Meiotic metaphases I and II showed no positive label (Figure 1m-n).

DAPI-banding revealed that the polyploid testicular tubule wall nuclei presented a block of great affinity for the fluorochrome (Figure 1o). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter (Figure 1p). The spermatogonial metaphase chromosomes showed no bands (Figure 1q) and the nuclei at confused stage presented several regions with affinity for the

fluorochrome (Figure 1r). The chromosomes at MI showed no DAPI⁺ bands (Figure 1s) whereas at MII, one of the sex chromosomes was DAPI⁺ (Figure 1t).

Triatoma platensis

CMA₃-banding revealed that the polyploid testicular tubule wall nuclei presented dispersed chromatin with some regions with greater affinity for the fluorochrome (Figure 2a). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter (Figure 2b). The pre-meiotic nuclei (Figure 2c) and the nuclei at confused stage presented a chromocenter (Figure 2d).

When submitted to quinacrine mustard, the polyploid testicular tubule wall nuclei presented several small blocks of great affinity for the fluorochrome (Figure 2e). The spermatogonial nuclei had a chromocenter (Figure 2f) that was maintained when the nuclei entered division (Figure 2g). The nuclei at confused stage also presented a chromocenter (Figure 2h-I). Both at MI (Figure 2h) and MII (Figure 2l), chromosomes showed no quinacrine mustard-positive regions.

DAPI-banding revealed that the polyploid testicular tubule wall nuclei had a large block and some smaller ones of great affinity for the fluorochrome (Figure 2j). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter (Figure 2k). The pre-meiotic nuclei showed two DAPI-positive regions (Figure 2l). The nuclei at confused stage presented large chromocenters (Figure 2m), that were still seen at diplotene (Figure 2n), but not at diakinesis (Figure 2o).

Triatoma tibiamaculata

When submitted to CMA₃-banding, the polyploid testicular tubule wall nuclei presented dispersed chromatin (Figure 3a) and the spermatogonial nuclei showed two CMA₃-positive regions (Figure 3a). The spermatogonial metaphases had no CMA₃⁺ bands (Figure 3b-c). The nuclei at confused stage presented regions of great affinity for the fluorochrome (Figure 3d-e). At MI, one of the chromosomes exhibited sometimes CMA₃⁺ extremities and sometimes CMA₃⁺ chromatids (Figure 3f-g). At MII, two of the sex chromosomes were CMA₃⁺ and the other was not (Figure 3h).

By quinacrine mustard-banding it was only possible to observe that the polyploid testicular tubule wall nuclei presented a single block of great affinity for the fluorochrome (Figure 3i) since the remaining phases of cell division could not be documented because they were not present in the material analyzed.

After being submitted to DAPI, the polyploid testicular tubule wall nuclei presented a single block of great affinity for the fluorochrome (Figure 3j). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter that sometimes seemed bipartite (Figure 3k). The spermatogonial metaphases showed no positive regions (Figure 3l). The nuclei at confused stage presented a chromocenter, that also seemed bipartite (Figure 3m). Both at MI (Figure 3n) and MII (Figure 3o-p), one of the sex chromosomes was DAPI⁺.



Discussion

The impact of modern banding techniques, that reveal a longitudinal differentiation of the chromosomes, was expressive on most eukariotes. However, while the chromosomes of superior vertebrates present characteristic G bands or equivalent bands (Q and R), similar banding patterns are not obtained in invertebrates and inferior vertebrates. To achieve a G band of quality, the chromosomes must be free from surrounding cytoplasmic material that is almost inevitable in the case of insects, where chromosomes are generally obtained by crushing.

Until not long ago, researches on insects focused solely on heterochromatin that appeared condensed throughout the cell cycle and was visible until telophase, contrarily to euchromatin. The advent of molecular cytogenetic techniques has just begun to provide information on chromatin constitution in invertebrates. Thus, the data found in the literature are scarce and mostly refer to fish and other vertebrates.

Pfister *et al.* (1997) analyzed the mitotic chromosomes of the fish *Orthospinus franciscensis* (Characidae) using CMA₃ and demonstrated that there is an evident association between silver-labeled secondary constrictions and GC-rich heterochromatin. This phenomenon is common among inferior vertebrates and is likely to be due to the high content of GC bases in the ribosomal spacer genes or the adjacent repeated DNA. Anjum *et al.* (1997) submitted *Cyprinus carpio* mitotic chromosomes to CMA₃, following silver impregnation,



and observed polymorphisms in the nucleolar organizer regions. This is explained by the fact that this fluorochrome stains the heterochromatin connected to both active and inactive NORs, while the material stained with silver is not rDNA itself, but material composed of chromosomal proteins in active NORs or transcribed rRNA and in the fibrillar structure of the nucleolus. In 1998, Anjum and Jankum, using CMA₃, confirmed the existence of NORs in the short arm of a pair of submetacentric chromosomes in *Cyprinus carpio*. Souza *et al.* (2000) observed the same in the fish *Pimelodus gr. Altipinnis*. In *Apareidon ibitiensis*, after CMA₃ treatment, the nucleolar chromosomal pair showed fluorescence that also evidenced heteromorphism in NOR size (Schneider and Dias, 2000). On the other hand, in the species *Hoplias malabaricus*, CMA₃-labeled chromosomes in heterochromatic blocks not associated with NORs were observed. Thus, in this genus, most NORs are not compatible with GC-rich heterochromatin (Pazza and Margarido, 2000).

In fibroblasts of the chiropter *Molossops planirostris* submitted to sequential staining (AgNO₃, CMA₃ and DAPI), it was observed that all NORs transcriptionally active are CMA₃⁺ and DAPI⁻ (Leite-Silva *et al.*, 2000).

In two species of locusts (*Cornops aquatium* and *Cornops frenatum frenatum*), cells of testicular and ovarian follicles were submitted to CMA₃/DA/DAPI staining. The results showed that the second specie has a larger number of CMA₃⁺ blocks, that occur in all chromosomes of the complement



whereas in the first specie these blocks are restricted to NORs (Rocha and Souza, 2000).

The coleopter *Tenebrio molitor* presented DAPI⁺ bands in the pericentric regions and CMA⁺ bands at the distal regions of the chromosomes (Petipierre, 1996). Triple staining (CMA₃/DA/DAPI) in the coleopter *Lyogenus fuscus* Blanchard, 1850, revealed that all heterochromatin blocks are DAPI⁺, coinciding with the C-band pattern (Castro-Lira *et al.*, 2000), in contrast to what has been shown in these insects, in which heterochromatin is predominantly AT-rich. Brito-Ribon *et al.* (1999), used C-banding and CMA₃-banding to analyze four species of bees of the genus *Partamona* in order to acquire a better understanding of the group phylogeny and verified that CMA₃⁺ bands were euchromatic in some species and heterochromatic in others.

The results of this present work showed a pattern of affinity for different fluorochromes in the three species. In *T. protacta*, the telomeres of the spermatogonial chromosomes were found to be CMA₃⁺ and DAPI⁻, i.e., heterochromatic, and at metaphases II, it was noted that one of the sex chromosomes is CMA₃⁺ and the other is DAPI⁺. In *T. tibiamaculata*, two sex chromosomes are CMA₃⁺ and one is DAPI⁺.

The use of fluorochrome (specially DAPI/DA and CMA₃/DA) banding techniques allowed us to infer that the X chromosome is CMA₃⁺ and, therefore, GC-rich, and the Y chromosome is DAPI⁺, showing great concentrations of AT-bases. These results thus confirm previous findings about



the heterochromatic nature of these chromosomes in these same species, obtained with the C-banding technique and by endonucleases (*HaeIII* and *AluI*) (Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2000).

It is noteworthy that *T. tibiamaculata*, that have multiple sex chromosomes (X_1X_2Y), showed the same results, that is, CMA_3^+ in all X chromosomes. Such an affinity for the same fluorochrome (CMA_3) thus corroborates the hypothesis that, in triatomines, the origin of multiple sex chromosomes lies on the fragmentation or dissociation of a single pre-existing X chromosome (Ueshima, 1979; Azeredo-Oliveira, 1990; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999).

The testicular cells of these species under study were previously submitted to silver-ion impregnation and the results indicated that the sex chromosomes probably bear Nucleolar Organizer Regions (NORs) (Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 1999 a,b). The association of these data with those obtained by enzyme digestion, specially those obtained through the use of the enzyme *HaeIII*, whose function is to cleave GGXCC regions (data not published) added to the findings of the present work, indicate, more clearly, that the X chromosome, both in species with a single X and those with two X chromosomes, actually bear NORs.

It is also noteworthy that, in the literature, NORs have already been reported to be associated with regions of GC-rich secondary constrictions in a great variety of chromosomes belonging to plants and animals.



The association between Ag-NORs and GC-specific fluorochromes, such as chromomycin A₃, is very common in lower vertebrates. A high content of GC-bases in the ribosomal spacing genes or in the adjacent repeated DNA, are probably responsible for this association (Schmid, 1980). Therefore, the enzyme digestion of these regions by *Hae*III and differential chromomycin A₃ fluorescence allow a better understanding of the localization, at interphase of rDNA segments, responsible for transcription of rRNA 45S, precursor molecule of ribosomal subunits (Guerra, 1988; Sumner, 1990).

As for the Y chromosome, the DAPI positive label obtained in this study in the species *T. protacta* and *T. tibiamaculata* confirms its repeated AT-rich heterochromatic nature.

Some autosomes of *T. protacta* positively responded to CMA₃ labeling in their extremities. This result coincides with that obtained by C-banding, in the same species, in a previous work (data not published). These complimentary techniques thus demonstrate the chemical composition of these GC-rich heterochromatic regions.

In a group of insects, such as triatomines, information about chromatin composition is practically unavailable. Thus, the determination of the number and localization of GC or AT-rich regions represents a great advance toward the localization of constitutive heterochromatin regions and nucleolar organizer regions.



Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. José Soares Barata, director, and João Luis Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, technicians of the Insectary of the Araraquara Specil Health Service (SESA) (Araraquara, SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School (São Paulo University, SP, Brazil) for providing the specimens studied; to Prof. Dr. Silvia G. Pompolo for kindly helping to set up the protocols of the fluorescent banding techniques; to Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga for helping with the photomicrographs. Special thanks to FAPESP (98/12876-6) and CAPES for their financial support.



Fig. 1a-t *T. protacta* testicular tubules submitted to chromomycin A₃ (CMA₃) (a-h), quinacrine mustard (i-n) and DAPI (o-t). (a) Polyploid nucleus with disperse chromatin; (b) interphase and prophase spermatogonial nuclei; (c) spermatogonial metaphases with bands at chromosomal extremities; (d) nuclei at the confused stage showing a chromocenter and several labeled regions; (e-f) metaphases I with one of the sex chromosomes showing little affinity for CMA₃ (arrow); (g-h) metaphases II with one of the sex chromosomes CMA₃⁺ (arrow) and the other is CMA₃⁻ (i) polyploid nuclei with an heterochromatin corpuscle; (j) spermatogonial nuclei; (k) spermatogonial metaphase; (l) nucleus at confused stage; (m) MI; (n) MII; (o) polyploid nucleus with only one heterochromatic corpuscle; (p) spermatogonial nuclei; (q) spermatogonial metaphase; (r) nucleus at confused stage; (s) MI; and (t) MII showing one of chromosomes is DAPI⁺ (Y). Bar= 10µm.

MI- metaphase of the first meiotic division; MII- metaphase of the second meiotic division

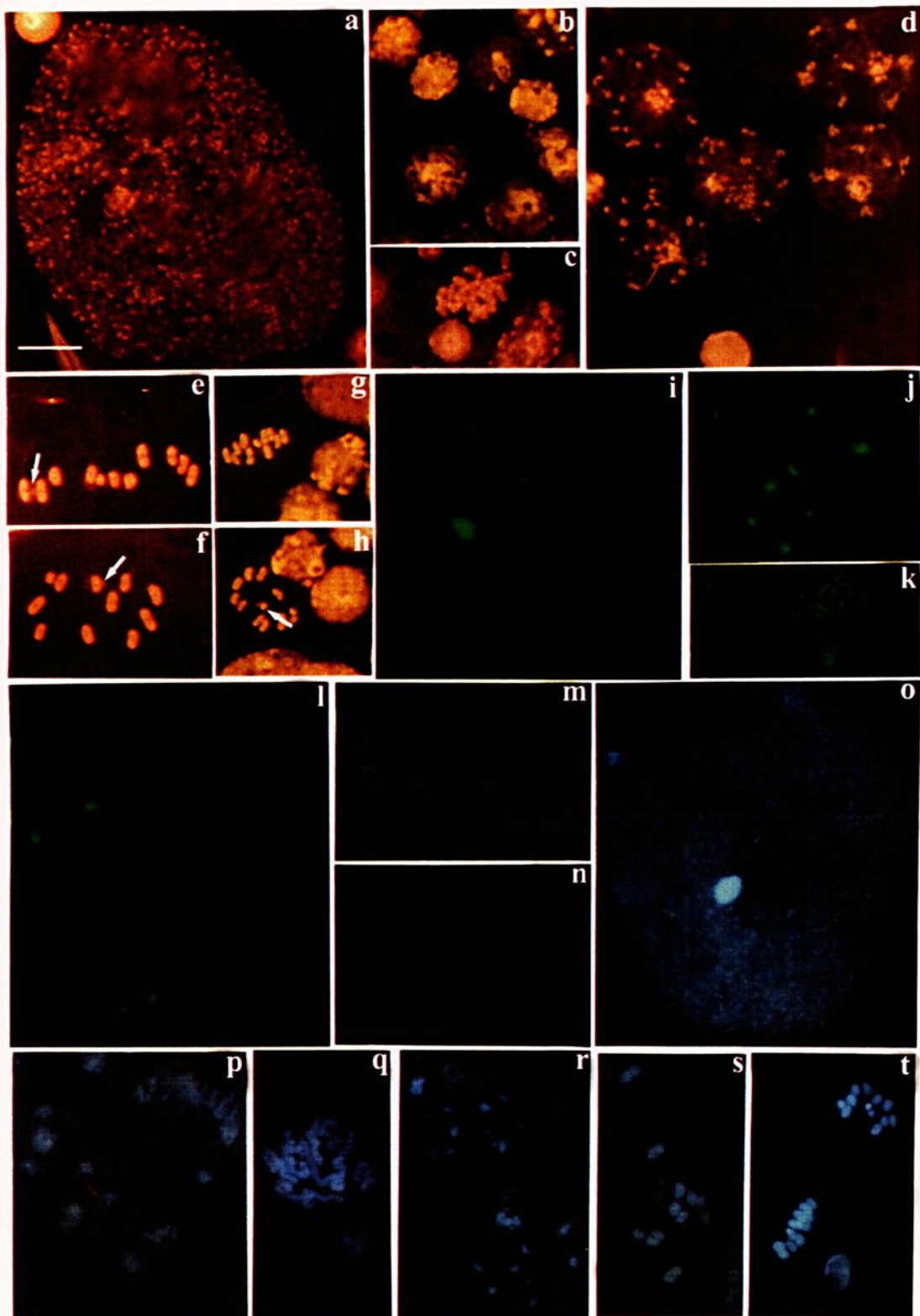


Fig. 2a-o *T. platensis* testicular tubules submitted to chromomycin A₃ (CMA₃) (a-d), quinacrine mustard (e-i) and DAPI (j-o). (a) Polyploid nucleus with disperse chromatin; (b) interphase spermatogonial nuclei; (c) interphase pre-meiotic nuclei with chromocenter; (d) nuclei at confused stage showing chromocenter; (e) polyploid nucleus with several small heterochromatic blocks; (f) interphase spermatogonial nuclei; (g) dividing spermatogonial nuclei; (h) MI and nucleus at confused stage; (i) MII; (j) polyploid nucleus with a large heterochromatin block; (k) spermatogonial nuclei; (l) pre-meiotic nuclei; (m) nucleus at confused stage; (n) diplotene; (o) diakinesis. Bar= 10µm.

MI- metaphase of the first meiotic division; MII- metaphase of the second meiotic division

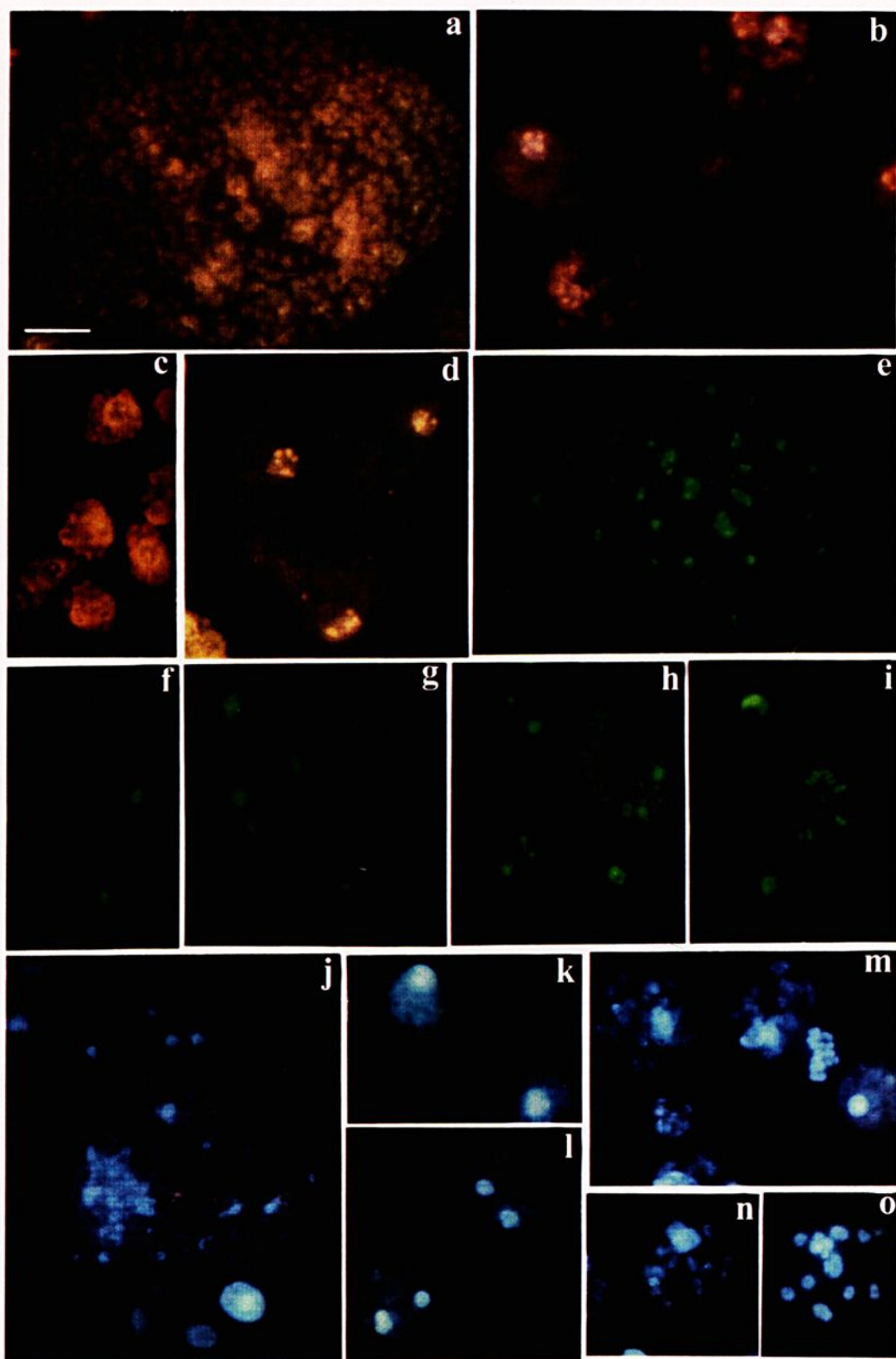
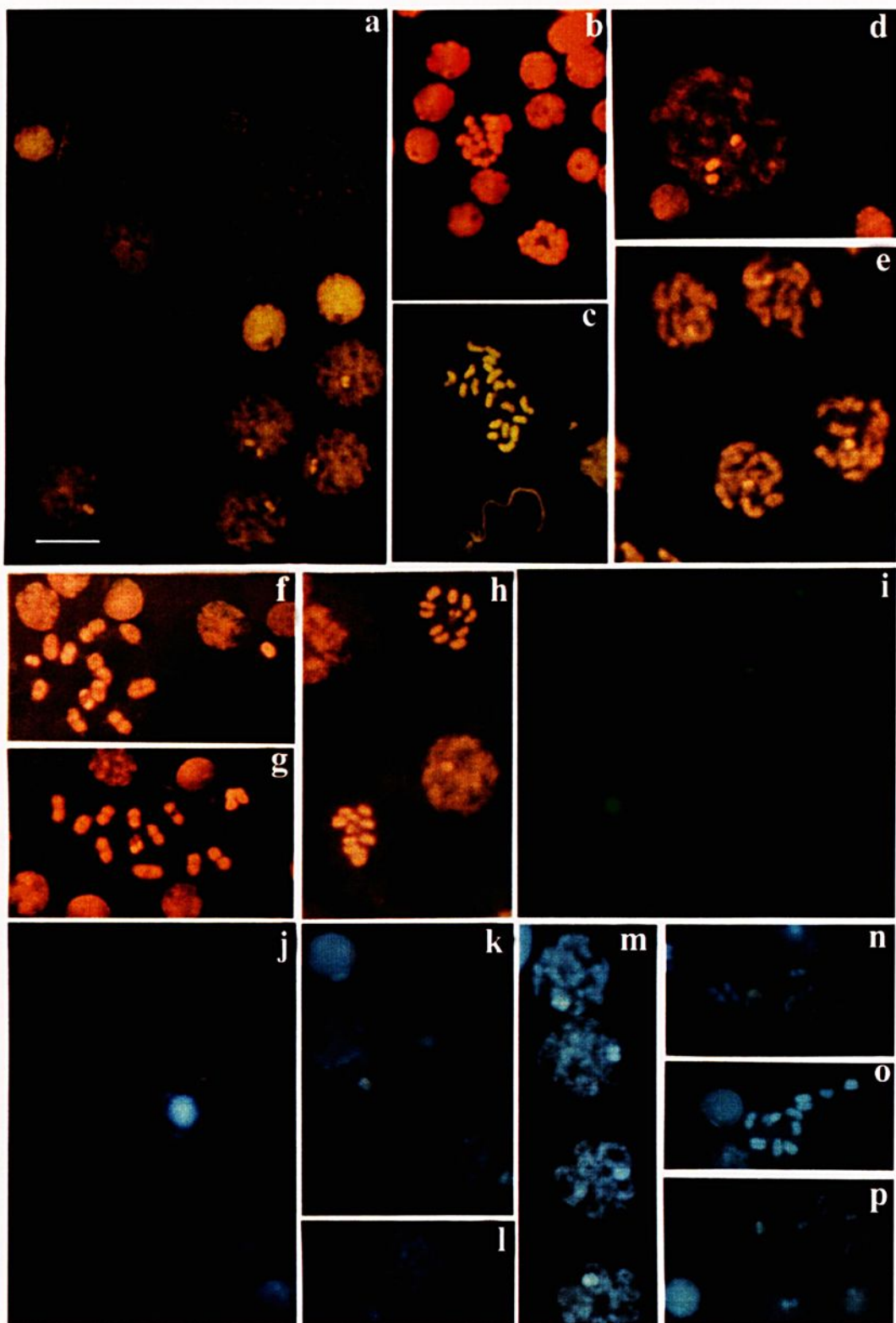


Fig. 3a-p *T. tibiamaculata* testicular tubules submitted to chromomycin A₃ (CMA₃) (a-h), quinacrine mustard (i) and DAPI (j-p). (a) Polyploid nucleus with disperse chromatin, interphase and prophase spermatogonial nuclei with two small corpuscles; (b-c) nuclei and metaphase spermatogonial; (d-e) nuclei at the confused stage showing a CMA₃⁺ corpuscle; (f-g) metaphases I with one of the sex chromosomes showing sometimes CMA₃⁺ extremities and sometimes CMA₃⁺ chromatids; (h) metaphases II with two CMA₃⁺ sex chromosomes and one with no positive region; (i) polyploid nuclei with a single heterochromatin corpuscle and spermatogonial nuclei with two small corpuscles; (j) polyploid nucleus with only one heterochromatic corpuscle; (k) spermatogonial nuclei; (l) spermatogonial metaphase; (m) nucleus at confused stage with chromocenter; (n) MI showing one of chromosomes is DAPI⁺ (Y); (o-p) MII. Bar= 10µm.

MI- metaphase of the first meiotic division; MII- metaphase of the second meiotic division





References

- Anjum, R., Jankum, M., Hohlman, K., Kersten, P. (1997) Silver and chromomycin A₃ staining of nucleolus organizer regions in the chromosomes of ornamental (Koi) common carp, *Cyprinus carpio*. *Cytobios* 90: 73-79.
- Anjum, R., Jankum, M. (1998) NOR-bearing chromosomal associations revealed through silver and sequential chromomycin A₃ staining in the mirror carp, *Cyprinus carpio* L. *Cytobios*.93: 157-163.
- Azeredo-Oliveira, M.T.V. (1990) Cytogenetic study in the malpighian tubules, salivary glands and testes of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Thesis Abstracts. Rev. Bras. de Genetica (Braz. J. Genetics)* 13: 640-642.
- Brito-Ribon, R. M., Miyazawa, C. S., Pompolo, S. G. (1999) First Karyotype characterization of four species of *Partoma* (Friesse, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponidae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios* 100: 19-26.
- Castro-Lira, A., Moura, R.C. (2000) Análise do cariótipo de *Lyogenys fuseus* Blanchard, 1850 (Coleóptera, Scarabaeidae, Melolonthinae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 10-11.
- Guerra, M. (1988) Introdução à Citogenética Geral. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 142p.
- Leite-Silva, C., Santos, N., Souza, M. J., Fagundes, V., Yonenaga-Yassuda, Y. (2000) *Genetics and Molecular Biology* 23: 31.



- Pazza, R., Margarido, V. P. (2000) Fluorocromo GC-específico em *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae) coletados na bacia do Rio Iguaçu, Paraná. *Genetics and Molecular Biology* 23: 51.
- Petitpierre, E. (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the *Coleoptera*. *Int. J. Insect Morphol. & Embriol* 25: 115-133.
- Pfister, S. C., Moreira Filho, O., Bertollo, L. A. C. (1997) Cytogenetic studies in *Orthospinus franciscensis* (Pisces, Characidae, Stethaprioninae) and some considerations about kariotype evolution of the group. *Cytobios* 91: 97-101.
- Rocha, M. F., Souza, M. J. (2000) Análise citogenética em *Cornops aquaticum* e *Cornops frenatum frenatum* (Orthoptera, Acididae, Leptysminae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 9.
- Severi-Aguiar, G.D.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V. (1999a) Análise da espermiogênese em duas espécies de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera), com ênfase às regiões organizadoras nucleolares e heterocromáticas. *Genetics and Molecular Biology* 22: 27-28.
- Severi-Aguiar, G.D.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V. (1999b) Cytogenetic study on holocentric chromosomes of *Triatoma platensis* (Heteroptera: Reduviidae). *Acta Microscopica* 8: 51-52.
- Severi-Aguiar, G.D.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2000). Estrutura dos cromossomos holocêntricos de *Triatoma tibiamaculata* (Triatominae,



- Heteroptera) com base no bandamento C e na digestão com as endonucleases de restrição *Hae*III e *Alu*I. *Genetics and Molecular Biology* 23: 7.
- Schmid, M. (1980). Chromosome banding in amphibian IV. Differentiation of GC and AT rich regions in *Anura*. *Chromosoma* 77: 83-103.
- Schneider, T. A. A., Dias, A. L. (2000). Dados cariotípicos em *Apareiodon ibitiensis* (Pisces, Parodontidae) coletados na baía do Rio Tibagi/ PR. *Gen. Mol. Biol.* 23: 59.
- Schweizer, D., Nagl, W. (1976) Heterochromatin diversity in *Cybidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp. Cell. Res.* 111: 327-32.
- Souza, A., C. P., Nagamachi, C. Y., Rodrigues, L. R. R., Rissino, J. D., Barros, R. M. S., Pieczarka, J. C. (2000). Descrição cariotípica de *Pimelodus gr. Altipinnis* (Siluriforme, Pimelodidae). *Genetics and Molecular Biology* 23: 65-66.
- Sumner, A. T. (1990) Chromosome banding. Unwin Hyman, London.
- Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, M T. V. (1999) Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios.* 99: 113-122.
- Ueshima, N. (1979) Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal Cytogenetics*. p. 1-117. Gebrüder Borntraeger, Berlin.

This paper will be submitted to *Chromosoma*.



**LOCALIZATION OF rDNA SITES IN HOLOCENTRIC
CHROMOSOMES OF THREE SPECIES OF TRIATOMINES
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE)**

**GRASIELA DIAS DE CAMPOS SEVERI-AGUIAR* and MARIA
TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA**

G.D.C. Severi-Aguiar and M.T.V. Azeredo-Oliveira, Department of Biology – Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto, University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São José do Rio Preto, S.P., Brazil.

*Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail: grasielaguilar@aol.com

Running Title: Fuorescent *in situ* hybridization (FISH) in triatomines.



**LOCALIZATION OF rDNA SITES IN HOLOCENTRIC
CHROMOSOMES OF THREE SPECIES OF TRIATOMINES
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE)**

Summary

Chromatin organization in the holocentric chromosomes of three triatomines species was cytologically studied by fluorescent *in situ* hybridization with rDNA 28S-probe of *Drosophila melanogaster* to localize ribosomal genes. In *T. tibiamaculata*, metaphases I showed telomeric highlights in a single, larger bivalent. In *T. protacta*, hybridization in one of the telomeres of an autosomal chromosome was seen. In *T. platensis*, there was highlights in a single, smaller chromosome (X-chromosome). The results obtained didn't agree with the expected localization of rDNA genes in the sex chromosomes in triatomines, like demonstrating by silver-ion impregnation.

Key-words: Fluorescent *in situ* hybridization, Nucleolar Organizer Region (NOR), holocentric chromosomes, Heteroptera, triatominae.



Introduction

Triatomines are hematophagous insects that are of great medical and sanitary importance because they are vectors of Chagas' disease. In addition, they are an excellent models for cytogenetic studies because they have holocentric chromosomes and sex chromosomes that have an uncommon form of meiosis (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti and Azeredo- Oliveira, 1999).

Thus, as in the remaining eukariotic organisms, their ribosomal genes are organized in two highly repeated gene families. The family that codes for the major ribosomal subunit composed of rRNA 28S, 18S and 5, 8S and the family that codes for the minor ribosomal subunit composed of rRNA 5S. The first gene family corresponds to the Nucleolar Organizer Regions (NORs), and is identified with silver-staining. It is one of the most studied genomic portions and an important chromosomal marker even in phylogenetic analyses (Deiana *et al.* 2000).

Hirai *et al.* (1996) inferred that kinetochores, like active NORs, are silver-stained in many eukariotes, but that this method is not always efficient in detecting rDNA sites in inactive NORs. Thus, fluorescent in situ hybridization (FISH) becomes necessary. In the present work we report the results of hybridization of *Drosophila melanogaster* rDNA 28S probe with the meiotic chromosomes of three triatomine species ("kissing-bugs").



Material and Methods

Young male specimens of the triatomine species *T. protacta*, *T. platensis* and *T. tibiamaculata* were provided by the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School, São Paulo University (SP, Brazil). Meiotic cells, obtained by crushing the testes, were fixed in 45% acetic acid.

In situ hybridization was done with a 12kb-rDNA probe (pDm 238- *Drosophila melanogaster*, 15ng/ μ l) biotin-labeled with bionik (Gibco BRL- nick translation) as described by Viégas-Pequignot (1992). The chromosomal preparation were pre-treated with RNase, dehydrated in an ethanol series, air-dried and denatured in 70% formamide (20% 10x SSC) at 70°C, for 2 minutes and, immediately, dehydrated in an ethanol series: 50%, 75% and 100%. Hybridization was done for 40 hours in a moist chamber at 37°C.

The slides were twice washed in 50% formamide (2xSSC) and twice in 2xSSC for 5 minutes each. Subsequently, they were incubated with the first antibody (antibiotin) for 45 minutes in a moist chamber at 37°C. Following washing in PBT (PBS 0.1%, Tween 20 and 0.4% of BSA 30% w/v) the slides were incubated for 45 minutes with the second antibody (RAG- FITC) in a moist chamber at 37°C. Then, they were submitted to a final washing in PBT, stained with propidium iodide and mounted with an antifade (vectashield).



Photomicrographs were taken under a microscope OLYMPUS BX- FLA. FITC filter (BP450-480). For documentation were use Kodak 400 ASA ULTRA film.

Results

Fluorescent *in situ* hybridization showed that rDNA genes were differently distributed in the species studied. At metaphases I, *T. platensis* fluorescent spot was seen in X chromosomes (figure 1 a-b).). In *T. protacta*, hybridization occurred in one of the telomeres of an autosomal chromosome (figure 1c-d) and *T. tibiamaculata* displayed telomeric stains in a single and larger bivalent (figure 1e-g). In all the species analyzed, fluorescent regions were observed in interphase nuclei.

Discussion

Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (Ag-NORs) are the chromosomal regions that contain a cluster of multiple copy ribosomal RNA genes (rDNAs), 18S; 5,8S and 28S (*major*), that form active nucleoli. The rDNA 5S region (*minor*), that contains another multiple copy ribosomal gene, that is not involved in the formation of nucleoli, is not silver-stainable. AgNORs are not rDNAs themselves, but a complex of acidic residual proteins associated with the nucleolar fibrillar center. They are used to investigate rDNA expression. The determination of the number and localization of rDNA/AgNOR loci, that are species-specific, is an important karyotypical marker specially in some organisms,



such as fish (Fujiwara *et al.* 1998), and in others vertebrates like in anurans, Lourenço *et al.* (1998) demonstrated that silver-staining was able to detect all the genomic NORs of these individuals in agreement with the data obtained by FISH.

In fish, FISH results are not consistent with those obtained with silver-impregnation. Almeida-Toledo *et al.* (1996) hybridized *Eigenmannia* renal cells with a rDNA probe and verified that the regions where hybridization occurred coincided with silver-stained NORs. Deiana *et al.* (2000) analyzed *Micropterus salmoides* lymphocytes and demonstrated that the ribosomal genes 45S and 5S were localized in two different chromosome pairs and that both were localized in GC- rich regions. In *Epinephelus marginator*, Sola *et al.* (2000) found that the rDNA 5S sites are CMA₃-negative and therefore do not present GC- rich sequences. Wozniński *et al.* (2000), using rDNA probes, demonstrated the parallel existence of NORs localization in geographically isolated populations of *Salmo trutta*.

In larvae of the "tsetse fly" (*Glossina*), Willhoeft (2000) observed that the rDNA probe hybridized with the long arm C-band of an autosome in all the species studied and that, in some lineages, hybridization with the Y chromosome occurred. In the fly, *Pantonella intermutans*, in both mitotic and meiotic cells, hybridization with a rDNA probe showed that NOR is localized in an autosomal pair where a large heterochromatin block is found (Parise-Maltempi and Avancini 2000).

In ants, Hirai *et al.* (1994) demonstrated that, in *Myrmecia pilosula*, rDNA 28S is repeated and localized in pericentromeric C-bands in the karyotypes of an ancestral eukaryote, it became involved in the saltatory increase of C-bands following centric fission. The excess copies of rDNA and the related C-bands were inactivated and eliminated from the genome (inversion or fusion) during the species evolution, however, rDNAs remain dispersed and tend to increase in the genome as chromosome number is increased by centric. Two years later, these authors were thus led to publish a study on rDNA dispersion in this genus and show that the number of chromosomes carrying 28S rDNA increases from 2, in species with low chromosome number, to 19 in species with high chromosome numbers (Hirai *et al.* 1996). In *Tapynoma nigerrimum*, Lorite *et al.* (1999), using FISH, found the presence of an AgNOR that was also CMA₃⁺, in the short arm of an autosome.

Mandriolli *et al.* (1999) studied the hybridization of rDNA 28S probes with the holocentric chromosomes of the aphid *Schizaphis graminum* and observed that, in each X chromosome, rDNA genes were found in one of the telomeres, that were the only CMA₃-positive regions while all the other heterochromatin bands were DAPI-positive. Similar behaviour was observed in *Acyrtosiphon pisum*. The telomere of its X chromosome, that was CMA₃⁺ and AgNOR⁺, was strongly fluorescent after hybridization with rDNA 28S sequences, thus demonstrating that this region was the nucleolar organizer region that contained actively transcribed rDNA genes (Bizzaro *et al.* 2000).



The holocentric nature of some chromosomes is a great barrier for cytogenetic studies. However, in the present work all the other species showed signs of hybridization with the rDNA 28S probe.

T. tibiamaculata and *T. protacta*, exhibited autosomes with stained spots. In *T. tibiamaculata*, such spots were telomeric and found in only one bivalent. These spots seem to coincide with the CMA_3^+ regions that were observed in an autosome at the same location in a study previously undertaken by our team (data not published). In *T. protacta* autosomes, no CMA_3^+ region was detected (data not published). It has been suggested that in holocentric chromosomes the heterochromatic areas are dispersed along the chromosomal axis, in contrast to the high heterochromatin concentration that is found near the centromere in monocentric chromosomes (Mandriolli *et al.* 1999). This could partly explain why these areas are present in autosomal chromosomal regions but not in the sex chromosomes of these two species. Nonetheless, further studies are necessary.

In *T. platensis*, fluorescent spot was seen in one of the sex chromosomes, probably X chromosome. Considering that this same chromosome X, was impregnated by silver-ions (data not published); digested by endonuclease restriction treatment with *Hae*III – whose restriction site is a sequence of GGXCC bases (data not published), and was CMA_3^+ , that is a fluorochrome specific to CG bases (Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2000a), these findings support the



hypothesis that, in triatomines, the sex chromosomes bear Nucleolar Organizing Regions (NORs).

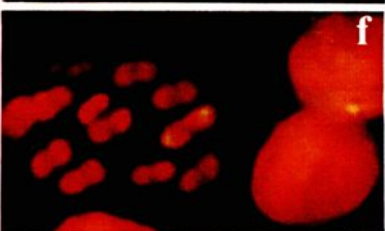
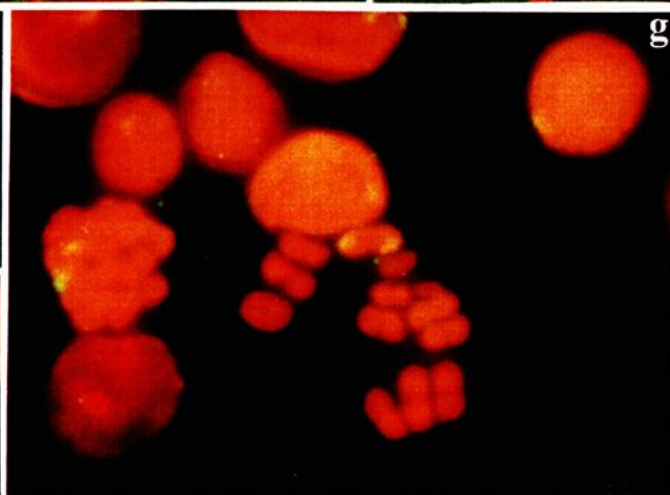
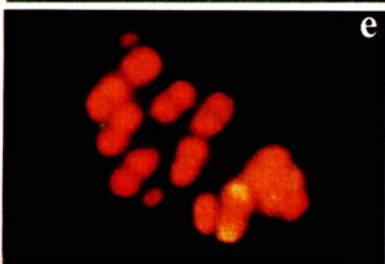
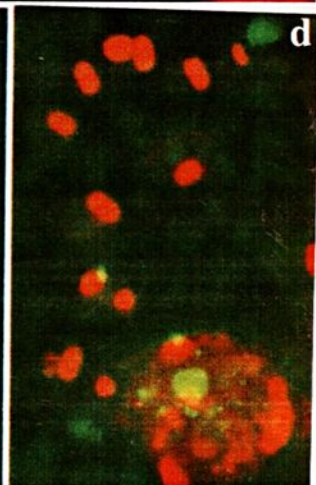
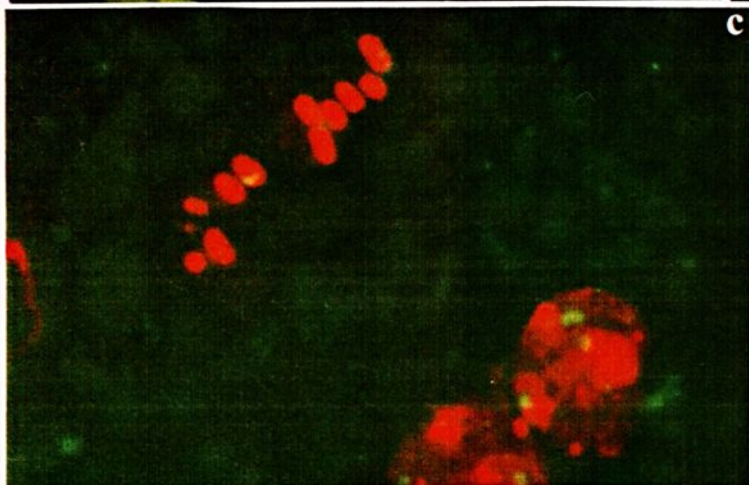
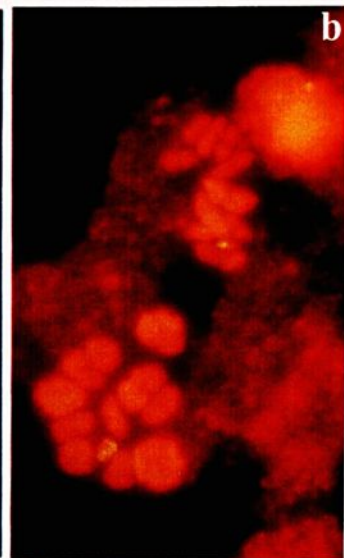
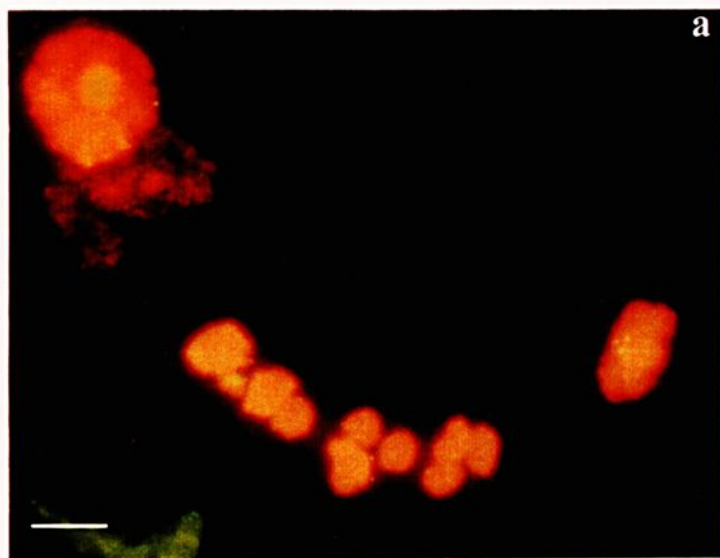
Information about the composition of chromatin in triatomines is very scarce. Therefore, the quantification and localization of NORs by FISH together with the results obtained by silver-impregnation and affinity for CMA₃ and DAPI, herein reported, contribute for a better understanding of chromosomal structure, including the intra and inter-specific relationships found in this group as well as the holokinetic nature of its chromosomes.

Acknowledgements

The authors are thankful to dr. José M. Soares Barata , João Luís Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, respectively, director and technicians of the Insectary of the Araraquara Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School (Araraquara, SP), for providing the specimens analyzed; to Profª. Klélia Aparecida de Carvalho and Profª. Dra. Shirlei Recco Pimentel for the teaching of the technique and kindly provided the probe used; and, Profas. Dras. Eliana Morielle Versute and Eloiza Helena Tajara for the loan of the material used. Special thanks to FAPESP (98/12876-6) and CAPES for their financial support.



Fig.1 Meiotic metaphases and nuclei submitted to FISH with rDNA probe. (a-b) Metaphases of the first meiotic division (MI) in *Triatoma platensis* that showed fluorescent spot in X chromosome; (c-d) MI in *Triatoma protacta* showing a sign of hybridization at the border of one of the autosomes; and (e-g) MI in *Triatoma tibiamaculata* showing hybridization at the poles of one of the bivalents. Notice the presence of fluorescent spots in interphase nuclei. Bar=16 μ m.



References

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., STOCKER, A. J., FORESTI, F., TOLEDO-FILHO, S. A., 2000 Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Res.* **4**: 301-305.
- BIZZARO, M., MANDRIOLI, M., ZANOTTI, M., MANICARDI, G. C., 2000 Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera). *Genetica* **108**: 197-202.
- DAGNE, K., CHENG, B., HENEEN, W. K., 2000 Number and sites of rDNA loci of *Guizotia abyssinica* (L. f.) Cass. as determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas* **132**: 63-65.
- DEIANA, A. M., CAU, A., SALVADORI, S., COLUCCIA, E., CANNAS, R., MILIA, ATAGLIAVINI, J., 2000 Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmonides* (Perciformes, Centarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Res.* **8**: 213-218.
- FUJIWARA, A., SYUITI, A., YAMAHA, E., YAMAZAKI, F., YOSHIDA, M. C., 1998 Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res.* **6**: 463-471.



- HIRAI, H., YAMAMOTO, M. T., OGURA, K., SATTA, Y., YAMADA, M., TAYLOR, R. W., IMAI, H.T., 1994 Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma* **103**: 171-178.
- HIRAI, H., YAMAMOTO, M. T., TAYLOR, R. W., IMAI, H. T., 1996 Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* **105**: 190-196.
- LORITE, P., GARCIA, J. A., CARRILLO, J. A., PALOMEQUE, T., 1999 Restriction endonuclease chromosome banding in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Hereditas* **131**: 197-201.
- LOURENÇO, L. B., RECCO-PIMENTEL, S. M., CARDOSO, A. J., 1998 Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res* **6**: 621-628..
- MANDRIOLI, M., GANASSI, S., BIZZARO, D. MANICARDI, G. C., 1999 Cytogenetic analysis of the holocentric chromosomes of the aphid *Schizaphis graminum*. *Hereditas* **131**: 185-190.
- PARISE-MALTEMPI, P. P., AVANCINI, R. M. P., 2000 Cytogenetics of the neotropical flesh fly *Pattonella intermutans* (Diptera, Sarcophagidae). *Genetics and Molecular Biology* **23**: 563-567.
- SOLA, L., DE INNOCENTIIS, S., GORNUNG, E., PAPALIA, S., ROSSI, A. S., MARINO, G., DE MARCO, P., CATAUDELLA, S., 2000 Cytogenetic



- analysis of *Epinephelus marginatus* (Pisces: Serranidae) with the chromosome localization of the 18S and 5S rRNA genes and of the (TTAGGG)_n telomeric sequence. *Marine Biology* **137**: 47-51.
- TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., 1999 Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia* **64**: 235-240.
- TAVARES, M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. , 1997 Cytogenetics study on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera:Reduviidae). *Cytobios* **89**: 51-61.
- VANZELA, A. L. L., CUADRADO, A., JOUVE, N., LUCEÑO, M., GUERRA, L., 1998 Multiple localizations of the rDNA sites in Holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chromosome Res.* **6**:345-349.
- VIÉGAS-PÉQUINOT, E., 1992 *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: *Hybridization: Practical Approach* (Willman, D. ed.). Oxford University Press. IRL Press. England.
- WILLHOEFT, U., 1997 Fluorescence *in situ* hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse flies (Diptera: Glossinidae: *Glossina*). *Chromosome Res.* **5**: 262-267.
- WOZNICHI, P., SANCHEZ, L., MARTINEZ, P., PARDO, B. G., JANKUN, M., 2000 A population analysis of the structure and variability of NOR in *Salmo trutta* by Ag, CMA₃ and ISH. *Genetica* **108**: 113-118.
- This paper will be submitted to Genetics.



MEIOSIS ASPECTS AND NUCLEOLAR ACTIVITY IN *Triatoma vitticeps*
(HETEROPTERA, TRIATOMINAE)

Severi-Aguiar, G.D.C.^(1*);

Azeredo-Oliveira, M.T.V.⁽¹⁾; Bicudo, H.E.M.C.⁽¹⁾; Lourenço, L.B.⁽²⁾.

(1) Grasiela Dias de Campos Severi Aguiar, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira and Hermione Elly Melara de Campos Bicudo. Department of Biology – Bioscience, Languages and Exact Sciences Institute, São José do Rio Preto, University of the State of São Paulo (IBILCE-UNESP). CEP. 15054-000, São José do Rio Preto, S.P., Brazil.

(2) Luciana Bolsoni Lourenço. Department of Cell Biology, Biology Institute, University Estadual of Campinas (UNICAMP). CEP 13084-971, Campinas, S.P., Brazil.

*Corresponding author: Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar

Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Caixa Postal 136, São José do Rio Preto, CEP 15054-000, São Paulo, Brasil. fax +55 17 2212380. e-mail: grasielaguilar@aol.com

Running Title: Meiosis and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps*



MEIOSIS ASPECTS AND NUCLEOLAR ACTIVITY IN *Triatoma vitticeps* (HETEROPTERA , TRIATOMINAE)

Summary

Some aspects of both the nucleolar organizer activity and meiosis were studied in the testes of *Triatoma vitticeps* (Heteroptera, Triatominae). The techniques used included crushing followed by lacto-acetic orcein staining, silver-ion impregnation, fluorescent banding (CMA₃, Quinacrine mustard and DAPI) and fluorescent *in situ* hybridization. It was observed that: a) occurs a close relationship between heterochromatin and nucleolus in testicular cells; b) during meiosis, the silver-ion impregnation pattern varied. At metaphase plate, the small body appeared apart from the chromosomes. In the spermatids this small dot was seen with both orcein and silver-ion impregnation but it didn't have affinity for the fluorochromes and was not detected by FISH. These characteristics combined suggest that these corpuscles represent a source of ribonucleoproteins (RNP) – RNA and specific nucleolar proteins; c) silver-ion impregnation and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) revealed nucleolar organizer activity in two metaphase sex chromosomes (X). These results indicate that, in this specie, nucleolar organizer regions (NORs) are located in the sex chromosomes; d) Xchromosomes were CMA₃⁺ and Y chromosome was DAPI⁺.

Key words: Nucleolar organizer activity, meiosis, fluorescent *in situ* hybridization, silver impregnation, ribonucleoproteins (RNP).

Introduction

The evolutive process is frequently accompanied by genomic structural rearrangements. The nature of these rearrangements is determined by chromosomal architecture and behavior. Some patterns that usually occur in some groups are rare or never occur in others (Frias & Atria, 1998). The mechanism of lacto-orcein staining comprises, in a simple way, the binding of the molecules of the amino group of the total proteins (histones and nonhistones complexed to chromatin DNA) to orcein molecules (acid) by the process of acidophillia. The substrates positively charged (cationic) by the amino groups of residual proteins bind to the stain that is negatively charged (anionic) (Vidal & Mello, 1987). This cytochemical technique adds to make an unrefined differentiation between euchromatin and heterochromatin, by staining more strongly the first than the latter due to the fact that heterochromatin shows greater compactation and more proteins than euchromatin (Azeredo-Oliveira, 1990).

It allows the analysis of the meiotic behavior of chromosomes as to the type of kinetocoric organization, presence of cystic meiosis and polyploidy, pyknotic behavior of chromosomes and heterochromosomes, types of pre and post-reductional meiosis and origin of chromosomal derivation (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999).

Over the last decades, the use of banding techniques has allowed the identification of chromosomal pairs karyotype rearrangements. However, their application in the study of Heteroptera holocentric chromosomes



is limited even though chromosomal banding has been widely used in the investigation of monocentric chromosomes. Despite the considerable number of studies that have been undertaken in order to cytologically characterize different Heteroptera families, little is known about their chromosomes, specially the distribution of constitutive heterochromatin and nucleolar organizer regions (NORs).

Silver-ion impregnation has been known for almost a century. It has been used to display the nucleolar regions named fibrillar centers (FC) and the nucleolar organizer regions in the chromosomes that bear the genes that code for ribosomal RNA, synthesized and processed into pre-ribosomes in the nucleolus, that will later form the cytoplasmic ribosomes that are essential to protein synthesis. Under acid conditions, the proteins stained by this technique are able to reduce silver. At interphase, they are located in the nucleolus and, during cell division, they are specifically located in the NORs (Goodpasture and Bloom, 1975).

Chromosomes of most insects lack euchromatic bands, such as band G, they may be identified by using DNA-specific fluorochromes to reveal their heterochromatic bands. Quinacrine mustard, that produces the so called Q bands, is not specific for heterochromatin. It intercalates with DNA and preferably binds to AT-rich DNA regions (Sumner, 1990).

The DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) technique was first used by Schweizer and Nagl (1976), and also shows high AT-



specificity. Its mechanism, though not clearly understood, is likely to be similar to that of Hoechst 33258.

Chromomycin A₃, another fluorochrome, complements the other banding techniques. It is specific for GC-rich regions, has an effect similar to that of the R-band on the euchromatic parts of the chromosome, and is very useful to characterize heterochromatin. Distamycin A, combined with these fluorochromes, enhances banding fluorescence, due to the competitive exclusion that occurs between these substances, and allows the heterochromatic regions to be better identified (Sumner, 1990).

A great advance in cytogenetics occurred in the 60's when Gall and Pardue (1969) and John *et al.* (1969) obtained the first signs of *in situ* hybridization in chromosomes. By using radiolabeled ribosomal RNA probes, these investigators demonstrated the presence of nucleolar organizer regions (NORs) in some chromosomal sites. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), by favoring the detection of NORs, is a very promising technique to be used in the identification of insect chromosomes, comparison of the karyotypes of related species in taxonomic as well as evolutive studies, and the clarification of the non-chiasmatic associations of sex chromosomes (Petitpierre, 1996).

The aim of this paper was to obtain data about phases of spermatogenesis and nucleolar activity during meiosis until spermiogenesis of *Triatoma vitticeps*. A close relationship between heterochromatin and nucleolus, nucleolar organizing region on the sex chromosomes, and the cytochemical nature



of material originated from nucleolar fragmentation (corpuscles) were studied. Information concerning the cytochemical structure of nucleolar cycle in the meiotic cells is important to understanding the rRNA role in the initial spermatids.

Material and Methods

The species utilized in this study was *Triatoma vitticeps* (Triatoma, Heteroptera), provided by the Insectary of the Special Health Service (SESA), Araraquara (SP), organ of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School, São Paulo (SP), Brazil.

The testicular seminiferous tubule cells of these insects were fixed in glacial acetic acid and, subsequently, submitted to lacto-acetic orcein-staining (De Vaio *et al.*, 1985) and silver-ion impregnation (Howell and Black, 1980; modified by Bicudo, 1992). Some slides were submitted to fluorescent banding with chromomycin A₃ (CMA₃), DAPI - that were counterstained with distamycin A (DA) - and with quinacrine mustard (Schmid, 1980). Part of the material was used for fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as described by Viégas-Piquignot (1992). For hybridization, a fluorescent direct-labeled probe specific for the rDNA region (*Drosophila*) was used (pDm238, 15ng/μl). The analyses were performed under a fluorescence microscope Olympus Bx60. Double (BP450-480) and triple (BP510-550) filter were used. For documentation, ULTRA 400 ASA (Kodak) films were used.



Results

Lacto-acetic orcein staining

The results of the present work, obtained by crushing the testes of stage-5 male and young adult *Triatoma vitticeps* and, subsequent, lacto-acetic orcein staining, show that the polyploid nuclei of the follicular wall nutritive cells present either a single, large, central, heterochromatic body with a lighter halo (nucleolus) (Figure 1a), or a larger, heterochromatic body encircled by a light halo with one, two, three or four heterochromatic bodies on it (Figure 1b).

The spermatogonial interphase nuclei show the sex chromosomes forming a compact body (heterochromatic) roughly round and irregularly shaped. In some of these nuclei, even individualization of the block components can be observed (Figure 1c).

In males, the diploid chromosomal complement is 24. Spermatogonial metaphase consists of 20 autosomes and X_1 , X_2 , X_3 and Y (four heterochromatic sex chromosomes). Spermatogonial anaphases showed late migration of sex chromosomes (Figure 1e).

Nuclei at the confused stage with heteropyknotic corpuscle formed by sex chromosomes (Figure 1 f-g).

At meiotic metaphase I, the ten pairs of chromosomes (tetrads or bivalents) and the four sex chromosomes are arranged in a variable ways, that is, the sex chromosomes are localized at the periphery or, sometimes, in the center (Figure 1 h-i). At metaphase II, the 10 autosomes encircle the four sex

chromosomes (Y, the largest; X₁, X₂, X₃, the smallest). Y is above and X₁, X₂, X₃ are below the plane of the equatorial plate in a way that, viewed from above, they are usually more or less overlapping (Figure 1j-k).

The anaphase and the beginning of the telophase of the second division show two chromosomes that migrate late (delayed chromosomes) (Figure 1l-m). The spermatids with a heteropyknotic little dot were detected (Figure 3a – arrows).

Silver-ion Impregnation

The polyploid nuclei presented several silver-impregnated areas of different sizes (Figure 2a).

The seminiferous tubule wall nuclei as well as spermatogonial nuclei showed only one stained region (Figure 2b).

Spermatogonial small nuclei, with a single, central or peripheral, highlighted dot were commonly found. Spermatogonial metaphases sometimes showed a clearly highlighted region in a larger chromosomal block whereas, sometimes, only some small dots are evidenced in the chromosomes. In this latter case, these highlights seem to be on X chromosomes while in the first case they appear to be on Y chromosome (Figure 2 c).

In primary spermatocytes, at the beginning of meiotic prophase I, at the diffuse stage and at diplotene, the compact body of the sex chromosomes (X₁, X₂, X₃ and Y) is also strongly stained (Figure 2d).



At diakinesis, the heteropyknotic block of sex chromosomes is also clearly marked with silver-ions, differentiated from the remainder (Figure 2e-f).

At metaphase I, the chromosomes do not present distinct stainings. However, in all the slides observed, from a lateral and a front view, they showed a small, very evident dense body of a size similar to that of a chromosome, next to, though dislocated from the equatorial plane (Figure 2g-h).

At metaphases of the second division, the sex chromosomes are center-positioned and the Y chromosome is brighter than the three X chromosomes, though they are also marked. This situation is sometimes clearly observed under a microscope with the aid of a micrometer but it cannot be demonstrated by photomicrography. The small, spherical corpuscle that positively responded to silver nitrate impregnation also appears at metaphases II, farther dislocated from the equatorial plane (Figure 2i-j). In the initial spermatids a small dot impregnated by silver-ions is observed in the Figure 3b-d (arrows).

Fluorescent banding

When submitted to CMA_3 , the polyploid testicular tubule wall nuclei presented dispersed chromatin with no regions of great affinity for the fluorochrome (Figure 4a). The spermatogonial nuclei showed a chromocenter (Figure 4b). The spermatogonial metaphase chromosomes did not present CMA_3^+ bands (Figure 4c). The nuclei at the confused stage presented a chromocenter and



several fluorochrome-labeled regions (Figure 4d). Both at MI and at MII, three sex chromosomes were CMA₃⁺ labeled (X₁, X₂, X₃) (Figure 4e-g).

Quinacrine mustard-banding revealed that the polyploid testicular tubule wall nuclei presented a block of great affinity for the fluorochrome (Figure 4h). The spermatogonial interphase nuclei and those undergoing division showed a chromocenter (Figure 4i-j). At MI and MII, faint positive regions were seen (Figure 4k-l).

DAPI- banding showed polyploid testicular tubule wall nuclei had a block of great affinity for the fluorochrome (Figure 4m). The spermatogonial nuclei displayed no chromocenter (Figure 4n). The spermatogonial metaphase chromosomes showed no bands (Figure 4o). The nuclei at the confused stage presented a region of affinity for the fluorochrome (Figure 4p). Both at MI (Figure 4q) and at MII (Figure 4r-s), one of the sex chromosomes was DAPI⁺ (Y) (arrows).

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

The testicular cells of *T. vitticeps* adult young males were submitted to hybridization with a rDNA 28S-probe de *Drosophila melanogaster* (pDm238). The nuclei of spermatogonial cells show strongly marked corpuscles that can be either single or partite (Figure 5 a). Spermatogonial prometaphases and metaphases show chromosomes with quite evident bright regions (Figure 5b-c). Interphase meiotic nuclei present a single and large corpuscle (Figure 5d) that



dissociates into smaller dots as the confused stage advances and a consequent chromatin compaction (Figure 5e) until meiotic division I, when two X chromosomes display sites of strong hybridization with the probe (Figure 5f-h).

Discussion

In the present work, meiosis in the species *Triatoma vitticeps* was studied by using classical cytogenetic (lacto-acetic orcein and silver nitrate) as well as molecular techniques (fluorescent banding and fluorescent *in situ* hybridization) with the main purpose of obtaining information about nucleolar localization and its activity, and nucleolar organizer regions (NORs). Besides information about nucleolar activity, our results also support and expand previous findings on the spermatogenesis of these insects (Barth, 1956b).

A general analysis of the results allowed us to detected some aspects to be discussed. The first of them refers to heteropyknotic chromosomes and their relationship with nucleolar organizer regions (NORs).

In the species under study, the polyploid nuclei of the seminiferous tubule wall nutritive cells, the nuclei interphase and at early prophase of both the spermatogonia and spermatocytes, show that there is a close relationship between the lacto-acetic orcein-stained heteropyknotic corpuscles and the presence of silver-impregnated nucleolar corpuscles. This association has already been observed in the Malpighian tubules and salivary glands of this species (Azeredo-Oliveira, 1990).



Therefore, our results confirm that this close relationship between heterochromatin and nucleolus also occurs in testicular cells.

At meiotic prophase I, an association between the heterochromatic block of sex chromosomes and silver-ion impregnation can be clearly seen.

The presence of silver ions in the heterochromatic block is quite evident at meiotic prophase I, specifically at the diffuse stage, at diplotene and diakinesis. These positive silver stainings were confirmed by the testis suspension technique and, later Giemsa and silver nitrate staining [data not shown].

In *T. vitticeps*, the number and position of the nucleolar corpuscles in the testes of stage-5 nymphs were analyzed in different types of nuclei [data not shown]. The silver highlights in the heterochromatic block formed by the sex chromosomes X_1 , X_2 , X_3 and Y predominate and, in nearly 100% of the cases, there was only one highlighted region.

The stained regions displayed at both the mitotic and meiotic metaphases of *T.vitticeps* are present in the sex chromosomes (X_1 , X_2 , X_3 and Y) that are also heterochromatic.

Solari (1979), studying the behavior of meiotic chromosomes in *Triatoma infestans*, reported a defined segregation pattern at meiotic metaphase I. While autosomes are chiasmatic and segregate regularly, both X and Y chromosomes are achiasmatic and equationally divide, with segregational division occurring at second division. This is also demonstrated in *T. vitticeps*. During

second division anaphase, the sex chromosomes do not divide but separate: Y translocates with 10 autosomes from one of the daughter plates to a centrioles and X_1 , X_2 , X_3 translocate with other ten autosomes from the second daughter plate to the other centriole, thus forming a spermatid with ten autosomes and the Y chromosome, and another with ten autosomes and X_1 , X_2 , X_3 chromosomes.

Silver ions impregnated the heterochromatic regions of the nuclei observed (nutritive cells and male germinative cell lines). The nuclei at "diffuse stage" show several highlighted chromosomal regions and, at the end of diakinesis, a strongly impregnated chromosomal block.

Another aspect to be discussed about the results obtained in the study of *T. vitticeps* meiosis is the presence and behaviour of an extra corpuscle. During meiosis, several positive silver stainings were seen in the species studied. Interphase cells show a large body clearly highlighted by silver ions and a similar structure is too orcein stainable. At diplotene, two or three stained bodies, two of them situated on the chromosomes, are visible. At diakinesis (Prophase I final), only one corpuscle remains strongly stained and situated among the chromosomes. As the chromosomes are organized in the equatorial plate, this stained corpuscle appears dislocated in relation to the chromosomes.

This same strongly silver-impregnated corpuscle is mostly found in metaphase I plates and, sometimes, at anaphase, where it appears doubled. We believe it is the same corpuscle that was observed by Barth (1956a) at several meiotic stages in *T. infestans* at slides stained with hematoxylin and that was best



evidence at anaphase II. Barth suggested that this occurred because the corpuscle had a greater affinity for the dye during this stage and considered its function completely obscure.

Though not completely satisfactory, some initial hypothesis can be put forth about the nature of this corpuscle. It may be: 1-) nucleoli remainders, or; 2-) micronucleoli, or; 3-) pre-nucleolar bodies taking form, or; 4-) micronuclei, or; 5-) chromosomal elements at an elimination stage, or; 6-) one or more chromosomes or, chromosomal segments, supernumerary or not, that bear NOR (Azeredo-Oliveira, 1990).

The hypotheses related with remainders of nucleoli, micronucleoli or pre-nucleolar bodies are based, initially, on the clear silver nitrate stainings that are obtained (Azeredo-Oliveira, 1990).

Silver-ions are known to bind to a special group of acidic proteins (C23 and B23) found in the nucleolus. Thus, a relationship between the stained corpuscle and the nucleolus may be established. The nucleolus is known to have a disaggregation and reorganization cycle, it breaks during late prophase and is reorganized at early telophase. However, several examples in different species of animals and plants demonstrate that specially fibrillar, but sometimes granular material, may persist throughout the cellular cycle, including metaphase and anaphase. These evidences support the possibility that nucleolar material is not completely synthesized in the chromosomal region of the nucleolar organizer



but a pre-existing material is also necessary and used (Ashraf and Godward, 1988).

The persistence of bodies such as nucleoli during mitosis (cultured cells) supports the idea that nucleolar material does not completely break during metaphase and anaphase and has a functional significance that is still unclear. It may be hypothesized that these bodies carry first or new nucleolar material or represent a source of nucleolar RNA for the daughter cells while the new nucleolus is being organized (Mello, 1995).

The results observed in the present paper, only by silver-ions impregnation, are in accordance with nucleolar persistence during the mitotic cycle because nucleolar corpuscles or fragments can be observed at several stages during meiotic cell division. These corpuscles or fragments may be nucleolar remainders that remain in the cell throughout the cycle. The same aspects was verified in others triatomines of three genus: *Triatoma* (Tavares and Azeredo-Oliveira, 1997; Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, data not published), *Panstrongylus* (Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999) and *Rhodnius* (Morielle, 2000).

Nevertheless, our study about the spermatogenesis of *T. vitticeps*, give evidence that fluorescent banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), not detected the persistence of corpuscles during meiotics cells divisions or spermatids. The same corpuscles, than, are stained by both, orcein and silver-ions, but not are detected by fluorochromes and by FISH.



Such behaviour and staining features combined, therefore, denote strongly that these corpuscles are not chromosomal elements or heterochromatic chromosomal segment carrying a Nucleolar Organizing Region. These suggestions were considered in initial studies about spermatogenesis of four species of genus *Triatoma* (Azeredo-Oliveira, 1990).

Was inferred too, that the nucleolus may not completely disappear during spermatogenesis in triatomines, remaining in the form of small pre-nucleolar corpuscles that are reunited to form the next nucleolar cycle, that, in the case of meiosis, is completed providing fecundation and the formation of a zygote occurs (Severi-Aguiar and Azeredo-Oliveira, 2001).

In this moment, to accord with these new aspects about cytochemical nature corpuscles, detected during meiosis of *T. vitticeps* until spermatid nuclei, we suggest that these bodies represent a source of RNA associated to specific proteins, that is, ribonucleoproteins (RNPs) corpuscles. This source of RNPs is very important to initial spermiogenesis phases, when occur a successive series of events in which the haploid cells undergo nuclear transformation and condensation of the chromatin and develop special structures such as acrosome, on the anterior head of the nucleus, and a flagellum attached on its posterior surface (Parvinen *et al.*, 1986). During this differentiation pattern, the cell, momentarily, resume protein synthesis (Mirre and Knibiehler, 1985). Our findings indicate that RNPs supplies are necessary to spermatid protein synthesis. In that case, the small dots, seen in the spermatids triatomines by both, orcein



and silver-ions impregnation, showed the evident presence these corpuscles of ribonucleoproteins (RNPs).

During the spermatogenesis in mammals and other vertebrates have direct evidence about the cellular synthesis of RNA and, simultaneously, a characteristic cytoplasmic organelle, the "chromatoid body", obtains its typical lobulate shape. Radioactivity derived from [^3H] uridine and high-resolution immunohistochemical studies have indicated the presence of actin and RNA in the "chromatoid body". The "chromatoid body" has several functions during spermiogenesis, for example, it may be involved in the formation of the acrosomic system. The most interesting of the proposed functions of this "chromatoid body" is its participation in the RNA metabolism of the spermatogenic cells. There is evidence that a considerable proportion of the RNA synthesized in pachytene spermatocytes is preserved through spermatid development until late spermiogenesis. The "chromatoid body" may be a storing organelle for this long-lived mRNA which may direct the protein synthesis during late spermiogenesis when the genome of the spermatid is inactive. It is also possible that presynthesized proteins are stored in the chromatoid body, to be assembled in spermatid structures at appropriated times (Revision in Parvinen *et al.*, 1986).

Therefore, considering the finding of variation during meiosis of the pattern of silver-ions impregnation – from a single large mass in interphase, to two or three smaller masses in diplotene (two of them were always over chromosomes) and, finally, to a single strongly stained little body located between



chromosomes in diakinesis or far from the chromosomes, when the metaphase plate is formed. Considering further, the cytochemical nature detected by different technicians in present paper, we propose that the little bodies – or corpuscles – visible from diakinesis until spermatids, during spermatogenesis, is similar to “chromatoid body”, observed in vertebrates, and has the same important function in the RNA metabolism.

Thus, the present results reinforce the evolutionary conservation, involving mechanism for preserving the necessary levels of protein synthesis in different stages of cell differentiation, in both groups, vertebrates and invertebrates.

Another significant finding refers to active NORs in the sex chromosomes. After staining by fluorochromes we observed that in *T. vitticeps*, there were three CMA_3^+ sex chromosomes and, after treatment with AT-specific fluorochromes, there was only one. It is very interesting that *T. vitticeps* that have multiple sex chromosomes ($\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{Y}$), showed CMA_3^+ in all X chromosomes. Such an affinity for the same fluorochrome (CMA_3), specific for GC regions, thus corroborates the hypothesis that, in triatomines, the origin of multiple sex chromosomes lies on the fragmentation or dissociation of a single pre-existing X chromosome (Ueshima, 1979; Azeredo-Oliveira, 1990; Tartarotti and Azeredo-Oliveira, 1999). As for the Y chromosome, the DAPI positive label obtained in this study confirms its repeated AT-rich heterochromatic nature.

Our results, obtained by fluorescent *in situ* hybridization, are very similar to those obtained with silver-ion impregnation.

The data reported in the literature about the utilization of this method in insects, specially in Heteroptera are very scarce. However, Mac Gregor (1993) compared silver staining with fluorescent *in situ* hybridization and demonstrated that not all potentially active NORs are stained with silver. This is due to the fact that only those NORs active at the beginning of interphase show this affinity, suggesting that the number of silver-stained NORs is smaller than that evidenced after the use of the hybridization technique. The DNAs used as probes may probably identify chromosomal markers for evolutive studies, measure the level of correspondence between the results yielded by silver staining and FISH and, also, allow the measuring of gene activity in NOR sites and thus contribute for the understanding of the evolutive process of these organisms.

In the specific case of *Triatoma vitticeps*, herein studied, the results obtained with silver impregnation, fluorescent banding and fluorescent *in situ* hybridization, support the hypothesis that, in triatomines, the sex chromosomes bear nucleolar organizer regions (NORs).

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr. José Soares Barata, director, and João Luis Molina Gil and João Maurício R. da Silva Filho, technicians of the Insectary of the Araraquara Specil Health Service (SESA) (Araraquara, SP) organ



of the Department of Epidemiology, São Paulo Public Health School for providing the specimens studied; to Profa. Dra. Shirley Recco Pimentel and to Profa. Klélia Aparecida de Carvalho for making possible the application of fluorescent *in situ* hybridization in the Department of Cell Biology, Institute of Biology, UNICAMP. Special thanks to FAPESP (98/12876-6), FUNDUNESP and CAPES for their financial support.



Fig.1. *Triatoma vitticeps* seminiferous tubules submitted to lacto-acetic orcein.

(a) Polyploid nucleus showing an heteropyknotic corpuscle encircled by a halo, or; (b) smaller corpuscles on a larger light halo; (c) spermatogonial nuclei with heteropyknotic corpuscles; (d) interphase (I), prophase (P) and metaphase spermatogonial (M) ; (e) spermatogonial anaphases showing late migration of sex chromosomes; (f-g) nuclei at the confused stage with heteropyknotic corpuscle formed by sex chromosomes (arrows) that begin to individualize at diakinesis (DI); (h-i) metaphases I (MI) with 10 autosomal pairs and 4 sex chromosomes (X_1 , X_2 , X_3 and Y); (j-k) metaphases II (M2) with sex chromosomes positioned in the center of the ring formed by the 10 autosomes. The Y chromosome is larger (bigger arrow) and the three X chromosomes are smaller (smaller arrow); (l-m) anaphase II and beginning of telophase II showing late migration of sex chromosomes. Bar=18 μ m.

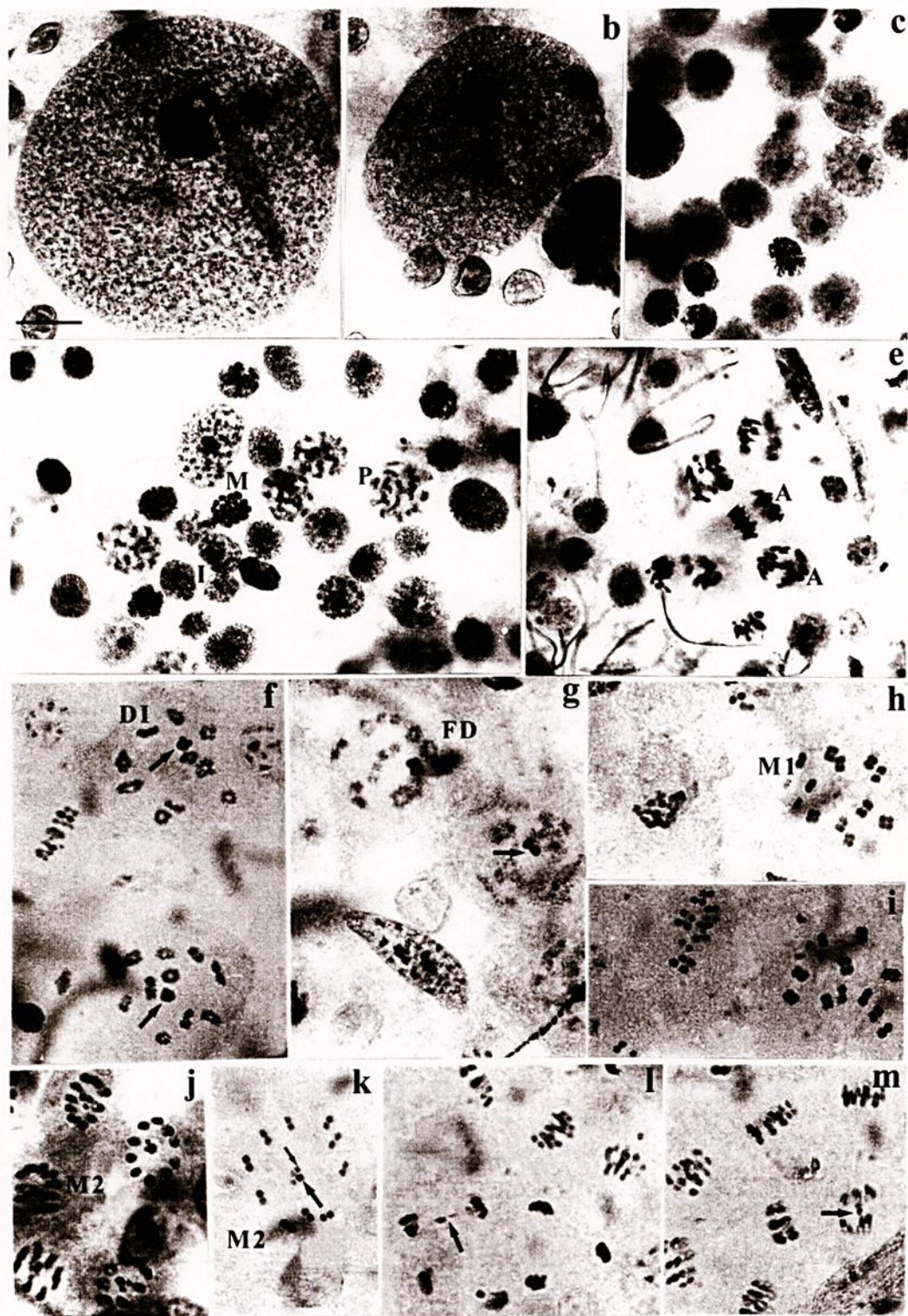


Fig.2. *Triatoma vitticeps* testicular tubules submitted to silver-ion impregnation. (a) spermatogonial nucleus showing several corpuscles (arrows); (b) tubular wall nuclei (NT) and spermatogonial nuclei (NE) with only one stained region; (c) spermatogonial metaphases; (d) nuclei at confused stage with a strongly labeled block (arrows); (e-f) nuclei at diakinesis showing heterochromatic block of sex chromosomes impregnated by silver-ions (arrows); (g-h) metaphases I with chromosomes showing no specific highlights but with a quite evident corpuscle (arrows); (i-j) metaphases II with highlighted sex chromosomes (smaller arrows) and silver-impregnated corpuscle (bigger arrows). Bar=18 μ m. (The increase used in Figure 2b was 264X).

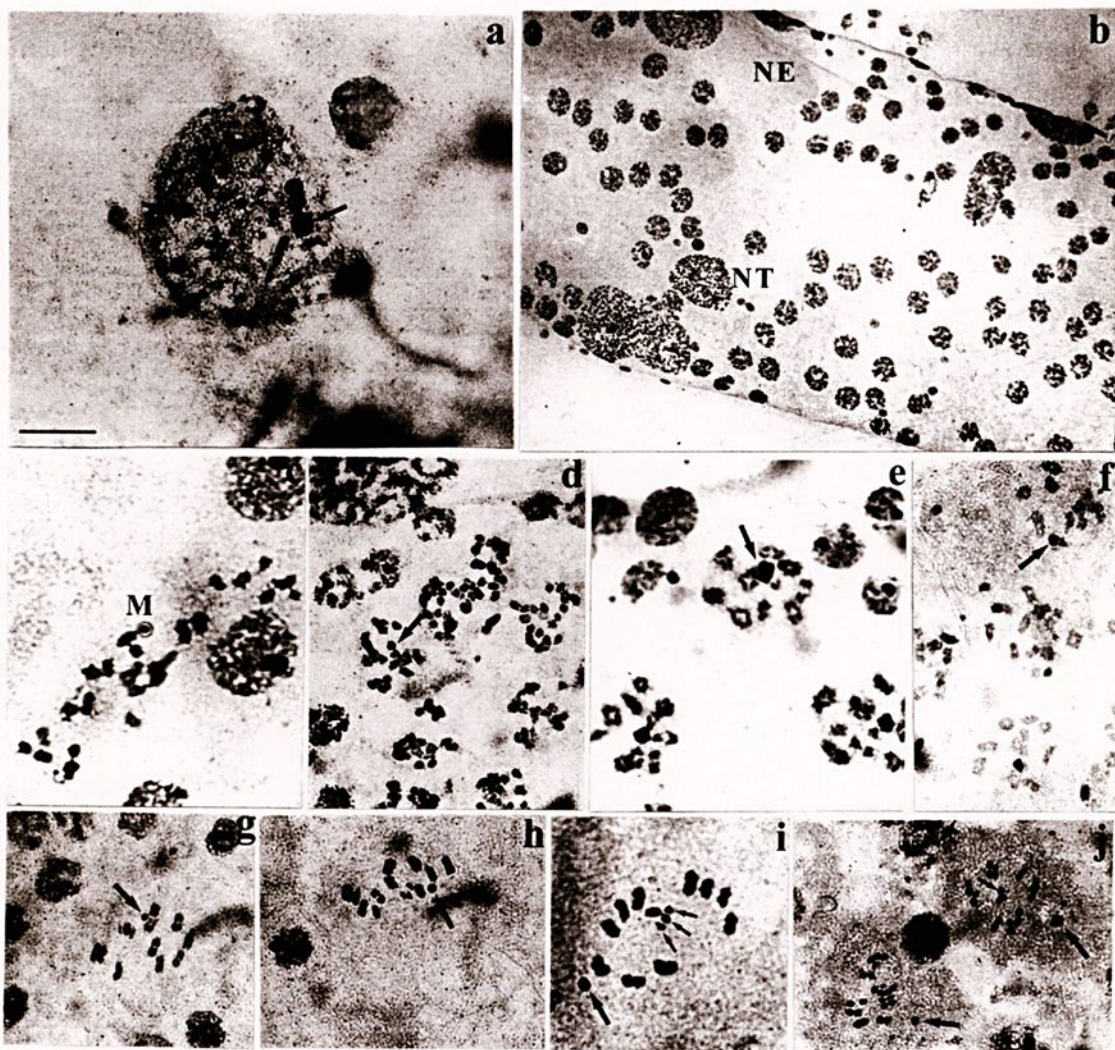


Fig. 3. Initial spermatids of *T. vitticeps* submitted to (a) lacto-acetic orcein staining and (b-d) silver-ions impregnation. Notice the presence of a heteropicnotic corpuscle (arrows). Bar=18 μ m



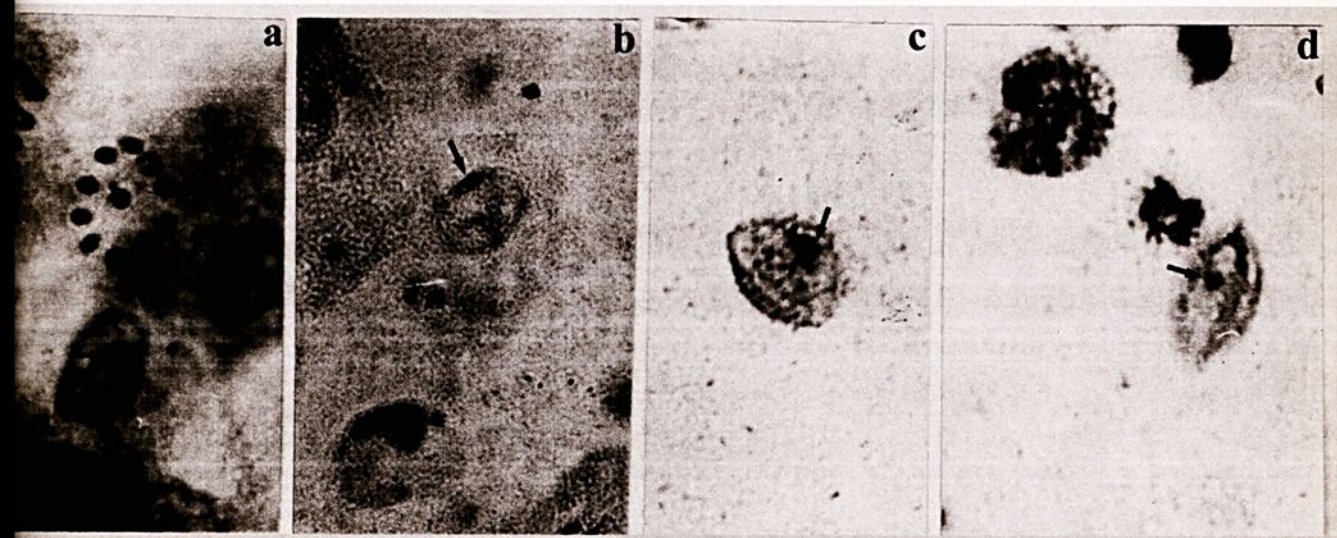


Fig. 4. *T. vitticeps* testicular tubules submitted to chromomycin A₃ (CMA₃) (a-g), quinacrine mustard (h-l) and DAPI (m-s). (a) Polyploid nucleus with disperse chromatin; (b) spermatogonial nuclei; (c) spermatogonial metaphases; (d) nuclei at confused stage showing chromocenter and diplotene showing CMA₃⁺ sex chromosomes; (e-f) metaphases at first meiotic division; (g) metaphases at second meiotic division; (h) polyploid nucleus with heterochromatin corpuscle; (i-j) dividing interphase spermatogonial nuclei; (k) MI; (l) MII with pale positively labeled regions; (m) polyploid nucleus with a large heterochromatic corpuscle and interphase spermatogonial nuclei; (n) prophase spermatogonial nucleus; (o) spermatogonial metaphase; (p) nucleus at confused stage with a chromocenter; (q) MI showing one of the chromosomes is DAPI⁺ (Y); (r-s) MII showing one of the chromosomes is DAPI⁺ (Y) (arrows). Bar=10µm.

MI- metaphase of the first meiotic division; MII- metaphase of the second meiotic division

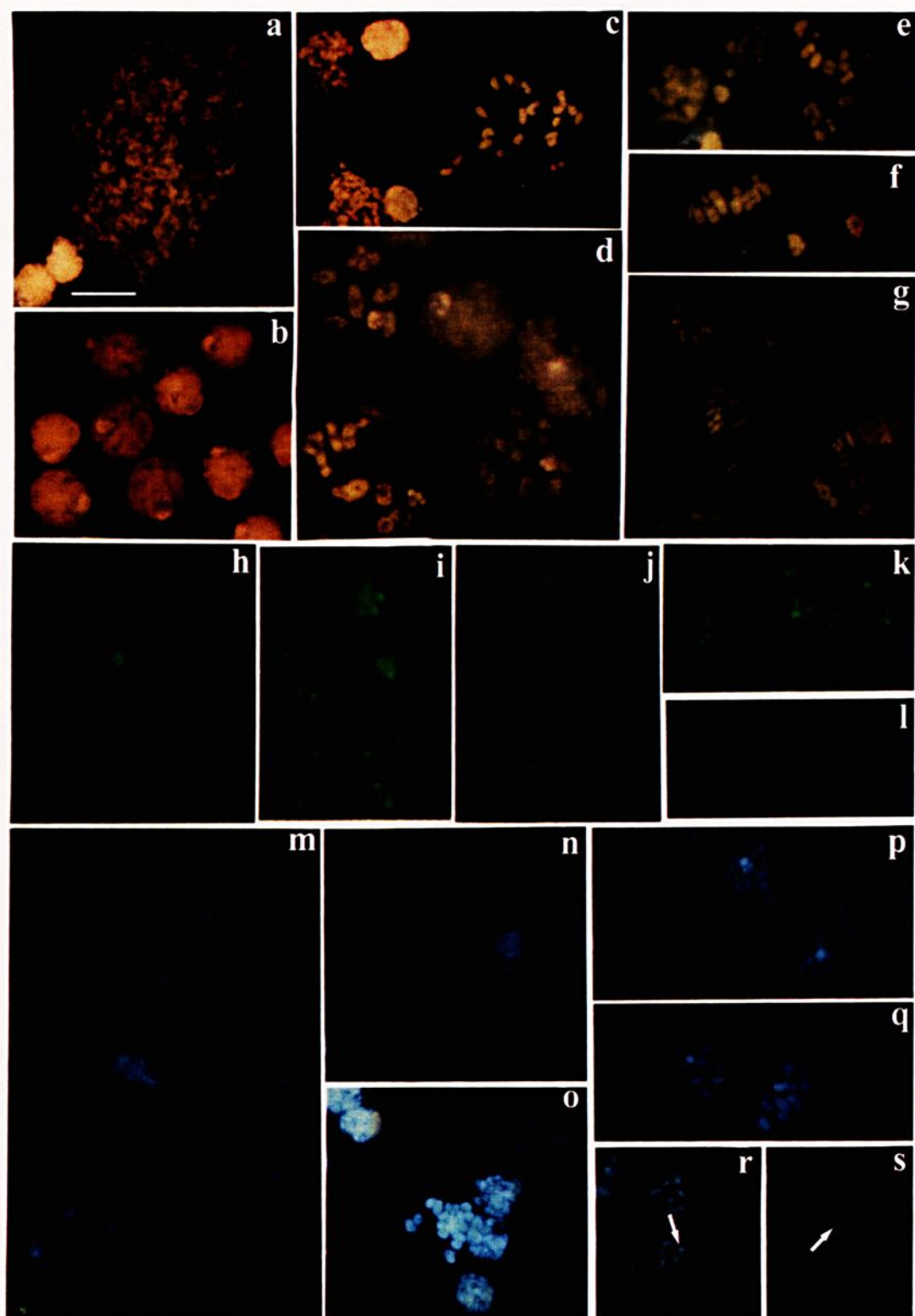
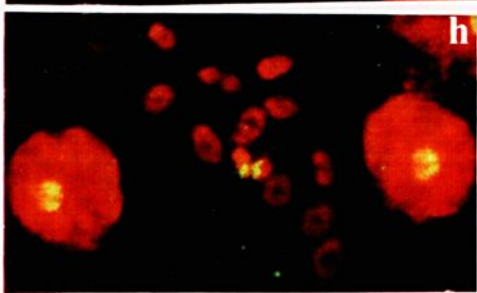
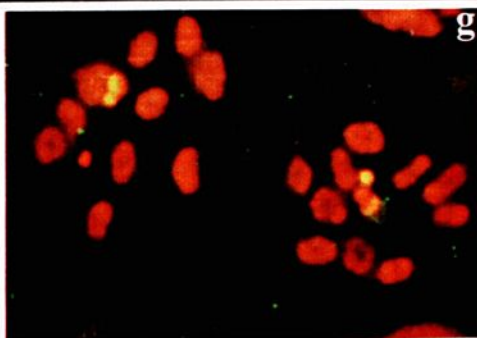
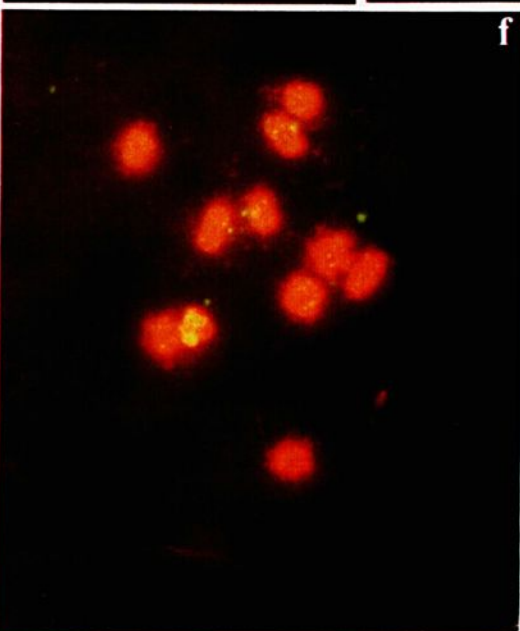
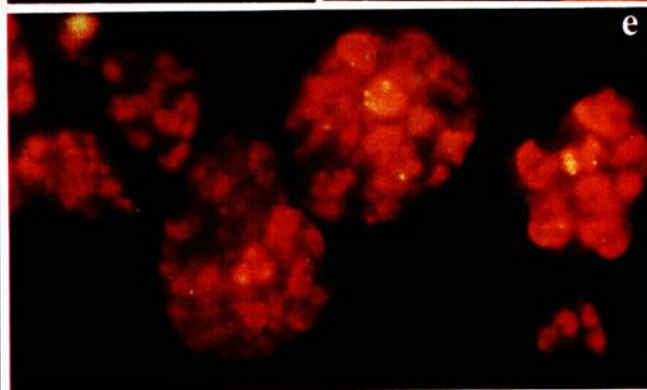
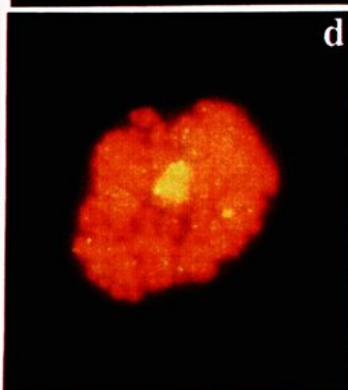
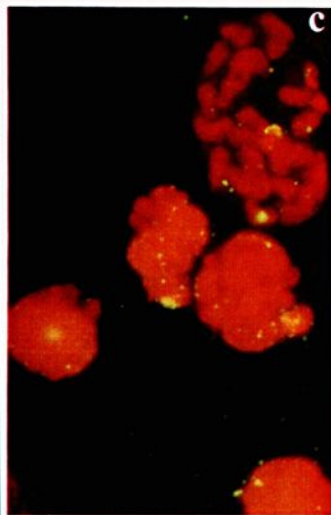
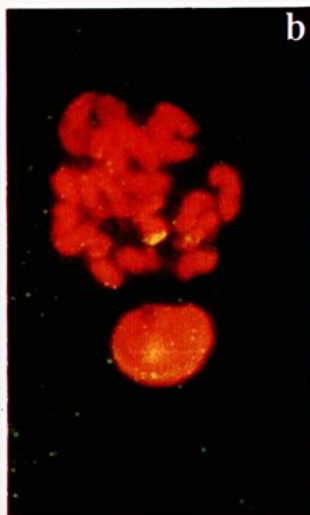
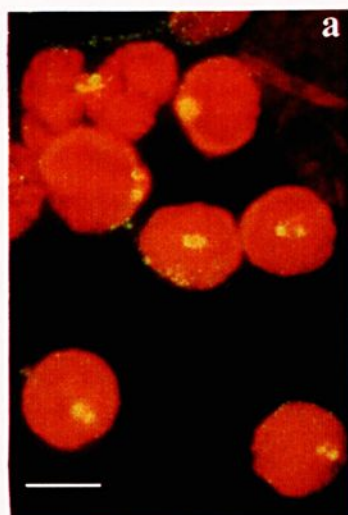


Fig. 5. *Triatoma vitticeps* testicular tubules submitted to fluorescent *in situ* hybridization with *Drosophyla* rDNA probe (pDm238). (a) nuclei of spermatogonial cells with single or bipartite corpuscles; (b-c) spermatogonial prometaphases and metaphases with evident stainings; (d-e) interphase meiotic nuclei showing a single corpuscle that dissociates into smaller ones; (f-h) metaphases I with hybridization sites in two X chromosomes. Bar=16 μ m.



References

- ASHRAF, M., GODWARD, M.B.E. 1988. Ultrastructural study of nucleolus reorganization in telophase in a green alga. *Cytologia* **53**: 447-456.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1990. Cytogenetic study in the malpighian tubules, salivary glands and testes of triatomines (triatominae, Heteroptera). *Thesis Abstracts. Revista Brasileira de Genética (Braz. J. Genetics)* **13**:640-642.
- BARTH, R. 1956a. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae. (Heteroptera, Reduviidae), V parte: Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **54**: 599-624.
- BARTH, R. 1956b. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). VI parte: Estudo comparativo sobre a espermiogênese das espécies mais importantes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **54**: 599-616.
- BICUDO, H. E. M. C., MADI-RAVAZZI, L., NANYA, S. 1992. Simplified Ag-staining technique for nucleolar organizing regions and nucleoli. *Rev. Bras. Gen.* **15**: 199-200.
- DE VAIO, E. S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A. M. 1985 Meiotic differences between three triatomines species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica, Netherlands* **67**: 185-191.



- FRIAS, D., ATRIA, J. 1998. Chromosomal variation, macroevolution and possible apatric speciation in *Mepraia spinolai* (porter) (Hemiptera: Reduviidae). *Genetics and Molec. Biol* **21**: 179-184.
- GALL, J.G., PARDUE, M.L.. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Genetics* **63**: 378-83.
- GOODPASTURE, C., BLOOM, S. E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**: 37-50.
- HOWELL, W., M., BLACK, D., A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia* **36**: 104-105.
- JOHN, H.A., BIRSTIEL, M.L., JONES, K.W.. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**: 582-87.
- MAC GREGOR, H.C. 1993. *An introduction to animal cytogenetics*. Chapman and Hall, London.
- MELLO, M. L. S. 1995. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem. Cytochem.* **28**: 149-154.
- MIRRE, C., KNIBIEHLER, B. 1985. Ultrastructural and functional variations in the spermatid nucleolus during spermiogenesis in the mouse. *Cell Diffn* **16**: 51-61.



- MORIELLE, A. 2000. Study of the spermatogenesis in triatomines of genus *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) with emphasis on nucleolar activity. *Thesis Abstracts. Genetics and Molecular Biology* **23**:502-503.
- PARVINEN, M., VIHKO, K. K., TOPPARI, J. 1986. Cell Interactions during the seminiferous epithelial cycle. In: __ *Cytology: A survey of cell biology*. 3 ed. New York: Academic Press **104**: 115-151.
- PETITPIERRE, E. 1996. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *Int. J. Insect Morphol. & Embriol.* **25**: 115-136.
- SCHMID, M. 1980. Chromosoma banding an amphibia IV. Differentiation of GC and AT rich regions in Anura. *Chromosoma* **77**: 83-103.
- SCHWEIZER, D., NAGL, W. 1976 Heterochromatin diversity in *Cybidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp. Cell. Res.* **111**: 327-32
- SOLARI, A. J. 1979. Autosomal synaptonemal complex and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* **72**: 225-240.
- SUMNER, A. T. 1990. *Chromosome banding*. Unwin Hyman, London.
- TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. 1999. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia* **64**: 235-240.
- TAVARES, M., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. 1997. Cytogenetics study on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Cytobios* **89**: 51-61.



- VIDAL, B. C., MELLO, M. L. S. 1987. *Biologia Celular*. p. 29. Atheneu, Rio de Janeiro.
- VIEGAS-PÉQUIGNOT, E.. 1992. *In situ* hibridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Willernson d., ed. *In situ hybridization: a pratical approach*. Oxford.Oxford University Press, IRL Press, 137-158.
- UESHIMA, N. 1979. Hemiptera II: Heteroptera. In: *Animal Cytogenetics*. p. 1-117. Gebrüder Bormtraeger, Berlin.

This paper wil be submitted to Heredity.



4. DISCUSSÃO GERAL

A análise geral dos resultados obtidos sobre o estudo da espermatogênese nas quatro espécies de insetos hematófagos do gênero *Triatoma* (*T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata* e *T. viticepps*) permite-nos levantar alguns aspectos relevantes para discussão.

4.1. Mecanismos da meiose em triatomíneos

Após a análise da clássica coloração com orceína lacto-acética podem ser corroborados alguns aspectos interessantes sobre o comportamento cromossômico nesses insetos. Os cromossomos das quatro espécies estudadas comportam-se como holocêntricos, pois não mostraram constrição primária e, nem tampouco, a tradicional figura em forma de "V" durante a metáfase meiótica, assemelhando-se à pequenas estruturas arredondadas. Os autossomos dispõem-se radialmente na periferia da placa metafásica (MII) e os cromossomos sexuais podem ou não estar no centro do anel.

As quatro espécies analisadas (*T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*) mostraram a presença de núcleos poliplóides da parede do túbulo testicular exibindo um ou vários corpúsculos heteropicnóticos, que representam os cromossomos sexuais. Tais núcleos parecem refletir a alta taxa metabólica necessária para a manutenção das células em divisão (DE VAIO *et al.*, 1985).



Os cromossomos de *T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* comportam-se como o dos demais Heteroptera. Os cromossomos estão unidos por filamentos cromatínicos na metáfase espermatoγονial. Os cromossomos sexuais formam um corpúsculo que pode ser bipartido caracterizando os núcleos em estágio confuso. Durante a segunda divisão meiótica, os autossomos dispõem-se radialmente na periferia da placa metafásica e os sexuais, podem ou não, estar no centro do anel. E, finalmente, durante a anáfase, três espécies (*T. platensis*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*) exibiram cromossomos com migração tardia, não migrando, portanto, de maneira sincrônica com os autossomos (BANERJEE 1958, UESHIMA 1966, MANNA 1995).

A análise convencional pela coloração com orceína lacto-acética, permitiu, também, identificar o cariótipo $20+X_1X_2Y$ de *T. tibiamaculata*, sobre o qual não havia nenhuma descrição citogenética anterior na literatura, e confirmou aqueles referidos para as três outras espécies (*T. protacta*, *T. platensis* e *T. vitticeps*), que é equivalente ao número modal dos cromossomos para a sub-família Triatominae.

A análise das técnicas citoquímicas utilizadas, nesse estudo, indicaram que o mecanismo de derivação cromossômica em três das espécies estudadas (*T. protacta*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*) tenha sido o da fragmentação do cromossomo X ancestral (UESHIMA, 1979, MANNA, 1995). A

natureza das seqüências de bases desses cromossomos sexuais será ainda melhor discutida, posteriormente, em outro item desse capítulo da Tese.

4.2. Relação entre as regiões heterocromáticas e nucléolo

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

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo seminífero e os núcleos interfásicos e em prófase inicial, das espermatogônias e dos espermátócitos, nessas espécies analisadas, mostraram uma próxima relação entre os corpúsculos heterocromáticos – destacados pela orceína, bandamento C e diferentes fluorocromos - e a presença dos corpúsculos nucleolares marcados com nitrato de prata, e também, com FISH. Essa associação, entre heterocromatina e nucléolo, já foi observada em túbulos de Malpighi e glândulas salivares desses insetos (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO 1986, 1997, 1998, AZEREDO-OLIVEIRA 1990).

Portanto, os dados obtidos do estudo dos testículos, nesse trabalho, em todas as espécies estudadas, confirmam a relação funcional e estrutural que ocorre entre essas duas estruturas, também nas células testiculares.



Nas fases da prófase I da meiose, pode ser observada uma clara associação entre o bloco heterocromático dos cromossomos sexuais e a impregnação pelos íons prata.

A presença de marcação pela prata, no bloco heterocromático foi muito evidente na prófase da primeira divisão meiótica, especificamente na "fase difusa", no diplóteno e na diacinese. A natureza heterocromática dessas marcações foi confirmada pelas técnicas de Bandamento C e por fluorocromos (DAPI, CMA₃ e quinacrina mostarda)

Em *T. vitticeps*, o número e a posição dos corpúsculos nucleolares, nos testículos de ninfa de 5º estadio, foram analisados em diferentes tipos nucleares. As marcações pela prata no bloco heterocromático, formado pelos cromossomos sexuais (X₁, X₂, X₃ e Y) foram predominantes e quase 100% das marcações foram únicas.

As marcações obtidas em metáfases mitóticas e meióticas da divisão celular das espécies analisadas estão presentes nos cromossomos sexuais, especialmente no X ou múltiplos de X, que são também heterocromáticos.

4.3. Diferenciação estrutural da heterocromatina nos cromossomos holocêntricos dos triatomíneos

O impacto das técnicas de bandamento moderno, revelando uma diferenciação longitudinal dos cromossomos, foi expressivo para a maioria dos eucariotos. Todavia, enquanto os cromossomos de vertebrados superiores



apresentam bandas G características ou bandas equivalentes (Q e R), padrões de bandamento semelhante não são obtidos em invertebrados e vertebrados inferiores. Para que se consiga banda G de qualidade é necessário que os cromossomos estejam livres de material citoplasmático circundante, o que é quase sempre inevitável, uma vez que, em se tratando de insetos, os cromossomos são obtidos, geralmente, por esmagamento.

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

Os resultados do presente estudo, que aplicou bandamento C aos cromossomos de *T. protacta*, *T. platensis* e *T. tibiamaculata*, corroboram evidências de que os cromossomos de Heteroptera apresentam pequenas quantidades de heterocromatina C, localizadas, preferencialmente, nas extremidades dos mesmos (CAMACHO *et al.*, 1985).

Diferenças entre espécies, na quantidade e posição da heterocromatina, são bastante comuns. Espécies estreitamente relacionadas podem diferir no número de bandas heterocromáticas, na sua localização e quantidade de heterocromatina (SUMNER, 1990a).



A análise realizada no presente trabalho possibilitou, também, a verificação de um comportamento bastante semelhante, após o tratamento com as duas endonucleases, nas três espécies estudadas. Esse fato pode ser consequência de dois principais fatores. Primeiro, devido à impossibilidade de ação da enzima pelo grau de compactação da cromatina e dos cromossomos e, segundo, porque ambas endonucleases clivam regiões ricas em CG.

SUMNER (1990b) sugere como improvável que a resistência de certas bandas-C às endonucleases de restrição seja devida à falta de sítios de clivagem. Sabe-se, que o DNA nas bandas-C, em alguns casos, é mais dificilmente extraído do que o DNA eucromático, e que algumas enzimas podem extrair todo ou quase todo DNA de certas bandas-C. É provável que uma série de fatores influenciem na digestão enzimática, como o grau de compactação da cromatina, interação DNA-proteína, tamanho do fragmento de DNA gerado, conformação enzimática e metilação.

Alguns fatores explicam os efeitos das endonucleases de restrição sobre cromossomos fixados como a presença ou ausência de seqüências específicas de bases de DNA em certas regiões dos cromossomos; capacidade da enzima de clivar uma seqüência-alvo, que, dependendo da organização da cromatina, pode estar inacessível e o comprimento dessa seqüência-alvo. Sendo assim, a possibilidade de detectar seqüências de DNA altamente repetido em outras regiões além das bandas-C positivas, mostra que o uso combinado de endonucleases de restrição e técnicas convencionais de citogenética aumenta a



capacidade de analisar os diferentes tipos de organização da cromatina, ajudando a desvendar sua heterogeneidade (GOSÁLVEZ *et al.*, 1987). O tradicional método de emprego das enzimas de restrição não detecta diretamente os sítios de ataque da enzima, mas induz perda de DNA, não detectando de forma eficiente esses sítios. Outros procedimentos experimentais podem e devem ser realizados para determinar os pontos de clivagem (SUMNER, 1990b).

Muitos estudos vêm sendo realizados sobre o efeito da organização da cromatina na atividade das endonucleases de restrição. BIANCHI *et al.* (1985) concluíram de seus estudos, com seis enzimas diferentes, que o empacotamento da cromatina desempenha pequeno ou nenhum papel na indução de bandas pelas ERs, e sugerem que a frequência dos sítios de clivagem para a enzima é a principal causa do bandamento cromossômico. Outros autores, como LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (1988), corroboram essa premissa.

Por outro lado, um estudo realizado com triatomíneos por TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (2000), mostra um padrão de digestão nos estágios iniciais da meiose (“estádio confuso”, paquíteno e diplóteno) sendo que nas metáfases, não foi verificada ação das endonucleases. Esses achados levantam a hipótese de que, no empacotamento da cromatina, algum tipo de interação DNA-proteína ou outros fatores devem ter influenciado nos resultados. No nosso estudo, as prometáfases de *T. protacta* mostraram bandas claras e escuras resultantes da digestão enzimática, enquanto que, as metáfases I de *T. platensis* parecem mostrar falha na eficiência funcional da enzima. É possível

que, o fato dos cromossomos desses insetos serem holocêntricos possa interferir no padrão de digestão das enzimas.

MEZZANOTTE & FERRUCI (1984) sugerem que a composição de bases de certas regiões cromossômicas é uma condição necessária, mas não suficiente, para gerar bandamento por digestão de endonucleases, e que a estrutura da cromatina desempenhe importante papel, permitindo ou impedindo, a interação DNA-enzima nos cromossomos fixados. Como apontado por SUMNER (1990b), os dois fatores críticos responsáveis pelo bandamento são a acessibilidade do DNA à endonucleases e a capacidade do DNA digerido difundir-se no cromossomo.

Fato interessante é que muitas enzimas falham em cortar sua sequência de reconhecimento se esta estiver metilada. A adenina e a citosina podem ser metiladas, mas apenas a 5-metil-citosina ocorre em DNA de eucariotos (SUMNER, 1990b). Isso talvez explique o fato de que, nas metáfases de segunda divisão de *T. tibiamaculata*, um dos cromossomos sexuais, provavelmente o X, ora apresenta marcação, ora não, provavelmente devido à atividade ou inatividade dos genes aí localizados. Esse fenômeno foi descrito em triatomíneos do gênero *Panstrongylus* quando submetidos ao bandamento C (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999b).

SOLARI (1979) demonstrou que, em *Triatoma infestans*, blocos de heterocromatina de alguns autossomos, juntamente com aqueles dos cromossomos sexuais, formam um cromocentro heteropicnótico durante a prófase

meiótica. TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999b) verificaram em *Panstrongylus* esse mesmo tipo de ocorrência, porém tal cromocentro era constituído apenas das regiões heterocromáticas dos cromossomos sexuais. De qualquer forma, em ambos os casos tratava-se de heterocromatina constitutiva. Nesse trabalho, o mesmo comportamento foi verificado em células espermatogoniais e, portanto, mitóticas, de *T. platensis*, após a ação das duas enzimas, sugerindo a presença de heterocromatina constitutiva naquelas regiões cromossômicas envolvidas na formação do cromocentro.

De uma forma geral, as endonucleases de restrição, aplicadas à preparações citológicas, constituem um importante instrumento de análise citogenética que possibilita a classificação de subtipos de heterocromatina, além daqueles por métodos convencionais, proporcionando uma fonte de estudos e questionamentos sobre sua forma de atuação.

O bandamento pode ser usado para estudo da evolução cromossômica de várias formas, como por exemplo, a diferenciação entre espécies relacionadas. Diferenças em quantidade, posição e tipo de heterocromatina são extremamente comuns. Espécies relacionadas podem diferir, não somente na quantidade de heterocromatina de seu genoma, mas, também, no número de bandas, localização e suas propriedades de coloração (WARCHALOWSKA-SLIWA *et al.*, 1994). Por outro lado, o bandamento por endonucleases de restrição pode corroborar e ampliar o conhecimento da evolução que ocorreu entre as espécies. As espécies do gênero *Triatoma* analisadas nesse trabalho,



apresentaram comportamento muito semelhante, após o tratamento com as endonucleases *HaeIII* e *AluI*, o que pode ser indicativo de grande proximidade evolutiva entre elas.

Os resultados desse trabalho, mostraram um padrão de afinidade, nas regiões heterocromáticas, pelos fluorocromos diferentes para as quatro espécies. Em *T. protacta*, os telômeros dos cromossomos autossomos espermatogoniais são heterocromáticos, pois mostraram-se CMA_3^+ e DAPI^- , portanto ricos em seqüências de bases GC, e, nas metáfases II, verificou-se que um dos cromossomos sexuais é CMA_3^+ e o outro DAPI^+ . Em *T. tibiamaculata* dois cromossomos sexuais são CMA_3^+ e um é DAPI^+ . *T. vitticeps*, apresentou três marcações CMA_3^+ , referente aos cromossomos sexuais ($\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3$) e, após o tratamento com fluorocromos AT específicos, apenas uma marcação (Y), e, em *T. platensis*, não foram encontrados núcleos em metáfase.

A utilização das técnicas de bandamento por fluorocromos, principalmente, DAPI/DA e CMA_3/DA , permitiu inferir que cromossomos sexual X é CMA_3^+ , portanto, rico em regiões GC, e o cromossomo sexual Y é DAPI^+ , conseqüentemente com grandes concentrações de bases AT. Esses resultados confirmam, dessa forma, a natureza heterocromática desses cromossomos, obtidos inicialmente por meio da técnica clássica de bandamento C.

Também, pode ser verificado que as espécies *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* que possuem cromossomos sexuais múltiplos, respectivamente, $\text{X}_1\text{X}_2\text{Y}$ e $\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{Y}$, mostraram as mesmas marcações fluorescentes, ou seja,

CMA₃⁺ em todos cromossomos X. Essa afinidade ao mesmo fluorocromo (CMA₃) confirma, assim, a hipótese da origem dos cromossomos sexuais múltiplos em triatomíneos, a partir da fragmentação ou dissociação de um único cromossomo X pré-existente (UESHIMA, 1979; AZEREDO-OLIVEIRA, 1990; TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

4.4. Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) em cromossomos holocêntricos de triatomíneos

Deve ser ressaltado, que já foi verificado na literatura, em uma grande variedade de cromossomos de espécies de plantas e animais, que as Regiões Organizadoras Nucleolares estão associadas à regiões de constrição secundárias, ricas em bases GC. Portanto, a digestão enzimática dessas regiões por *Hae*III e a marcação fluorescente diferencial com cromomicina A₃, possibilitam compreender melhor a localização dos segmentos de DNAr, responsáveis pela transcrição, na intérfase, do RNAr 45S, molécula precursora das subunidades ribossômicas (GUERRA, 1988; SUMNER, 1990b).

Nesse estudo, as técnicas de citogenética molecular (enzimas de restrição: *Hae*III e *Alu*I; bandamento por fluorocromos: quinacrina mostarda, DAPI e CMA₃ e FISH) permitiram localizar a presença de RONs ativas, nos cromossomos sexuais das espécies *T. platensis* e *T. vitticeps* e, em um dos bivalentes autossômicos nas espécies *T. protacta* e *T. tibiamaculata*, enquanto as técnicas citogenéticas clássicas (orceína; impregnação por íons prata e

bandamento C) apontavam a presença constante desses sítios nos cromossomos sexuais (X) e nas regiões teloméricas de alguns autossomos.

No apêndice estão representados, resumidamente, os principais resultados verificados sobre a estrutura diferencial dos cromossomos holocêntricos dessas espécies. Pode ser verificado que os resultados obtidos por FISH são não coincidente aqueles obtidos pela impregnação por íons prata nas espécies *T. protacta* e *T. tibiamaculata*. Os dados relatados na literatura sobre a utilização desse método de hibridação, em insetos, são muito raros.

MAC GREGOR (1993) comparou impregnação com íons prata e hibridação *in situ* fluorescente e demonstrou que nem todas as NORs ativas são verificadas com a prata. Isto, provavelmente, se deve ao fato de que somente as NORs ativas no início da interfase mostram essa afinidade, sugerindo que o número de NORs coradas pela prata é menor do que aquele evidenciado pelo uso técnica de hibridação. O DNAr, usado como sonda, deve identificar marcadores cromossômicos para estudos evolutivos, medir o nível de correspondência entre os resultados obtidos pela impregnação com a prata e por FISH e, também, medir a atividade do gene em sítios NOR contribuindo para o entendimento do processo evolutivo nos organismos.

A natureza holocêntrica de alguns cromossomos representa um grande obstáculo aos estudos citogenéticos, porém, nesse trabalho, as espécies mostraram sinais de hibridação com sonda de rDNA 28S.

Em uma espécie, *T. vitticeps*, a sonda hibridou com dois dos cromossomos X, que são CMA₃⁺, portanto, ricos em seqüências CG. Esses resultados são reforçados pela indicação de que os cromossomos sexuais foram impregnados pelos íons prata e, portanto, prováveis portadores das RONS.

Por outro lado, as duas outras espécies, *T. tibiamaculata* e *T. protacta*, mostraram hibridação em autosomos. No primeiro caso, elas eram teloméricas e estavam presentes em um único bivalente. Esses sítios parecem ser coincidentes com aqueles CMA₃⁺, encontrados em um autossomo com a mesma localização. No entanto, em *T. tibiamaculata* não foi observada qualquer região CMA₃⁺ em autossomos. Há uma hipótese de que em cromossomos holocêntricos, as áreas heterocromáticas estão dispersas ao longo do eixo do cromossomo, ao contrário da alta concentração de heterocromatina próxima ao centrômero encontrada em cromossomos monocêntricos (MANDRIOLLI *et al.*, 1999). Isso pode explicar, em parte, a presença dessas áreas em regiões de cromossomos autossomos, e não nos cromossomos sexuais dessas duas espécies. De qualquer forma, estudos posteriores serão necessários.

A associação dos dados de bandamento por fluorocromos e hibridação *in situ* fluorescente, com aqueles obtidos por digestão enzimática, especialmente por meio da enzima *Hae*III, cuja função é clivar regiões ricas em GG↓CC e, também, com outras observações constatadas nesse trabalho, indica, com maior segurança que os cromossomos X, nas espécies *T. platensis* e *T. vitticeps*, são, realmente, portadoras de RONS.



Em se tratando dos triatomíneos, onde as informações sobre a composição da cromatina são muito escassas, os resultados obtidos nesse estudo sobre a identificação de quantas são e onde estão localizadas as Regiões Organizadoras Nucleolares, por meio da técnica de FISH, juntamente com resultados obtidos pela impregnação por prata, bandamento de restrição e afinidade pelos fluorocromos CMA₃ e DAPI, contribuem para o esclarecimento da estrutura cromossômica, elucidando, inclusive, questões sobre as relações intra e inter-específicas nesse grupo e, também, sobre a natureza holocinética de seus cromossomos.

4.5. Atividade nucleolar durante a meiose dos triatomíneos

Outro aspecto a ser discutido, a partir dos resultados do estudo da meiose dos triatomíneos, é a presença e o comportamento de um corpúsculo extra, de natureza aparentemente cromossômica, encontrado nos núcleos em divisão.

A impregnação com prata revelou diferentes marcações no decorrer da meiose das espécies estudadas. A intérfase mostra uma massa grande, nitidamente marcada. No diplóteno passam a ser visíveis duas ou três massas coradas, duas das quais sobre os cromossomos. Na diacinese (Prófase I final), um único corpúsculo permanece fortemente corado e localizado entre os cromossomos. À medida que os cromossomos se organizam na placa equatorial, esse corpúsculo corado aparece deslocado em relação aos mesmos.

Esse mesmo corpúsculo, impregnado fortemente com nitrato de prata, é encontrado, principalmente, nas placas metafásicas da primeira divisão e, algumas vezes, na anáfase, onde aparece duplo. Uma estrutura semelhante a esse corpúsculo, nas células interfásicas, cora-se com orceína. A natureza desse corpúsculo é desconhecida. Acreditamos que se trata do mesmo corpúsculo observado por BARTH (1956a) em várias fases da meiose, em lâminas de *T. infestans*, coradas com hematoxilina, sendo melhor evidenciado na anáfase II. À época, o autor interpretou este fato como devido a uma maior afinidade do corpúsculo ao corante, nesta fase, cuja função, era completamente obscura.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) apresentou algumas hipóteses iniciais quanto à natureza deste corpúsculo: 1) restos de nucléolos; 2) micronúcleolos; 3) corpos pré-nucleolares em formação; 4) micronúcleos; 5) elementos cromossômicos em fase de eliminação e 6) um ou mais cromossomos ou segmentos cromossômicos supernumerários ou não, portadores de RON.

As interpretações preliminares, relacionadas com restos de corpos nucleolares, micronúcleolos e corpos pré-nucleolares, foram devidas à nítida marcação obtida nestes corpúsculos com o nitrato de prata em trabalhos anteriores (AZEREDO-OLIVEIRA 1990, TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA 1997, TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA 1999).

Sabe-se que os íons prata ligam-se a um grupo especial de proteínas ácidas existentes no nucléolo (C23 e B23). Dessa forma, pode ser estabelecida uma relação entre o corpúsculo corado e o nucléolo. É conhecido que

o nucléolo possui um ciclo de desagregação e reorganização, isto é, rompimento durante a prófase tardia e reorganização no início da telófase (ASHRAF & GODWARD, 1980). No entanto, vários exemplos, em diferentes espécies animais e vegetais, mostram evidências de que o material fibrilar, principalmente, e algumas vezes, o granular, podem persistir durante todas as fases do ciclo celular, incluindo a metáfase e a anáfase. Essas evidências suportam a possibilidade de que o material nucleolar não seja totalmente sintetizado na região cromossômica do organizador nucleolar, mas um material pré-existente seja também necessário e utilizado (ASHRAF & GODWARD, 1988).

Os resultados observados nesse trabalho, somente pela impregnação por prata, estão de acordo com a persistência nucleolar durante o ciclo mitótico porque os corpúsculos pré-nucleolares podem ser observados em vários estágios durante a divisão celular mitótica. Esses corpúsculos pré-nucleolares permanecem na célula, após a prófase, durante o ciclo, até a telófase. Os mesmos aspectos foram verificados em outros triatomíneos do gênero *Triatoma* (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999), *Panstrongylus* (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) e *Rhodnius* (MORIELLE, 2000).

Por outro lado, nossos resultados obtidos durante a espermatogênese desses insetos, por meio de bandamento fluorescente e por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), não detectaram a persistência de corpúsculos durante as divisões celulares meióticas, nem nas espermátides. Tais



corpúsculos são, então, corados tanto pela orceína como pelos íons prata, mas não são detectados por fluorocromos e por FISH.

Tal comportamento e características de coloração, juntos, denotam, então, fortemente, que esses corpúsculos não são segmentos cromossômicos heterocromáticos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares, como foi considerado nos estudos anteriores sobre a espermatogênese de quatro espécies do gênero *Triatoma* (AZEREDO-OLIVEIRA, 1990).

Com base apenas em técnicas convencionais foi inferido, também, que o nucléolo não desaparecesse completamente durante a espermatogênese em triatomíneos, permanecendo na forma de pequenos corpúsculos pré-nucleolares, que se reúnem para formar o próximo ciclo nucleolar, que no caso da meiose, ocorrer somente após a fecundação e a formação do zigoto. (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA 1997, TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA 1999b).

No entanto, diante dos novos aspectos sobre a natureza citoquímica dos corpúsculos, detectados nesse trabalho, durante as fases da meiose até as fases iniciais das espermátides, pode ser sugerido que esses corpúsculos representem uma fonte de RNA associado à proteínas específicas, constituindo complexos de ribonucleoproteínas (RNPs). Essa fonte de RNPs é muito importante nas fases iniciais da espermiogênese quando ocorre uma série sucessiva de eventos, nos quais as células haplóides sofrem transformação nuclear



e condensação da cromatina, e desenvolvem estruturas especiais como o acrossomo e o flagelo (PARVINEN *et al.*, 1986). Durante esse padrão de diferenciação, a célula, momentaneamente, diminui a síntese de proteína (MIRRE & KNIBIEHLER, 1985). Os achados em triatomíneos, podem indicar que suprimidos de RNPs são necessários à síntese protéica da espermátide. Os pequenos pontos vistos nas espermátides desses insetos, tanto por meio da coloração pela orceína como pela impregnação pela prata, evidenciam a presença desses corpúsculos de RNPs, já que os mecanismos dessas técnicas, por acidofilia e por ligação dos íons prata, indicam que apenas as proteínas são marcadas.

Durante a espermatogênese de mamíferos e de outros vertebrados há evidências sobre a síntese celular de RNA e, simultaneamente, aparece uma organela característica – o “corpo cromatóide” – que apresenta típica forma lobulada. Estudos com radioatividade, derivada de uridina tritiada, e estudos imunohistoquímicos de alta resolução indicaram a presença de actina e RNA no “corpo cromatóide”. O “corpo cromatóide” tem várias funções durante a espermiogênese, por exemplo, relacionadas à formação do sistema acrossômico. A mais interessante das funções propostas para o “corpo cromatóide” é sua participação no metabolismo de RNA das células espermatogênicas. Há evidências de que uma considerável proporção de RNA sintetizado nos espermatócitos, em paquíteno, seja preservada durante a diferenciação da espermátide até estágios tardios da espermiogênese. Foi sugerido, também, que o “corpo cromatóide” deva ser uma organela de estocagem desses RNA tipo “longa-



vida” assegurando, assim, a síntese protéica durante o final da espermiogênese, quando o genoma da espermátide está inativo. É, ainda, possível, que proteínas pré-sintetizadas sejam estocadas no “corpo cromatóide” para que, no momento apropriado, sejam transformadas em estruturas próprias da espermátide (Revisão em PARVINEN *et al.*, 1986).

Sendo assim, considerando a variação, durante a meiose, do padrão de impregnação por íons prata, isto é, de uma massa grande e única na intérfase, a duas ou três massas menores no diplóteno (duas delas estão sempre sobre cromossomos) e, finalmente, a um único corpo fortemente corado, localizado entre os cromossomos na diacinese, ou longe dos cromossomos quando a placa metafásica é formada, e também; a natureza citoquímica desses corpúsculos, detectada por diferentes técnicas, nesse estudo, sugerimos que tais corpúsculos, visíveis da diacinese até às espermátides, durante a espermatogênese dos triatomíneos, sejam semelhantes ao “corpo cromatóide” detectado em mamíferos e desempenhe função análoga, com ênfase ao metabolismo de RNA.

Quanto à hipótese da reativação pós-meiótica da transcrição dos genes para RNA, já nas fases iniciais da espermiogênese, esta deve ser melhor esclarecida, pois, não foi verificada, nesse trabalho, hibridação com sonda de DNAr nas espermátides, em todas as quatro espécies analisadas (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA 1999b).

De qualquer forma, os resultados aqui obtidos reforçam o conceito de conservação dos mecanismos evolutivos envolvidos em preservar os

níveis necessários de síntese protéica em diferentes estágios da diferenciação celular, tanto em vertebrados como em invertebrados e, também, indicam que a síntese de RNA na gametogênese segue um padrão muito antigo e, é possivelmente, universal entre os organismos com reprodução sexuada.



5. CONCLUSÕES GERAIS

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

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

1. Em todas as espécies foi observada uma associação entre nucléolo e regiões heterocromáticas, nas células interfásicas somáticas e nas da linhagem germinativa. Nas células em divisão, tanto nas espermatogônias quanto nos espermatócitos, essa associação também pôde ser constatada. A localização coincidente dessas regiões específicas, evidencia, mais uma vez, a íntima relação funcional entre essas estruturas.

2. A diferenciação da estrutura química das regiões heterocromáticas, tanto na cromatina dos núcleos interfásicos quanto nos cromossomos já condensados, com base nas técnicas de bandamento C, endonucleases de restrição e bandamento por fluorocromos, indica que a composição de bases dessas regiões cromossômicas é bastante homogênea entre as espécies analisadas.

Pode ser inferido que o bloco heterocromático dos cromossomos sexuais é composto por seqüências ricas em bases CG – no cromossomos X ou múltiplos de X – e por bases AT, no cromossomo Y. Já os autossomos apresentam maior variabilidade dessas seqüências de bases em suas regiões heterocromáticas teloméricas e intersticiais, comuns à maioria desses cromossomos. Essas características semelhantes podem ser indicativas de proximidade evolutiva entre as quatro espécies de triatomíneos analisadas. No entanto, para se obter maiores informações sobre as relações filogenéticas envolvendo a heterocromatina ainda seria necessário comparar a quantidade de bases de DNA contidas nas bandas C⁺.

3. A digestão da maior parte do cromossomo X ou dos múltiplos de X, pela enzima *Hae*III e afinidade de seus cromossomos pelo fluorocromo CMA₃, demonstraram uma idêntica composição de bases ricas em seqüências CG. Essa estrutura molecular comum confirma, portanto, a clássica hipótese da origem dos cromossomos sexuais múltiplos em triatomíneos, a partir da fragmentação ou dissociação de um único cromossomo X pré-existente. Neste caso, podemos considerar que a espécie *T. platensis* (10,XY) é ancestral em relação às espécies *T. protacta* e *T. tibiamaculata* (10, X₁X₂Y) e, essas, por sua vez, mais primitivas em relação à espécie *T. vitticeps* (10,X₁X₂X₃Y). Deve ser constatado que o número dos cromossomos autossomos é sempre constante, variando apenas o número dos cromossomos sexuais múltiplos de X.

4. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) permitiu localizar sítios ativos, de DNAr, homólogos à seqüência de 28S, nos

cromossomos sexuais de *T. platensis* e *T. vitticeps* e nas regiões teloméricas de um bivalente em *T. protacta* e *T. tibiamaculata*. Portanto, podemos considerar que as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), nos triatomíneos estudados, estejam localizadas em outros cromossomos e não apenas nos sexuais como encontrado em estudos anteriores, por nosso grupo de pesquisa, onde, somente com a técnica de impregnação argêntica, havia indicações da prevalente relação dos cromossomos sexuais, e de poucos autossomos, com as RONs. Para que as RONs possam ser melhor utilizadas como marcadores cromossômicos evolutivos, em triatomíneos, várias outras espécies dos diferentes gêneros deverão ser, ainda, analisadas com as diferentes metodologias, e os dados obtidos deverão ser correspondentes. No entanto, pode ser ainda afirmado, que os estudos sobre a atividade organizadora nucleolar representam uma fonte importante de conhecimento sobre os padrões de diferenciação e desenvolvimento das espécies.

5. A presença e o comportamento de um corpúsculo extra, de natureza química desconhecida, já observado nos núcleos em divisão, nos trabalhos pioneiros sobre a meiose dos triatomíneos, finalmente, e, graças à variabilidade das técnicas aqui empregadas, pôde ser melhor interpretado. Sugerimos que a origem desse corpúsculo está intimamente ligada ao ciclo de atividade e de desorganização do nucléolo, de acordo com os seguintes estágios:

➤ A atividade nucleolar persiste até o final da prófase I (diplóteno-diacinese) quando, então, ocorre a fragmentação dessa organela em pequenos corpúsculos.



➤ Os produtos da transcrição nucleolar, isto é, moléculas de RNAr (45S) associadas às proteínas ácidas específicas, recém sintetizadas, agrupam-se em partículas de ribonucleoproteínas (RNP).

➤ As partículas de RNPs reúnem-se formando o corpúsculo visível, a partir do final do diplóteno e do início da diacinese, permanecendo deslocado ao lado dos cromossomos, na metáfase I. Nas fases de anáfase e telófase, algumas vezes aparece duplo, indicando que se dividiu. Ao longo das fases da meiose II, um único corpúsculo é observado nos núcleos.

➤ Nas fases iniciais da espermiogênese até a fase de alongação das espermatídes, é visível um corpúsculo de RNP, ou, mais raramente, dois ou três corpúsculos, variável de espécie para espécie. Ainda em relação à função desse corpúsculo sugerimos que;

➤ Os complexos de RNA + proteínas (RNPs) que formam este corpúsculo, são necessários para o metabolismo celular durante a série sucessiva de eventos característicos que ocorre durante a diferenciação de espermatíde a espermatozóide:

- ✓ compactação da cromatina;
- ✓ substituição das proteínas histônicas, complexadas ao DNA, por protamina;
- ✓ formação do acrossomo;
- ✓ formação do flagelo.

Em qual ou quais desses eventos esta partícula de RNP tem papel crucial, ainda não temos condição de indicar. Novas abordagens, incluindo técnicas específicas com imunocitoquímica (em nível de microscopia de luz e de eletrônica) e hibridação com sondas de cDNA, complementar ao DNAr, deverão ser realizadas para melhor elucidar este problema que, na meiose de eucariotos ainda é inédito. Também sugerimos que este corpúsculo seja análogo ao “corpo cromatóide”, já muito bem verificado na espermatogênese dos mamíferos, mas cuja função não está totalmente esclarecida.

Finalmente, as características diferentes relacionadas à espermatogênese e à estrutura da cromatina e dos cromossomos, reforçam e ampliam os conceitos sobre os fatores atuantes na evolução das espécies da subfamília Triatominae. Sugerimos, portanto, que a variação na quantidade e na seqüência de bases da heterocromatina, assim como a variabilidade da localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), tenham sido de relevante importância nos mecanismos adaptativos e nos de diferenciação entre estes insetos hematófagos.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, D. G., THOMSON, J. N.. Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res.* 1, 15-26, 1993.

ASHRAF, M., GODWARD, M.B.E. The nucleolus in telophase, interphases and prophase. *J. Cell. Sci.* 41, 321-29, 1980.

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

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., MELLO, M.L.S. Mg^{2+} -dependent ATPase activity investigated in heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. *Revista Brasileira de Genética (Brazil. J. Genetics)* IX, 223-229, 1986.

_____. Acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios* 92, 23-28, 1997.

_____. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios* 93, 33-42, 1998.

AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cytogenetic study in the malpighian tubules, salivary glands and testes of triatomines (triatominae, Heteroptera). *Thesis Abstracts. Revista Brasileira de Genética (Braz. J. Genetics)* 13, 640-642. 1990.

BALCZON, R. D., BRINKLEY, B. R.. The kinetochore and its roles during cell division. In: ____ ADOLPH, K. W. *Chromosomes: Eukaryotic, Prokaryotic and Viral*. Florida, Boca Raton: CRC Press, Inc., 1990. p. 167-189.

BARAN, V., MERCIER, Y., RENARD, J.P. Nucleolar substructure of rabbit cleaving embryos: An immunocytochemical study. *Molecular Reproduction and Development* 38, 34-44. 1997.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae. (Heteroptera, Reduviidae), V parte: Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 54, 599-624, 1956a.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). VI parte: Estudo comparativo sobre a espermiogênese das espécies mais importantes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 54, 599-616, 1956b.

BANERGEE, M. R. A study of chromosomes during meiosis in twenty-eight species of Hemiptera (Heteroptera, Homoptera). *Proc. Zool. Soc.* 11, 2-21, 1958.

BIANCHI, M.S., BIANCHI, N.O., PANTELAS G.E., WOLFF, S. The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases. *Chromosoma* 91, 131-136, 1985.

BRINKLEY, B. R., VALDIVIA, M. M., TOUSSON, A., BALCZON, R. D.. The Kinetochore: structure and molecular organization. In: __ HYAMS, J. S. & BRINKLEY, B. R. *Mitosis: molecules and mechanism*. Oxford, Great Britain: Alden Press, 1989. p. 77-118.

CAMACHO, J. P. M., BELDA, J., CABRERO, J.. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Can. J. Genet. Cytol.* 27, 491-497, 1985.

COMINGS, D. E., OKADA, T. A.. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* 37, 177-192, 1972.

DE VAIO, E. S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A. M., FRANCA, M.E., MARTINEZ, M.E. Meiotic differences between three triatomines species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica* 67, 185-191, 1985.

FAKAN, S., HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell* 56, 189-206. 1986.

GOH, H. G., SAXENA, R. C., BARRION, A. A., KIM, J. M.. Chromosome of brown plathopper *Nilaparvata lugens* (Stal) (Homoptera: Delphacidae). *Res. Repot. Rur. Develop. Administ. Crop Protec.* 30, 9-13, 1988.

GOSÁLVEZ, J., BELLA, J.L., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., MEZZANOTTE, R. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). *Heredity* 59, 173-180, 1987.

GONZÁLEZ-GARCIA, J. M., RUFAS, J. S. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma* 104, 287-98. 1995.

GONZÁLEZ-GARCIA, J. M., ANTONIO, C., SUJA, J. A., RUFAS, J. S.. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Gramphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 4, 124-132, 1996.



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

HARTLEY, S. E. Restriction enzyme banding in atlantic salmon (*Salmo solar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *Genet. Res. Camb.* 57, 273-8. 1991.

HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia* 36, 104-105. 1980.

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

JOHN, B., MIKLOS, G. L. G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International Review of Cytology* 58, 1-114. 1979.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., GOSÁVEZ, J., SUJA, J.A., MEZZANOTTE, R. Restriction endonuclease digestion of meiotic and mitotic chromosomes in *Pygomorphs conica* (Orthoptera: Pygomorphidae). *Genome* 30, 621-626, 1988.

LUCEÑO, M., GUERRA, M.. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49, 301-309, 1996.

LUCEÑO, M., VANZELA, A. L. L., GUERRA, M.. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can. J. Bot.* 76, 440-449, 1998.

MACGREGOR, H.C. *An introduction to animal cytogenetics*. Chapman and Hall, London. 1993.

MANICARDI, G. C., GAUTAM, D. C.. Cytogenetic investigations on the holocentric chromosomes of *Tetraneurella akinire* (Sasaki) (Homoptera, Pemphigidae). *Caryologia*. 47, 159-165, 1994.

MANICARDI, G. C., BIZZARO, D., AZZONI, P., BIANCHI, U.. Cytological and electrophoretic analysis of DNA methylation in the holocentric chromosomes of *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae). *Genome* 37, 625-630, 1994.

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



MANNA, G. K.. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In: *Chromosomes in evolution in eukaryotic groups*. Florida: Boca Raton, 1995. p. 189-225.

MEDINA, F. J., SOLANILLA, E. L., SÁNCHEZ-PINA, M. A., FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E., RISUEÑO, M. C. Cytological approach to the nucleolar functions detected by silver staining. *Chromosoma* 94, 259-266. 1986.

MÈLÈSE, T., XUE, Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 319-324. 1995.

MEZZANOTTE, R., FERRUCI, L. Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. *Genetica* 64, 123-128, 1984.

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

MORIELLE, A. Study of the spermatogenesis in triatomines of genus *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) with emphasis on nucleolar activity. *Thesis Abstracts. Genetics and Molecular Biology* 23, 502-503, 2000.

MURAMOTO, N.. A study of the holocentric chromosomes by a simple method for differential stain. *Proc. Japan Acad* 61, p. 215-218, 1985.

NEVES, D.P. *Tripanosoma cruzi*. In: *Parasitologia Humana* (7 ed). Rio de Janeiro, Atheneu, p. 59-89, 1988.

OCHS, R. L., LISCHWE, M. A., SHEN, E. et al. Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* 92, 330-6. 1985.

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

PANZERA, F., HORNOS, S., PEREIRA, J., CESTAU, R., CANALE, D., DIOTAIUTI, L., DUJARDIN, J. P., PEREZ, R.. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 732-739, 1997.

PAPESHI, A. G. Correspondence between C-banding and AG-NOR in the sex chromosomes of *Belostoma axyrum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Cytologia* 60, 291-95. 1995.

PARK, H. C., HODKINSON, I. D., KUZNETSOVA, V. G.. Karyotypes of psyllid species: 1. (Homoptera: Psylloidea). *Korean J. of Entomol.*, 25, 155-160, 1995.

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

PAZY, B.. Supernumerary chromosomes and their behaviour in meiosis of holocentric *Cuscuta babylonica* Choisy. *Bot. J. Linnean Soc* 123, 173-176, 1997

PAZY, B., PLITMANN, U.. Chromosome divergence in the genus *Cuscuta* and its systematic implications. *Caryologia* 48, 173-180, 1995.

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

PÉREZ, R., RUFAS, J.S., SUJA, J.A., PAGE, J., PANZERA, F.. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 8, 17-25, 2000.

PETITIPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 25, 115-133. 1996.

REICHE, E.M.V., INOUE, M.M.Z., PONTELLO, R., MORIMOTO, H.K., ITOW JANKEVICIUS, S., MATSUO, T., JANKEVICIUS, J.V. Seropositivity for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies among blood donors of the "Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná", Londrina, Brasil (1). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 38, 233-240, 1996.

RIEDER, C. L., BOWSER, S. S., COLE, R., RUPP, G., PETERSON, A., ALEXANDER, S. P.. Diffuse kinetochores and holokinetic anaphase chromatin movement during mitosis in the Hemipteran *Agallia constricta* (Leafhopper) Cell Line AC-20. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 15, 245-259, 1990.

SCHEER, U., XIA, B., MERKERT, H. Looking at christmas tree in the nucleolus. *Chromosome* 105, 470-80. 1997.

SCHWARZACHER, H. G., WACHTLER, F. The nucleolus. *Anat. Embryol.* 188, 515-36. 1993.

SCHWEIZER, D., NAGL, W. Heterochromatin diversity in *Cybidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp. Cell Res.* 11, 327-32. 1976.

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

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

SPENCE, J. M., BLACKMAN, R. L., TESTA, J. M., READY, P. D.. A 169-base pair *tandem* repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Mysus persicae* group. *Chromosome Res.* 6, 167-175, 1998.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75, 304-306. 1972.

____ C-banding and related methods. In: *Chromosome banding*. Boston, Unwin Hyman, cap. 4, p. 39-68, 1990a.

____ Banding with nucleases. In: *Chromosome banding*. Boston, Unwin Hyman, cap. 12, 253-271, 1990b

TAVARES, M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetics study on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera:Reduviidae). *Cytobios* 89, 51-61, 1997.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus*. *Cytologia* 46, 235-240, 1999a.

____ Pattern of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 52, 177-184, 1999b.

____ Restriction endonuclease banding and digestion resistant heterochromatin in triatomines, genus *Panstrongylus*. *Caryologia* 89, 51-61, 2000.

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

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



WACHTLER, F., STAHL, A. The nucleolus: A structural and functional interpretation. *Micron*. 24, 473-505. 1993.

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

WOLF, K. W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *Int. J. Insect. Morphol. & Embryol.* 25, 37-62, 1996.

ZATSEPINA, O. V., DUDNIC, O. A., TODOROV, I. J. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma* 105, 418-430. 1997.



APÊNDICE

Principais resultados obtidos sobre a estrutura dos cromossomos holocêntricos de quatro espécies do gênero *Triatoma* (*T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps*).

Espécie (cariótipo)	<i>T. protacta</i> (10A,X ₁ X ₂ Y)	<i>T. platensis</i> (10A,XY)	<i>T. tibiamaculata</i> (10A,X ₁ X ₂ Y)	<i>T.vitticeps</i> (10A,X ₁ X ₂ X ₃ Y)
Técnica				
Orceína	1 cromocentro e cromossomo sexual com migração tardia	1 ou 2 cromocentros e cromossomo com migração tardia	1 cromocentro ou cromocentro partido e cromossomo com migração tardia	1 cromocentro ou cromocentro partido e cromossomo com migração tardia
Impregnação pela prata	Autossomos com marcação telomérica e sexuais com marcação (X ₁ X ₂)	Autossomos com marcações intersticiais e X impregnado pela prata	Autossomos com marcação telomérica e sexuais com marcação (X ₁ X ₂)	X ₁ X ₂ X ₃ marcados
Bandamento C	Autossomos com extremidades teloméricas heterocromáticas	Autossomo totalmente heterocromático ou com extremidades C ⁺ e um dos crs. sexuais é C ⁺	Autossomo totalmente heterocromático ou com extremidades C ⁺ e um sexual com forte marcação	
Enzimas <i>HaeIII</i> e <i>AluI</i>	Autossomos com bandas terminais e intersticiais	1 autossomo maior C ⁺ e demais, com bandas teloméricas e intersticiais	Autossomos com bandas terminais e intersticiais	
	Cromossomos sexuais sem marcação (digeridos)	Cromossomos sexuais sem marcação (digeridos)	Cromossomos sexuais sem marcação (digeridos)	
Quinacrina	Presença de cromocentro e marcações inespecíficas nos cromossomos	Presença de vários blocos cromocêntricos ⁺ , e marcações inespecíficas nos cromossomos	Presença de um ou dois cromocentros	Presença de cromocentro e metáfases com tênue marcação (Y)
DAPI	1 cromossomo sexual DAPI ⁺ (Y) e dois DAPI ⁻ (X ₁ X ₂)	Presença de cromocentro (1 bloco maior e outro menor)	O cromossomo Y é DAPI ⁺	O cromossomo Y é DAPI ⁺ . Presença de cromocentro
CMA ₃	Um autossomo com extremidade telomérica CMA ₃ ⁺ e um cromossomo sexual com pouca afinidade pelo fluorocromo	Presença de cromocentro ⁺ , marcações inespecíficas	Núcleos do estádio confuso com 3 marcações; cromossomos sexuais Y ⁻ e X ₁ X ₂ ⁺	Y ⁻ e X ₁ X ₂ X ₃ ⁺
FISH	Hibridação telomérica em um bivalente	Hibridação com um cromossomo sexual (X)	Hibridação nos telômeros de um bivalente	Hibridação com dois cromossomos sexuais (X)

SEVERI-AGUIAR, G.D.C. *Cytogenetic study in species of genus Triatoma (Heteroptera, Reduviidae), with emphasis on heterochromatin and nucleolar organizers regions*. São José do Rio Preto, 2001. 194p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Chromatin organization in germinative nucleus cells lines and in holocentric chromosomes in males of four species of triatomines (*T. platensis*, *T. protacta*, *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*) has been investigated at light microscopy level after classics cytochemistry technician and by molecular cytogenetic technicians. In all studied species was observed an association between nucleolus and heterochromatic regions that evidence a close relationship between these structures. The obtained date allowed differentiation of chemistry structure of the heterochromatic regions allowing to infer that sex chromosomes heterochromatic block is composed of GC-rich bases sequences in X-chromosome and multiples X, and of AT-rich bases in Y chromosome, confirming, in this way, the mechanism of the origin of multiple sex chromosomes that lies on the fragmentation or dissociation of a single pre-existing X chromosome. The results yielded maked possible, too, localize rDNA actives sites, that are homologous to 28S sequences, in the sex chromosomes and in the telomeric regions of one or two autosomes, confirming these chromosomes bear Nucleolar Organizer Regions (NORs). A extra single strongly stained body, evidenced from phrofase until spermiogenesis initial phases, had its origin an chemistry nature identified like products of nucleolar activity (rRNA molecules) associated to acidics proteins, forming ribonucleoproteins (RNPs) corpuscles. The maintenance this RNP block, during meiotic cicle until initial spermiogenesis, indicates that this corpuscle maybe has importants functions in the cellular metabolism during the differentiation process, from spermatid until spermatozoan. The differentials characteristics connected with the spermatogenesis and, mainly, with the heterochromatin amount, arrangement and bases chemistry nature and, too, with the number and position nucleolars corpuscles and variability localization of Nucleolars Organizers Regions (NORs), suggest that these structures had taken a important play role in the mechanisms that actuated in the evolution of subfamily Triatominae hematophagous species.

Key words: Cytogenetic; triatomines; holocentric chromosomes; heterochromatin; nucleolar organizers regions.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 03 de dezembro de 2001.

Graciela D. de C. Severi Aguiar

Graciela Dias de Campos Severi Aguiar



