

Alessandra Morielle

**Análise do Ciclo Nucleolar e da Estrutura
Cromossômica em Triatomíneos (Heteroptera,
Triatominae)**



1910001344



Alessandra Morielle

**Análise do Ciclo Nucleolar e da Estrutura
Cromossômica em Triatomíneos (Heteroptera,
Triatominae)**

**Tese apresentada para
obtenção do Título de Doutor
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP

UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Pós-Graduação em Genética

Alessandra Morielle

**Análise do Ciclo Nucleolar e da Estrutura Cromossômica
em Triatomíneos (Heteroptera, Triatominae)**



T. 1344/05

Tese apresentada para obtenção
do título de Doutor em Genética

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

São José do Rio Preto – SP

2004

20601000

576.3

M855a

04/03/2005

Doação

R\$ 27,00

Autor(a)

076/2005

58/05

Morielle, Alessandra.

Análise do ciclo nucleolar e da estrutura cromossômica em triatomíneos (Heteroptera, Triatominae) / Alessandra Morielle – São José do Rio Preto : [s.n.] , 2004

127 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira.

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

1. Heteroptera – Citologia - 2. Hemiptera – Citologia – 3. Triatomíneos - ciclo nucleolar. 4. Nucléolo. 5. Triatomíneos – estrutura cromossômica. 6. Cromossomos holocêntricos. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.3



Alessandra Morielle

Análise do Ciclo Nucleolar e da Estrutura Cromossômica em
Triatomíneos (Heteroptera, Triatominae)

Banca examinadora

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

2° Examinador:.....

3° Examinador:.....

4° Examinador:.....

5° Examinador:.....

São José do Rio Preto, ____/____/____.



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, com auxílio – bolsa FAPESP Processo nº 00/06700-4.



Sábios são aqueles que acumularam conhecimentos não somente através do estudo das ciências, mas também pela prática e pela observação.

Sabedoria é a soma de nossos conhecimentos coerentes obtidos em contato com os diversos acontecimentos da vida; não apenas o que foi adquirido pela instrução acadêmica, mas acima de tudo, pelas experimentações, vivências, atividades e realizações nas mais variadas áreas. Sensatez, prudência, desempenho e erudição são patrimônios intransferíveis da alma humana, alicerçados na intimidade do próprio ser.

HAMMED



Dedico aos meus pais Décio e Santa
que sempre se empenharam em fornecer aos filhos, o
maior patrimônio que um ser humano pode ter: o conhecimento

À técnica do Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, Klélia Aparecida de Carvalho pela atenção e disponibilidade prestadas na execução da técnica de hibridação *in situ*.

À técnica do Laboratório de Morfologia Rosana Silistino e ao técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise Luis Roberto Falleiros Júnior do IBILCE/UNESP, pela atenção, pela disponibilidade constante e pelo auxílio prestado durante as etapas de processamento do material para análise histológica e ultra-estrutural.

À Simone Carvalho Fernandes, secretária do Departamento de Biologia, pela disposição e constante dedicação no atendimento.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, Rosana M. G. Ferro, Edison Luis Pinceli, Nanci Q. A. Pereira, Rosemar R. C. Brena, Silvia E. Kazama pela atenção, pela dedicação e respeito dispensados aos alunos.

À todos os funcionários da Biblioteca, especialmente à Elza Mitiko Sato, pelo atendimento, pelo auxílio e pelos esclarecimentos prestados durante os anos de desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biologia Celular, Patrícia Ianella, Sandra, Alan, por todos esses anos de convivência, e em especial à Patrícia Martins Casseb Hassan, sempre disponível em auxiliar, Ana Carolina e José Eduardo, meus co-orientados, com os quais passei momentos agradáveis e promissores.

Aos meus amigos do Laboratório de Chiroptera, Karina, Paula, Maurício pela atenção e disposição em auxiliar e em especial à Sandra, pela atenção e amizade incondicional.



A todos os professores e companheiros da Pós-graduação, pelo apoio e convívio salutar.

Aos meus pais Santa e Décio, ao meu noivo Valtenir, aos meus irmãos Júnior, Eliana e Rosangela, aos meus sobrinhos e sobrinhas e aos meus familiares, que participaram, direta ou indiretamente, em todas as etapas deste trabalho, obrigado pela paciência constante e incentivos prestados.

À Deus, pela oportunidade.

...Deus é Deus de amor que nos deu o verbo

e nos ensina a falar,

que nos deu a boca

e nos ensina a cantar;

que nos deu o coração

e nos ensina a amar.

Francisco de Assis



Sumário

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1. Biologia, aspectos médico-sanitários e citogenética dos triatomíneos...	1
1.2. Aspectos ultra-estruturais do nucléolo.....	4
1.3. Tipos de nucléolos.....	5
1.4. Localização do DNAr e do RNAr.....	6
1.5. Proteínas nucleolares.....	9
1.6. O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular.....	11
1.7. Comportamento dos diferentes componentes nucleolares durante a mitose.....	14
1.7.1. Modelo proposto por Medina <i>et al.</i> (1995).....	14
1.7.2. Modelo proposto por Olson <i>et al.</i> (2000).....	16
1.8. Corpúsculos pré-nucleolares (PNBs- <i>prenucleolar bodies</i>).....	17
1.9. Aspectos gerais da diferenciação heterocromática.....	21
2. Objetivos.....	27
2.1. Justificativa.....	27
2.2. Objetivos gerais.....	27
3. Trabalhos.....	29
“Estudo do ciclo nucleolar e da distribuição do RNA na meiose de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)”.....	29
“Caracterização diferencial dos cromossomos holocêntricos em triatomíneos (Heteroptera, Triatominae)”.....	52
“Aspectos nucleolares na espermiogênese de triatomíneos (Heteroptera, Triatominae): análises citoquímica, histológica e ultra-estrutural”.....	80
4. Conclusões gerais.....	104
5. Referências bibliográficas.....	107
6. Apêndices.....	118



RESUMO

A proposta do presente trabalho foi analisar a estrutura e a natureza dos cromossomos holocêntricos e o comportamento do material nucleolar meiótico durante a espermatogênese de três espécies de triatomíneos (*Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*), por meio de técnicas citoquímicas, técnicas citogenéticas moleculares e ultra-estrutural. Os dados obtidos permitiram a diferenciação da estrutura química dos cromossomos nas três espécies analisadas tornando possível, também, localizar sítios ativos de DNAr nos cromossomos sexuais da espécie *R. pallescens* e em regiões dos autossomos nas espécies *P. megistus* e *T. infestans*, confirmando que esses cromossomos são portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Em todas as espécies estudadas foi observado o fenômeno da “persistência do material nucleolar”, observado na forma de corpúsculos pré-nucleolares (PNBs), fortemente corados, espalhados pelos núcleos, na prófase I inicial e nas placas metafásicas e anafásicas ou aderidos nos cromossomos em diacinese. A persistência do material nucleolar foi evidenciada, também, nas espermátides no início da espermiogênese como um corpúsculo ou halo corado por meio das técnicas citoquímicas e das análises ultra-estruturais. Portanto, os achados corroboram a hipótese para a reativação de genes para RNAr, que nesses Heteroptera está, provavelmente, relacionada com a diferenciação celular. As características diferenciais relacionadas à quantidade de heterocromatina, ao arranjo e à natureza química das bases, e, também à presença de corpúsculos nucleolares e à variabilidade da localização das RONs, sugerem que essas estruturas assumiram uma importante função nos mecanismos que atuaram na evolução desses importantes insetos hematófagos.

Palavras-chave: Ciclo nucleolar, Nucléolo, Triatomíneos, Estrutura cromossômica, Cromossomos holocêntricos, RON, PNB.

1. INTRODUÇÃO



1. Introdução

1.1. Biologia, aspectos médico – sanitários e citogenética dos triatomíneos

São pertencentes à subfamília Triatominae (Heteroptera – Reduviidae) 122 espécies de insetos hematófagos que são divididas em 5 tribos e 15 gêneros. Schofield (1994 *apud* Panzera *et al.*, 1996) lista 118 espécies de insetos da subfamília, as quais acrescentam-se agora *Belminus laportei* (Lent *et al.*, 1995), *Rhodnius stali* (Lent *et al.*, 1993), *Triatoma melanosoma* (Lent *et al.*, 1994) e *Triatoma gomeznunezi* (Martínez *et al.*, 1994).

Os triatomíneos são os vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, responsável pela moléstia conhecida como “doença de Chagas” (Lent & Wygodzinsky, 1979). Esses insetos são conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupanças” (Panzera *et al.*, 1992). Essa parasitose constitui, pela sua vasta distribuição, pelos altos índices de prevalência e pela gravidade de evolução, um dos maiores problemas de saúde pública em nosso país, bem como em vários países sul – americanos. Embora possa constituir um problema urbano, é endemia, principalmente rural, de transmissão essencialmente intradomiciliária (Pessoa & Martins, 1988).

O reconhecimento e a identificação dos triatomíneos é de grande importância em termos da epidemiologia da doença de Chagas, especialmente para a avaliação de uma região e para o estabelecimento de um plano de profilaxia.



Além da importância médico-sanitária desses hemípteros, vetores da doença de Chagas, é também notória a relevância citogenética, não só pelos aspectos ligados à procura do seu controle biológico, como por suas características citogenéticas incomuns, como a presença de cromossomos holocêntricos, onde o cinetócoro distribui-se ao longo dos cromossomos, e uma formação não usual na meiose, onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (Hughes-Schrader, 1961; De Vaio *et al.*, 1985).

Uma outra característica marcante dos triatomíneos refere-se à prófase da primeira divisão meiótica, que não apresenta as subfases características distintas (leptóteno, zigóteno, paquíteno). Esses estádios são denominados conjuntamente de “estádio difuso ou confuso” e a estrutura do núcleo parece ser interfásica, sendo visíveis apenas o nucléolo e os cromossomos sexuais heteropicnóticos. A distinção começa a ocorrer a partir do diplóteno e da diacinese.

Em machos de triatomíneos o número cromossômico diplóide estende-se de 21 a 25, sendo que o número cromossômico típico da subfamília Triatominae é $2n=22$, tendo o macho um complemento cromossômico $20A+XY$. A variação no número diplóide seria explicada pelos mecanismos dos cromossomos sexuais, que, em machos de triatomíneos, apresentam variação de XY , X_1X_2Y a $X_1X_2X_3Y$. Sugere-se que a fragmentação dos cromossomos autossômicos e/ou sexuais tenha sido a principal fonte de cromossomos sexuais múltiplos em Heteroptera (Schrader, 1947; Ueshima, 1966; White, 1973; Panzera *et al.*, 1996).



A maioria dos resultados citogenéticos sobre triatomíneos foi obtida com base na investigação cromossômica comparativa, por meio de colorações convencionais, que forneceram as primeiras evidências dos processos cromossômicos que aconteceram durante a evolução desses insetos. Excetuando-se alguns trabalhos que mostraram associações do nucléolo com massas heterocromáticas, em núcleos de células somáticas e em células meióticas de algumas espécies de triatomíneos, pouco se conhece até agora a respeito da localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) nos cromossomos holocêntricos, sobre a estrutura dos nucléolos e sobre o comportamento e organização do DNA altamente repetido desses cromossomos (Azeredo-Oliveira & Mello, 1986; Mello & Recco-Pimentel, 1987; Azeredo-Oliveira, 1990; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2004).

O estudo da biologia destacando, principalmente, o ciclo, a distinção entre espécies silvestres e domiciliares, e, ainda, o entendimento das inter-relações evolutivas entre espécies e gêneros, obtido por meio de dados citogenéticos, pode otimizar o controle desses insetos vetores da doença de Chagas. A citogenética também tem demonstrado ser apropriada para diferenciar espécies de triatomíneos, inclusive quando se trata de espécies morfologicamente similares (Hughes-Schrader & Schrader, 1961; Schreiber *et al.*, 1967; 1975, 1977; Panzera *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1992).



1.2. Aspectos ultra-estruturais do nucléolo

O nucléolo observado ao microscópio eletrônico de transmissão, geralmente, apresenta três domínios nucleolares maiores: os Centros Fibrilares (CFs), o Componente Fibrilar Denso (CFD) e os Componentes Granulares (CGs) (Zatsepina *et al.*, 1997). Tradicionalmente, os CFs são considerados como sítios de armazenamento de genes ribossômicos não transcritos, o CFD é um sítio de transcrição desses genes e os CGs, são os sítios de maturação e armazenagem das subunidades ribossômicas. Entretanto, a localização dos sítios de transcrição é ainda controverso. Os autores divergem sobre essa localização: nos CFs; no limite entre CFs e CFD; ou somente, no CFD (Fischer *et al.*, 1991; Casseb-Hassan & Azeredo-Oliveira, 1999).

Contudo, durante a nucleologênese, esses domínios desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular. O nucléolo pode apresentar diferentes formas e organizações desses domínios, dependendo do tipo celular e das condições metabólicas da célula, que variam também conforme a espécie e, dentro de uma espécie, de tecido para tecido e mesmo de célula para célula (Ploton *et al.*, 1987; Zatsepina *et al.*, 1997; Mello, 2001).

Em células com alto grau de produção de ribossomos, os nucléolos são grandes e complexos, entretanto, em células com baixa atividade, geralmente, são pequenos e possuem uma estrutura mais simples. Porém, os três componentes estruturais específicos são encontrados na maioria dos nucléolos (Casseb-Hassan & Azeredo-Oliveira, 1999).



1.3. Tipos de Nucléolos

Como o arranjo dos componentes nucleolares varia conforme o tipo celular, algumas categorias de nucléolos foram estabelecidas de acordo com a distribuição das estruturas ribonucleoprotéicas (RNPs): o nucléolo reticulado, com nucleolonema; o nucléolo compacto e o nucléolo com camadas concêntricas (Thiry & Goessens, 1996; Mello, 2001).

No nucléolo reticulado, o CFD e o CG formam uma estrutura filamentosa trabeculada, o nucleolonema. Nesse tipo de nucléolo são encontrados elementos granulares de ribonucleoproteínas (RNPs), além de elementos fibrilares e áreas de baixa densidade, com tamanhos variados e aparentemente incluídas dentro da massa nucleolar de RNPs. Essas áreas, às vezes referidas como vacúolos nucleolares, são de fato interstícios dentro do nucleolonema (Thiry & Goessens, 1996; Mello, 2001).

Os nucléolos compactos são caracterizados por uma distribuição uniforme das estruturas RNP e pela ausência de nucleolonema com interstícios, mas o CFD e o CG estão presentes. Portanto, nesse tipo de nucléolo os elementos se superpõem e se anastomosam numa massa única compacta. São observados, principalmente, em células em proliferação, podendo se tratar de uma primeira etapa de desenvolvimento de um nucléolo ou, mesmo, surgir em condições que resultem em inibição ou bloqueio de síntese de RNA nucleolar (Thiry & Goessens, 1996; Mello, 2001).

Nos nucléolos com camadas concêntricas a porção central é representada pelo elemento fibroso e a camada cortical periférica contém os



elementos granulares. Esse tipo de nucléolo é comum em oócitos de anfíbios. Nessas células, as duas camadas, central e cortical, podem ser muito bem discriminadas por meio de microscopia de luz (Mello, 2001). Ainda dentro desta classificação está incluído um subtipo de nucléolo, citado como “em forma de anel”, caracterizado por um anel periférico de estruturas que contêm RNA, rodeando uma área central destituída dessa estrutura. Esse nucléolo geralmente ocorre em células com uma baixa taxa de biogênese de ribossomos (Thiry & Goessens, 1996).

1.4. Localização do DNAr e do RNAr

A distribuição do DNA no nucléolo tem sido assunto de muitos estudos baseados na ampla variedade de experimentos acessíveis. Alguns estudos têm confirmado uma continuidade entre a cromatina perinucleolar condensada e os CFs. Estudos citoquímicos e imunocitoquímicos têm estabelecido claramente a presença de DNA nos CFs dos nucléolos de uma ampla variedade de células animais (Thiry & Goessens, 1996).

Por meio de técnicas de hibridação *in situ* e microscopia eletrônica de transmissão, aplicadas em vários tipos celulares humanos (linfócitos, células de Sertoli, espermatócitos, células HeLa), foi possível constatar que a maior parte do DNAr localiza-se no interior da região nucleolar ocupada pelo CFD e por filamentos de cromatina condensada. Em alguns casos foram observados sinais, de DNAr, também, no CG e na cromatina circundante (Schwarzacher & Wachtler, 1993).



Análises ultra-estruturais realizadas em uma grande variedade de células, pelo método da uridina tritiada, que torna os sítios de síntese de RNA visíveis por autoradiografia, indicaram ser o CFD o sítio mais provável da transcrição do DNA dentro do nucléolo. Foram encontradas marcações nos CFs somente quando eram realizadas prolongadas exposições autoradiográficas (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Estudos semelhantes realizados com a mesma metodologia mencionada têm demonstrado a presença de RNA no CFD e no CG do nucléolo (Thiry & Goessens, 1996).

O transcrito primário do RNAr 45S é processado originando a molécula maior de RNAr que, posteriormente, é combinada com RNAr 5S e proteínas para formar os pré-ribossomos. Dados a respeito da ordem desses processos podem ser obtidos por meio da localização de diferentes RNAs que se encontram dentro do nucléolo (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

Métodos citoquímicos utilizados para demonstração de RNA evidenciam, em geral, que a região do CF não se cora e os componentes ao seu redor encontram-se fortemente corados. Por meio da técnica de hibridação *in situ*, o RNAr foi evidenciado geralmente no CFD e nos CFs, sendo que nesses últimos as marcações foram restritas às regiões periféricas que rodeiam o CFD. Utilizando-se diferentes seções do gene repetido de RNAr como sonda de hibridação *in situ* DNA-RNA, foi possível evidenciar que o CFD contem os transcritos, inclusive o espaçador transcrito, ao passo que o CG contem os RNAr(s) maduros e, presumivelmente, a molécula processada intermediária (pré-

RNAr) (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1991; Thiry, 1992, Schwarzacher & Wachtler, 1993).

Portanto, as técnicas de hibridação indicam que a transcrição do DNAr ocorre no CFD ou muito próximo a ele, e, em nucléolos com vários e pequenos CFs, essa também ocorre nas regiões periféricas desses CFs. O transcrito primário é, em todos os eventos, rapidamente transportado ao CFD onde o processamento inicia-se. Os passos posteriores do processamento e a reunião de pré-ribossomos ocorrem dentro do CG (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

Nos humanos o RNAr transcrito a partir do DNAr consiste de um RNAr maior (RNA 18 S, 5,8 S e 28 S) sendo que os genes para esse RNAr estão localizados nos braços curtos dos cinco pares de cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22), formando uma constrição secundária característica em cada um desses cromossomos na metáfase. As regiões cromossômicas contendo esses *loci* são as RONS. Em cada RON muitas cópias do gene RNAr maior estão organizadas em *tandem*, mas há diferenças individuais no número de cópias por RON cromossômica. No total, cada genoma contém cerca de 300-400 cópias do gene RNAr (Fischer *et al.*, 1991; Schwarzacher & Wachtler, 1993).

Os genes RNAr 18 S, 5,8 S e 28 S estão sempre incluídos em um DNA repetido de 44 kb de tamanho. No entanto, somente um fragmento repetido de 13 kb é transcrito (unidade de transcrição). Deste modo as unidades de transcrição são separadas por grandes espaços não transcritos ou regiões intergênicas (IGR). A transcrição de uma unidade de transcrição de DNAr resulta em um transcrito RNAr 45S, que é novamente processado para formar os RNAr



finais maiores. Dentro das unidades de transcrição encontram-se as regiões espaçadoras (TS) que possuem espaçadores externos nos finais (ETS) e espaçadores internos (ITS) dentro da unidade (Schwarzacher & Wachtler, 1993). Em camundongos a região transcrita de DNAr é de aproximadamente 14 kb com espaçadores não transcritos cercado esta região (Fischer *et al.*, 1991).

Uma pequena molécula de RNAr 5 S, que é sintetizada fora do nucléolo, une-se ao RNA maior ainda durante a sua transcrição. Os genes RNAr 5S estão presentes em cópias múltiplas de, pelo menos, 180 por genoma. O tamanho do RNAr 5S repetido é de 2,2 kb somando-se os espaçadores não transcritos de tamanhos variados. Cerca de 90 cópias estão localizadas próximas ao telômero do braço longo do par de cromossomos 1; o restante encontra-se distribuído sobre outros cromossomos, com possíveis agrupamentos nos pares cromossômicos 9 e 16. Os sítios de genes RNAr 5S não participam da formação do nucléolo (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

1.5. Proteínas Nucleolares

A transcrição do DNAr, o processamento e a maturação do RNAr, a reunião e o transporte de partículas pré-ribossômicas são mediados por proteínas nucleolares específicas. As funções de algumas dessas proteínas são parcialmente conhecidas. Em alguns casos a localização diferencial dentro do nucléolo pode ser estabelecida, permitindo uma correlação entre os componentes nucleolares. A seguir, encontra-se a descrição de algumas proteínas nucleolares



referentes às funções, às características e à localização (Schwarzacher & Wachtler, 1993; Wachtler & Stahl, 1993).

(a) RNA polimerase I: essa enzima pode ser considerada como específica para a síntese de RNAr no nucléolo. É responsável pela transcrição de RNAr a partir de DNAr. Localiza-se no CF e CFD.

(b) DNA topoisomerases: a topoisomerase I é necessária para a descondensação do DNA no curso da transcrição. Não é específica para DNAr e é encontrada no nucleoplasma e no nucléolo. Dentro do nucléolo é localizada preferencialmente no CFD e nas regiões periféricas nos CFs. Uma das duas isoenzimas topoisomerase II (180 kDa), que é responsável também pela mudança de topologia da hélice de DNA, é encontrada somente no nucléolo, especificamente no CFD.

(c) Fibrilarina: é considerada um importante fator de processamento de RNAr. É uma proteína altamente conservada e encontrada em muitas espécies de animais e plantas. Geralmente é encontrada no CFD e, às vezes, também no CF e CG.

(d) Nucleolina (C23): está relacionada à transcrição de DNAr e ao processamento de RNAr regulando a taxa de produção de pré-ribossomos. Dentro do nucléolo localiza-se preferencialmente no CFD, mas certa quantidade é encontrada no CF e CG.

(e) Ribogranulina: essa proteína nucleolar de 52 kDa, assim como a fibrilarina, também é associada com U3 snRNA, importante para o processamento de RNAr. Localiza-se no CG do nucléolo e pode mediar, preferivelmente, estágios tardios da reunião de pré-ribossomos.



(f) Numatrina (B23): essa fosfoproteína é, presumivelmente, responsável pelos estágios tardios da reunião de pré-ribossomos. É encontrada associada com RNPs pré-ribossômicas maduras e está envolvida no transporte de pré-ribossomos para o citoplasma. Dentro do nucléolo localiza-se no CG, mas também em frações coradas pela prata que estão presentes nos CFs e no CFD.

(g) Proteínas nucleolares coradas pela prata (proteínas Ag-RONs): possuem um papel estrutural e associam-se com a cromatina intranucleolar dispersada. Provavelmente incluem vários dos fatores necessários para a transcrição do DNAr e, também, para o processamento inicial de RNAr. A sua presença na vizinhança das RONS, com baixa ou nenhuma atividade, pode ser interpretada no sentido que elas são retidas em um lugar adequado para qualquer ativação imediata da transcrição do RNAr e da biogênese ribossômica. Estudos de microscopia eletrônica de transmissão revelam que o CF e o CFD são responsáveis pela impregnação pelos íons prata em um grau variado. Outras análises indicam que o material prata positivo consiste de proteínas acídicas. Muitas das proteínas nucleolares aderem-se às RONS durante a mitose e são responsáveis pela impregnação pela prata dessas regiões em cromossomos mitóticos.

1.6. O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular

O núcleo das células eucarióticas está altamente organizado durante a intérfase. A cromatina correspondente aos cromossomos individuais ocupa áreas definidas, referidas como territórios cromossômicos, e a maquinaria que regula as funções nucleares como a transcrição, o processamento, a replicação



e o reparo, está localizada em sítios específicos que, possivelmente, determinam domínios no núcleo (Lamond & Earnshaw, 1998).

Um destes domínios corresponde ao nucléolo, que representa um modelo de domínio funcional envolvido no metabolismo do RNA. O comportamento do nucléolo durante a mitose e meiose e, especialmente, durante a nucleogênese, fornece oportunidade para se estudar as associações temporal e espacial que existem entre o DNA ribossômico (DNAr), o RNA ribossômico (RNAr) e as proteínas nucleolares específicas (Jiménez-García *et al.*, 1989).

Sabe-se que durante a mitose o núcleo celular é submetido à extensiva reorganização estrutural. A transcrição e o processamento de RNA cessam, o esqueleto nuclear despolimeriza-se, o DNA separa-se da matriz nuclear, a cromatina interfásica condensa-se em cromossomos, o envelope nuclear desorganiza-se e os componentes nucleares separam-se. Embora esteja estabelecido que o nucléolo desorganiza-se durante a prófase inicial, o destino de vários componentes nucleolares durante o ciclo mitótico está apenas começando a ser compreendido (Dundr *et al.*, 1997).

O nucléolo contém inúmeras cópias de genes para RNAr agrupadas em seqüências de DNAr altamente repetidas ou em tandem, que, por sua vez, estão contidas nos organizadores nucleolares. As Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) são sítios ou regiões cromossômicas que contêm os genes que codificam os RNAs, os quais são transcritos e, posteriormente, processados em pré-ribossomos no citoplasma. Portanto, o RNAr é transcrito a partir do DNAr presente nas RONs (Casseb-Hassan & Azeredo-Oliveira, 1999).



A localização dos componentes nucleolares durante a mitose parece ser altamente variável, sendo que cada componente retorna ao seu local de origem para a formação do nucléolo no próximo ciclo celular. No entanto, um padrão geral sugere que os componentes nucleolares agrupam-se em uma das seguintes classes de proteínas durante a mitose: uma classe de proteínas nucleolares que permanece associada com as RONS durante a mitose; um grupo de proteínas nucleolares que se localiza na periferia dos cromossomos, desde a prófase tardia até a telófase inicial, e um terceiro grupo de proteínas nucleolares e RNAs que estão uniformemente distribuídos no citoplasma durante a prófase e telófase (Ochs *et al.*, 1985; Fakan & Hernandez-Verdun, 1986; Fischer *et al.*, 1991; Wachtler & Stahl, 1993; Schwarzachner & Wachtler, 1993; González-García & Rufas, 1995, Dunder *et al.*, 1997).

Imediatamente após a segregação dos cromossomos na anáfase, a transcrição do DNA é reativada e os nucléolos gradualmente reorganizam-se. Essa reorganização inicia-se quando o material nucleolar, que aparece próximo e/ou sobre a superfície dos cromossomos, às vezes na forma de uma bainha pericromossomal, condensa-se ou reúne-se em estruturas denominadas “corpúsculos pré-nucleolares” (PNBs), os quais, subsequente, fundem-se nas RONS cromossômicas, na telófase e no início da interfase, fornecendo a base para a formação de nucléolos interfásicos maduros (Ochs *et al.*, 1985; Fakan & Hernandez-Verdun, 1986; Fischer *et al.*, 1991; Wachtler & Stahl, 1993; Schwarzachner & Wachtler, 1993; González-García & Rufas, 1995, Dunder *et al.*, 1997).



1.7. Comportamento dos diferentes componentes nucleolares durante a mitose

Há uma série de dados literários relacionados aos mecanismos de desorganização e reorganização nucleolar durante a mitose. Como a maioria dos dados refere-se aos mesmos aspectos, para uma melhor elucidação, foram abordados dois modelos que explicam detalhadamente esses mecanismos. Esses modelos foram propostos por diferentes grupos de pesquisadores e estão relacionados a seguir.

1.7.1. Modelo proposto por Medina *et al.* (1995)

Segundo Medina *et al.* (1995) os mecanismos moleculares que levam à desorganização nucleolar são conhecidos parcialmente. Durante a prófase mitótica, a desorganização do nucléolo é seguida da parada da atividade transcricional do DNAr, por consequência da fosforilação da proteína nucleolar 'nucleolina' pela proteína quinase cdc2, que induz a condensação da cromatina do DNAr. A retomada da síntese de pré-RNAr nas células filhas é necessária para a reunião dos corpúsculos nucleolares anteriormente formados nas RONS. Desse modo, o nucléolo é reorganizado a partir da retomada da síntese de moléculas pré-RNAr, na telófase.

Baseando-se nessa argumentação esses autores propuseram um modelo no qual o nucléolo é visto como uma reunião ordenada de complexos de transcrição, complexos de processamento e partículas pré-ribossômicas. No início da mitose, ambos os complexos são inativados e separados e, então, eles seguem



diferentes caminhos ao longo da mitose. Os complexos de transcrição são organizados em RONS mitóticas. Os complexos de processamento são transportados durante a mitose na forma de três possíveis estruturas diferentes: a bainha pericromossômica; os remanescentes nucleolares e, as estruturas dispersas pelo citoplasma. Essas três estruturas são precursores de corpúsculos pré-nucleolares (PNBs), que aparecem na telófase e reúnem-se nas RONS. A reativação dos complexos de transcrição e de processamento induz a ligação entre eles e, assim, ocorre a reconstrução do novo nucléolo. Esse modelo coincide com muitos dados literários para eucariotos superiores.

A seleção preferencial entre as três diferentes estruturas de complexos de processamento para a formação do novo nucléolo é uma característica típica de grupos taxonômicos ou tipos celulares. Por exemplo, os remanescentes nucleolares são preferencialmente usados por células CHO e a bainha pericromossômica por células HeLa. Segundo, ainda, Medina e colaboradores (1995), em células de raiz de cebola os três mecanismos estão presentes, a bainha pericromossômica parece ser mais freqüente sob determinadas condições fisiológicas e o remanescente nucleolar em células tratadas.

Uma importante proposta desse modelo é que a biogênese do ribossomo é retomada após a mitose em diferentes fases do processo, isto é, não somente por meio da transcrição, mas também por meio do processamento de moléculas de pré-RNAr, que foram transcritas durante as intérfases prévias e, em seguida, transportadas durante a mitose em formas incompletamente processadas que são incorporadas ao novo nucléolo e, depois, finalizam seu processamento.



1.7.2. Modelo proposto por Olson *et al.* (2000)

No modelo proposto por Olson *et al.* (2000) discute-se a formação do nucléolo na telófase mitótica. Nesse modelo o nucléolo desintegra-se no início da mitose, sendo que os componentes nucleolares são distribuídos para várias partes da célula, acumulando-se em grandes blocos no citoplasma (*nucleolus-derived foci* – NDF). O aparato transcricional permanece associado às RONS dos cromossomos, ao passo que os complexos de processamento aderem-se à periferia cromossômica ou permanecem dispersos na célula.

O modelo sugere que, durante a telófase, os corpúsculos pré-nucleolares (PNBs) são formados dos complexos de processamento, que são derivados de duas origens, isto é, da periferia dos cromossomos e do NDF. O NDF citoplasmático é dissociado em pequenas partículas, que são, eventualmente, importadas para dentro do núcleo. No início da formação do novo nucléolo pode ser observado um fluxo de pequenas partículas, provenientes da desagregação dos PNBs, em consequência da reativação da transcrição. Os cromossomos telofásicos estão em processo de descondensação e posicionados na superfície interna do envelope nuclear.

Esse modelo incorpora a transcrição como o principal passo na formação da estrutura nucleolar, há casos, porém, onde isto é uma exceção. Por exemplo, a transcrição de DNAr não é necessária para formar o nucléolo durante o desenvolvimento inicial de *Xenopus*, deste modo, o conceito de que o nucléolo “é formado pela ação de construção dos ribossomos” pode ser modificado.



1.8. Corpúsculos pré-nucleolares (PNBs – *prenucleolar bodies*)

Os corpúsculos pré-nucleolares (*prenucleolar bodies* – PNBs) têm sido descritos como estruturas fibrogranulares densas, de tamanho e morfologia variáveis, as quais contêm uma pequena fração de RNA e proteínas B23, C23, No38 que se destacam pela impregnação argêntica (Das & Alfert, 1973; Ochs *et al.*, 1985; Olson *et al.*, 2000; Flechon & Kopečný, 1998). Além dos PNBs, como já descrito neste capítulo, podem ser evidenciadas, grandes partículas citoplasmáticas denominadas de *nucleolus-derived foci* (NDF), em alguns tipos celulares. O NDF, além de conter componentes do processamento de pré-RNAs ribossômicos, possui, também, pré-RNAs parcialmente processados (uma mistura de pré-RNA 45S e 46S).

Há evidências também da presença de seqüências de pré-RNAr no nucléolo telofásico antes do início da transcrição da RNA polimerase I. Em alguns experimentos que utilizam a recuperação da fluorescência após *photobleaching* (FRAP), houve indicação de que os componentes do NDF e os PNBs retornam em razões quase idênticas, sugerindo que esses apresentam estruturas similares. Foi evidenciado, ainda, que seqüências do pré-RNAr estão presentes nos PNBs; como essas não são transcricionalmente ativas, provavelmente devem ser derivadas da célula maternal. Dessa forma, parece evidente que no núcleo telofásico os complexos de processamento, associados com pré-RNAr, participam da reorganização do nucléolo (Olson *et al.*, 2000).

De acordo com Phillips & Phillips (1973) a inibição da síntese de RNAr pré-mitótico não prejudica a formação de PNBs, no entanto, eles são



incapazes de fundir-se na RON e, portanto, o nucléolo não se reorganiza novamente.

No estudo realizado por Medina *et al.* (1995) foi possível mostrar que os PNBs contêm RNAr e, dessa forma, concluir que a síntese de RNAr e o processamento simultâneo dessa molécula são necessários para a organização pós-mitótica do nucléolo. A presença de moléculas de RNAr estáveis durante a mitose, totalmente transcritas mas incompletamente processadas, sugere que esse seja o ponto chave regulador no processamento do pré-RNAr, pois, quando um precursor pré-ribossômico estável intermediário é formado, o processo pode prosseguir ou parar.

Vários estudos têm procurado caracterizar os corpúsculos pré-nucleolares, uma vez que a persistência desses durante a mitose dá suporte a 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 esses corpos carregam um “primeiro” ou “novo material”, ou representem uma fonte de RNA nucleolar para as células filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (Mello, 1995).

Mello (1995) utilizando células mitóticas de mamíferos e, baseando-se no padrão metacromático das células devido à presença de RNA - proporcionado pela técnica variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) - observou que durante a prometáfase/metáfase inicial havia relocação de material nucleolar metacromático para as proximidades dos cromossomos que se "moviam" para a placa celular equatorial. Observou, também, além da presença



do revestimento cromossômico por uma fina camada de material metacromático, corpos pré-nucleolares metacromáticos que permaneciam nas extremidades da placa cromossômica, ou afastados dos cromossomos. Essa mesma situação foi verificada em fases subseqüentes 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 adquiria um formato de ampulheta.

Nesse estudo realizado por Mello (1995), os nucléolos em reorganização não foram vistos como corpos distintos durante a telófase tardia, mas na 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-RON positivas. Baseando-se nos vários aspectos observados a autora discute o fato de que normalmente o RNA responsável pela camada pericromossomal 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 nucleolar no padrão de metacromasia detectado.

O fenômeno da “persistência do material nucleolar”, já foi observado na espermatogênese de triatomíneos, insetos hematófagos vetores da doença de Chagas, por meio de técnicas citoquímicas como a impregnação por

íons prata e variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (variante da CEC) (Azeredo-Oliveira, 1990; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2000; 2001a-b; 2002, 2003, 2004; Severi-Aguiar *et al.*, 2002).

Azeredo-Oliveira (1990) encontrou nas células meióticas de *Triatoma vitticeps*, *T. pallidipennis*, *T. infestans* e *T. maculata*, corpos nucleolares deslocados em relação aos cromossomos, principalmente nas placas metafásicas da primeira divisão e, algumas vezes, na anáfase. Ainda em triatomíneos, Tartarotti & Azeredo-Oliveira (1999) estudando a meiose de duas espécies do gênero *Panstrongylus* - *P. herreri* e *P. megistus* -, por meio da técnica de impregnação pelos íons prata, observaram que o nucléolo, no decorrer do ciclo celular, mais precisamente, após a prófase I, rompia-se originando pequenos fragmentos e corpos nucleolares que permaneciam espalhados no interior celular até mesmo nos estádios mais avançados da divisão, como anáfase e telófase. Esse mesmo comportamento da atividade nucleolar foi semelhante na espermatogênese de seis espécies do gênero *Rhodnius* (*R. domesticus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. prolixus* e *R. robustus*) (Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2000; 2001a-b; 2002, 2003, 2004).

Durante a oogênese, o fenômeno da persistência do material nucleolar, foi observado em vegetais como *Vicia faba*, em invertebrados marinhos, como o equiuróide *Urechis caupo*, no plasmódio *Physarum policephalum*, em anfíbios, como o *Xenopus laevis*, e em embriões de mamíferos como ratos, camundongos, coelhos, eqüinos, bovinos e humanos (Das & Alfert,

1973; Tesarik *et al.*, 1986; Sato, 1988; Grøndahl *et al.*, 1996; Baran *et al.*, 1996; Verheggen *et al.*, 1998; Dundr *et al.*, 1997, 2000).

De modo geral, os corpúsculos encontrados durante a oogênese são similares aos corpúsculos nucleolares encontrados nas células mitóticas e espermatogênicas em relação à origem, estrutura e características citoquímicas e bioquímicas (Das & Alfert, 1973). É amplamente conhecido que os precursores nucleolares fornecem a base para a formação de nucléolos, no entanto, o seu papel preciso na nucleologênese e os mecanismos que governam a reorganização nucleolar, ainda geram discussão.

1.9. Aspectos gerais da diferenciação heterocromática

O termo heterocromatina, usado pela primeira vez por Heitz (1928) (*apud* John, 1988) foi proposto para definir, em termos morfológicos, a cromatina de regiões específicas de certos cromossomos, que permanece condensada (heteropicnótica) durante toda a intérfase, com uma afinidade tão intensa por corantes quanto aquela de cromossomos metafásicos. Esse comportamento se diferenciaria do observado na eucromatina (maioria da cromatina) que, após a divisão celular, torna-se mais descompactada e difusa (Mello, 2001).

Além das características estruturais, também as características fisiológicas, químicas e genéticas passaram a se somar para definir heterocromatina. Considera-se, portanto, que a heterocromatina corresponda à

cromatina condensada, com replicação mais lenta do DNA e certa inatividade gênica (Mello, 2001).

De acordo com Brown (1966) a heterocromatina pode ser classificada em constitutiva e facultativa. A heterocromatina constitutiva está localizada em posições idênticas nos cromossomos homólogos, possui replicação tardia em relação à eucromatina, apresenta-se condensada durante quase todo o ciclo celular e é composta por DNA altamente repetitivo (DNA satélite). A heterocromatina facultativa, atualmente denominada de “eucromatina heterocromatinizada facultativamente”, apresenta estados variados de condensação em diferentes tipos celulares ou em diferentes estágios do desenvolvimento, estando presente em apenas um dos cromossomos homólogos; seria mais um estado fisiológico reprimido do DNA numa região condensada da cromatina, podendo-se reverter ao estado não condensado (Verma, 1988; Pardue & Henning, 1990; Therman & Susman, 1993; Lewin, 1994; Clark & Wall, 1996; Mello, 1978, 1983, 2001).

À heterocromatina são atribuídas algumas funções, tais como: fonte para criação de novos genes; manutenção dos cromossomos; reconhecimento dos cromossomos no pareamento de homólogos e de cromossomos não-homólogos na meiose; regulação da recombinação e segregação e, também, recuperação da estabilidade telomérica após fissão cêntrica (John, 1988; Imai *et al.*, 1988).

As principais características da heterocromatina constitutiva são sua universalidade, diversidade e variabilidade. A heterocromatina é



universal, pois apresenta ampla distribuição em plantas e animais. Apresenta diversidade devida às diferenças em termos de composição de bases de seu DNA e mostra variabilidade relacionada às mudanças na quantidade de heterocromatina no cariótipo, isto é, sua variação em cromossomos homólogos (Sumner, 1990).

Embora todos os cromossomos, na maioria dos eucariotos, tenham alguma heterocromatina, sua propriedade de coloração e a natureza do DNA que contem, variam extensivamente dentro e entre espécies e, em geral, blocos de heterocromatina são heteromórficos para tamanho, e, algumas vezes, para propriedades de coloração (Sumner, 1990).

A distribuição da heterocromatina constitutiva varia conforme o organismo, podendo ocupar praticamente toda a extensão de um cromossomo, como são os casos clássicos do cromossomo Y de *Drosophila* e de um dos cromossomos X dos mamíferos placentários XX. Em outros casos, pode-se restringir à proximidade do centrômero (heterocromatina centromérica ou pericentromérica) e/ou às extremidades de um ou mais cromossomos (heterocromatina telomérica); à região intersticial (heterocromatina intersticial) e/ou à vizinhança de Regiões Organizadoras Nucleolares (heterocromatina associada ao nucléolo) (Mello, 1978).

Sabe-se que, na maioria dos heterópteros, as bandas C positivas têm sido localizadas, principalmente, nas regiões teloméricas e subteloméricas, mas também nas porções intersticiais dos cromossomos (Papeschi, 1995).

Diferenças entre espécies, na quantidade e posição da heterocromatina, são muito comuns. Espécies proximamente relacionadas podem



diferir no número de bandas C positivas, tanto na sua localização quanto na quantidade de heterocromatina (Sumner, 1990).

Algumas espécies apresentam uma grande variação no conteúdo de heterocromatina constitutiva de indivíduo para indivíduo, e essa variação pode ser importante no processo de especiação (Clark & Wall, 1996).

A heterocromatina constitutiva nos Coleoptera localiza-se, preferencialmente, na região centromérica, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e teloméricas, porém com menor frequência. Nos cromossomos sexuais, a heterocromatina constitutiva tem ocorrência variável, podendo aparecer somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica da espécie (Almeida, 1996).

Atualmente são conhecidas inúmeras técnicas que diferenciam regiões heterocromáticas em células interfásicas e em cromossomos metafásicos. A mais simples é a técnica de obtenção de bandas C, descrita por Sumner (1972), a qual detecta somente heterocromatina constitutiva. Existem outras técnicas para se obter bandas diferenciais em cromossomos metafásicos, como por exemplo, a utilização de endonucleases de restrição, a obtenção de bandas R, e, mais recentemente, as técnicas onde se utilizam corantes fluorescentes, ou fluorocromos, e a técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sondas específicas (Sato, 1980; John, 1988; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; 2000; Vanzela & Guerra, 2000; Parise-Maltempi & Avancini, 2001; Severi-Aguiar, 2001; Maffei *et*



al., 2001; Vitturi *et al.*, 2002; Mampumbu, 2002; Rocha *et al.*, 2002, 2003; Leite-Silva *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2003; Swarca *et al.*, 2003).

Na maioria dos estudos em insetos, os fluorocromos com especificidade de bases estão sendo amplamente utilizados para detectar determinadas regiões cromossômicas e, em muitos casos, são empregados em combinação com outro corante. As bandas obtidas com os fluorocromos mostram padrões heterocromáticos fluorescentes. Os fluorocromos podem ter especificidade de bases para seqüências ricas em regiões AT (Quinacrina, Hoechst 33258, DAPI) ou ricas em regiões CG (Cromomicina A₃ (CMA₃) e Mitramicina) e, dependendo de suas especificidades, produzem padrões similares aos das técnicas de obtenção de bandas convencionais (C, R, Q) (Sato, 1980; John, 1988; Sumner, 1990; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; 2000; Vanzela & Guerra, 2000; Parise-Maltempo & Avancini, 2001; Severi-Aguiar, 2001; Maffei *et al.*, 2001; Vitturi *et al.*, 2002; Mampumbu, 2002; Rocha *et al.*, 2002, 2003; Leite-Silva *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2003; Swarca *et al.*, 2003).

A técnica de hibridação *in situ* (FISH) também vem sendo amplamente utilizada para detectar seqüências específicas e repetidas presentes no ácido nucléico (DNA) que constitui os cromossomos, por meio de uma sonda marcada com biotina ou digoxigenina (fluorescentes). A hibridação *in situ* de seqüências de nucleotídeos é um procedimento bem estabelecido para cromossomos politênicos, mitóticos e meióticos e, também, para núcleos interfásicos de insetos. Atualmente, essa técnica vem sendo utilizada em estudos evolutivos de diferentes espécies de organismos fornecendo importantes



informações, como a conservação de genes em grupos de espécies próximas (Whiting *et al.*, 1987, 1989; Schmidt *et al.*, 1988).

Nota: Parte desta introdução (itens 1.2 a 1.8) constituiu uma monografia sobre “O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular” apresentada, para a banca do exame geral de qualificação ao doutorado, e que, posteriormente, será submetida à publicação, como trabalho de revisão, em revista especializada.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular, 23p. 2004 (a ser submetido).



2. Objetivos

2.1. Justificativa

Atualmente muito pouco é conhecido a respeito da localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) e da distribuição da heterocromatina nos cromossomos holocêntricos, inclusive sobre a organização do DNA altamente repetido desses cromossomos. Também é notória a escassez de dados sobre o comportamento nucleolar e a estrutura dos nucléolos, assim como sobre os aspectos relacionados à reativação pós-meiótica dos genes para RNA ribossômico em triatomíneos. Portanto, para complementar esses aspectos foi proposto no presente trabalho, um estudo das células espermatogênicas de triatomíneos pertencentes a três gêneros distintos - *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* - com ênfase à estrutura cromossômica e à atividade e ao comportamento das estruturas nucleolares.

2.2. Objetivos Gerais

- a. Acompanhar o ciclo nucleolar, a distribuição do RNA ribossômico e das proteínas nucleolares durante a espermatogênese de triatomíneos;
- b. analisar o padrão diferencial da distribuição heterocromática e as associações específicas entre as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) e os sítios de DNA ribossômico (28S) nas células das diversas fases da meiose, por meio de



técnicas citoquímicas, de citogenética molecular e hibridação *in situ* fluorescente (FISH);

- c. estudar comparativamente os aspectos nucleolares durante a espermiogênese de três espécies de triatomíneos, por meio de análises ultra-estruturais.



3. TRABALHOS

TRABALHO I



**Estudo do ciclo nucleolar e da distribuição do RNA na meiose de
triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)**

**Cycle nucleolar and RNA distribution study in triatomines meiosis
(Triatominae, Heteroptera)**

Alessandra Morielle e Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira

*Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, UNESP,
São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.*

**Este trabalho será submetido para publicação na revista *Acta Histochem.
Cytochem.***



RESUMO

A proposta desse trabalho foi estudar aspectos da atividade nucleolar durante a espermatogênese de três espécies de triatomíneos (*Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*), por meio de técnicas citoquímicas e com coloração fluorescente. Os túbulos testiculares foram preparados citologicamente por espalhamento com, subsequente, aplicação das técnicas citogenéticas de colorações: azul de toluidina (AT), variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC), impregnação pelos íons prata e fluorocromo alaranjado de acridina. Os dados obtidos mostraram que o DNA e RNA corados com AT apresentaram-se metacromáticos. Na técnica variante da CEC, o DNA corou-se em verde, indicando abolição da metacromasia, e o RNA permaneceu metacromático. Essa técnica permitiu discriminar o RNAr fornecendo detalhes estruturais do nucléolo e da distribuição do RNA durante a divisão celular meiótica. Por meio da coloração pelo fluorocromo alaranjado de acridina foi possível diferenciar os ácidos nucléicos, nas três espécies analisadas: DNA, em verde ou amarelo, e o RNA em vermelho. Por meio da técnica de impregnação pelos íons prata foram observados corpúsculos pré-nucleolares (PNBs), fortemente corados, espalhados pelo interior dos núcleos em prófase I inicial e próximo às placas metafásicas e anafásicas, ou aderidos aos cromossomos em diacinese. As espermátides, em início de diferenciação, apresentaram um único corpúsculo fortemente corado por íons prata ou um halo metacromático (técnica variante de CEC) ou um halo vermelho (fluorocromo alaranjado de acridina). Os estudos corroboram o fenômeno conhecido como “persistência do material nucleolar” e a hipótese da reativação pós-meiótica para genes RNAr. As Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) foram observadas em alguns cromossomos metafásicos espermátogoniais das espécies *P. megistus* e *T. infestans*. Na espécie *P. megistus*, nas fases diplóteno-diacinese, também foram detectadas RONs em um cromossomo sexual e em um autossomo. Desse modo pode ser inferido que, em triatomíneos, o nucléolo não desaparece totalmente, mas permanece como pequenos corpúsculos que se reúnem para formar o próximo ciclo nucleolar o qual, no caso da meiose, será completado se ocorrer a fertilização e a formação de um zigoto.

Palavras-chaves: Ciclo nucleolar, nucléolo, RON, PNB, triatomíneos.



ABSTRACT

The purpose of this present work was to study aspects of the nucleolar activity during spermatogenesis of three triatomine species (*Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* and *Triatoma infestans*), with cytochemical techniques and fluorescent staining. The testicular tubules were prepared for spreading and, subsequently, application of cytogenetic staining techniques: toluidine blue (TB), a variant of the Critical Eletrolyte Concentration method (CEC), silver ion impregnation and acridine orange fluorochrome. The data obtained showed that DNA and RNA, stained with TB, presented metachromasy, and with the modified CEC technique the DNA stained in green, indicating abolition of metachromasy while the RNA remains metachromatic. These techniques allow the identification the rRNA, providing structural details of the nucleolus and of the RNA distribuition during the meiotic cell division. The fluorochrome acridine orange staining differentiated the two nucleic acids, in the three species analysed: DNA in green or yellow, and RNA in red. With the silver ion impregnation technique pre-nucleolar corpuscles (PNBs) were strongly stained, scattered in interior of the nucleus in initial prophase I and on metaphasic and anaphasic plates or adhering to chromosomes in diakinesis. The spermatids in early differentiation showed a single body strongly stained by silver ions, a metachromatic halo (tecniue of the CEC) or a red halo (fluorochrome acridine orange). The results, to corroborate the concept of "persistence of the nucleolar material" and the hypothesis of the post-meiotic reactivation of the genes for rRNA. The Nucleolar Organizer Regions (NORs) were observed in some spermatogonial metaphases chromosomes of the species *P. megistus* and *T. infestans*. For the species *P. megistus* in phases dyplotene-diakinesis NORs were also detected in one sex and one autosomal chromosome. Thus, its may be inferred that, in triatomines, the nucleolus does not completely disappear but remains as small corpuscles that reunite to form the next nucleolar cycle which, in the case of meiosis, will be completed if there is fertilization and the formation of a zygote.

Key-words: Nucleolar cycle, nucleolus, NOR, PNB, triatomines.



Introdução

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

A formação do nucléolo é um processo dinâmico no desenvolvimento da vida da célula, sendo denominado nucleologênese. O nucléolo, observado ao microscópio eletrônico de transmissão, geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG) (*pars granulosa*), contudo, em ciclos celulares de plantas e animais, durante a nucleologênese esses domínios desorganizam-se e reorganizam-se (Ochs *et al.*, 1985; Fakan & Hernandez-Verdun, 1986; Schwarzach & Wachtler, 1993; Wachtler & Stahl, 1993; Medina *et al.*, 1995; Dundr *et al.*, 1997; Zatsepina *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2000).

O fenômeno da presença do nucléolo ao longo da divisão celular, conhecido como “persistência do material nucleolar”, já foi observado nos dinoflagelados e em células malignas de mamíferos, na forma de corpúsculos pré-nucleolares (PNBs). Essa persistência dos PNBs, durante a mitose e meiose, oferece suporte à idéia de que o material nucleolar não se rompe completamente durante as fases de metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro. Pode ser hipotetizado que esses corpos carregam um material “primário” ou “novo” ou, ainda, representem uma fonte de RNA nucleolar para as

células filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (Wachtler & Stahl, 1993; Mello, 1995).

Vários estudos têm procurado caracterizar esses corpúsculos pré-nucleolares. Os PNBs têm sido descritos como estruturas fibrogranulares densas de tamanho e morfologia variáveis, as quais contêm RNA e proteínas ácidas (B23, C23, No38) e que se destacam pela impregnação argêntica (Ochs *et al.*, 1985; Flechon & Kopecny, 1998).

De acordo com Medina *et al.* (1995), os mecanismos moleculares que levam à desorganização e à organização nucleolar são conhecidos parcialmente. Durante a prófase mitótica, a desorganização do nucléolo é seguida pela parada da atividade transcricional do DNAr e pela fosforilação da proteína nucleolar nucleolina (C23), promovida pela proteína quinase cdc2, que induz a condensação da cromatina do DNAr. Segundo esses mesmos autores, durante a telófase, a retomada da síntese de pré-RNAr nas células-filhas é necessária para a reunião dos PNBs anteriormente formados nas Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), assim, o nucléolo é reorganizado.

Os estudos sobre a nucleologênese em insetos são escassos, principalmente durante a meiose. Em triatomíneos, insetos hematófagos - vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas -, excetuando-se alguns trabalhos que mostraram associações do nucléolo com massas heterocromáticas, em núcleos de células somáticas e em células meióticas de algumas espécies, pouco se conhece até agora sobre a localização das RONs nos seus cromossomos holocêntricos e sobre a estrutura dos nucléolos (Azeredo-

Oliveira & Mello, 1986; Mello & Recco-Pimentel, 1987; Azeredo-Oliveira, 1990; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999, Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2004).

No entanto, a maioria dos dados citogenéticos obtidos em estudos com triatomíneos foram baseados em investigações comparativas apenas por meio de métodos de colorações convencionais. Dessa forma, a proposta do presente trabalho foi estudar alguns aspectos da atividade nucleolar, utilizando-se reações específicas para acompanhar a distribuição do RNA e das proteínas nucleolares, em células dos túbulos seminíferos de insetos adultos pertencentes a espécies de três gêneros de triatomíneos (*Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*).

Material e Método

As espécies analisadas foram *Panstrongylus megistus* ($2n=18+X_1X_2Y$), *Rhodnius pallescens* ($2n=20+XY$) e *Triatoma infestans* ($2n=20+XY$), pertencentes à ordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Os exemplares foram fornecidos pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, (São Paulo – SP - Brasil). Após o espalhamento e a fixação dos túbulos seminíferos (Imai *et al.*, 1988), as lâminas foram submetidas às seguintes técnicas de colorações*: Azul de Toluidina a 0,025%, em tampão McIlvaine pH 4.0; variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (Mello, 1995); coloração pelo fluorocromo alaranjado de acridina (Abrams *et al.*,

* Os protocolos detalhados das técnicas estão apresentados no Apêndice I (itens: 1 e 2).



1993) e impregnação pelos íons prata (Howell e Black, 1980). As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se os microscópios Zeiss-Jenaval, para a análise das técnicas citoquímicas, e Zeiss-Axioskop, para a técnica de citogenética molecular (fluorocromo).

Resultados

Azul de Toluidina (AT)

A coloração com Azul de Toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0, foi utilizada como controle da técnica variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC). Pode-se observar que a metacromasia não foi abolida quando as células foram submetidas a essa coloração controle, pois, os cromossomos e as áreas citoplasmáticas encontram-se corados com a mesma tonalidade (azul) (Figs. 1a,g,l).

Variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC)

As células dos túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*, apresentaram metacromasia dos RNAs nucleolar e citoplasmático em várias fases da espermatogênese (Figs. 1a-p).

Os cromossomos das metáfases espermatogoniais, das metáfases de primeira, e segunda divisões meióticas e da anáfase e telófase meióticas, apresentaram-se, com abolição da metacromasia, exibindo uma coloração esverdeada, sendo distintos do RNA citoplasmático, visualizado em azul ou violeta (Figs. 1b,d,e,h,j,n,o).



Os núcleos em prófase meiótica I, nas três espécies analisadas, mostraram um nucléolo evidente e, em algumas circunstâncias, um corpúsculo nucleolar também foi evidenciado. A cromatina apresentou-se levemente esverdeada e o RNA citoplasmático em azul ou violeta (Figs. 1c,i,m).

As espermatídes iniciais, das três espécies analisadas, apresentaram-se caracterizadas pela presença de um bloco ou halo metacromático, indicativo de RNAr pós-meiótico, identificado pela coloração azul ou violeta. Nessas células a cromatina também apresentou-se esverdeada e o RNA citoplasmático violeta (Figs. 1f,k,p).

Alaranjado de acridina

Os núcleos em início da prófase meiótica I, na espécie *P. megistus* e, também, em “estádio difuso”, na espécie *R. pallescens*, apresentaram uma região nucleolar bem definida, emitindo fluorescência em vermelho, e, próxima a essa, pode-se evidenciar três corpúsculos heterocromáticos destacados em amarelo. A espécie *T. infestans* apresentou núcleos com uma região maior corada em amarelo, em alguns desses pode-se observar pequenas marcações fluorescentes mais condensadas dispersas pela cromatina esverdeada. Pode ser constatado, ainda, o citoplasma corado em vermelho ao redor dos núcleos (Figs. 2a,d,h).

As metáfases de primeira divisão meiótica, nas três espécies analisadas, mostraram um padrão de coloração semelhante, ou seja, os



cromossomos condensados corados em amarelo e o citoplasma em vermelho (Figs. 2b,e,i).

As espermatídes, em início de espermiogênese, também nas três espécies, apresentaram a cromatina compactada em tons verde/amarelo e a região nucleolar em vermelho (Figs. 2c,g,j).

Impregnação pelos íons prata

As metáfases espermatogoniais, das espécies *P. megistus* e *T. infestans*, tiveram alguns cromossomos impregnados pelos íons prata, sugerindo serem esses os portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) (Figs. 3a,k).

Os núcleos em início da prófase meiótica I (*P. megistus* e *T. infestans*) e durante o “estádio difuso” (*R. pallescens*) apresentaram corpúsculos fragmentados impregnados pelos íons prata, distribuídos aleatoriamente e localizados no interior da região nucleolar, respectivamente (Figs. 3b,f,l). Nos núcleos em diplóteno-diacinese da espécie *P. megistus* são observadas RONs em um cromossomo autossomo e em um dos sexuais (Fig. 3c) e, na espécie *T. infestans*, estes corpúsculos apresentam-se localizados na periferia de vários cromossomos (Fig. 3m).

As células metafásicas de primeira e segunda divisões meióticas (*R. pallescens* e *T. infestans*) e as telófases meióticas (*P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans*) apresentaram corpúsculos nucleolares fortemente impregnados pelos íons prata. Na espécie *R. pallescens* foi possível evidenciar,

também, a impregnação pelos íons prata nos cromossomos sexuais durante a metáfase II (Figs. 3d,g,h,i,n,o).

Nas espermátides iniciais, das três espécies analisadas, foi evidenciado um corpúsculo impregnado pelos íons prata (Figs. 3e,j,p).

Discussão

Com base nos resultados obtidos foi possível analisar, durante o ciclo celular meiótico de três espécies de triatomíneos, pertencentes a três gêneros distintos *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* o comportamento do material nucleolar, acompanhando a distribuição e localização do DNA, dos complexos RNAr/proteínas (ribonucleoproteínas-RNPs) e das proteínas nucleolares.

Citoquimicamente o DNA e o RNA puderam ser visualizados por métodos de basofilia, como o Azul de Toluidina (AT), a pH 4,0 e de fluorescência, como o alaranjado de acridina. As proteínas nucleolares foram detectadas pelo método clássico de impregnação argêntica (Howell & Black, 1980; Vidal & Mello, 1987; Mello, 1997).

Um dos métodos, no qual se utiliza o AT, é a variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC). Os princípios dessa técnica utilizada no presente trabalho relacionam-se às propriedades de basofilia e metacromasia do AT, que é um corante catiônico, cujas moléculas planares ligam-se eletrostaticamente aos grupos fosfatos livres (aniônicos) dos ácidos nucléicos, isto é, DNA e RNA, empilhando-se entre as bases. Quanto maior a proximidade e

o empilhamento dessas moléculas (formando dímeros, trímeros e tetrâmeros), maior será a interação de seus elétrons, provocando a metacromasia, visualizada em tonalidades azul ou violeta. Quando ocorre a abolição da metacromasia, a cor exibida será verde, o que corresponde ao ponto de CEC (Vidal & Mello, 1989). Nessa técnica o material foi corado com AT e, posteriormente, tratado com cloreto de magnésio, cujos cátions inorgânicos (Mg^{+2}) funcionam como extratores das moléculas de AT. Sob essas condições, e como o ponto de CEC do RNA é sempre maior que o do DNA, enquanto o DNA cora-se em verde, o RNA permanece metacromático, permitindo a discriminação diferencial do RNAr, a localização e a evidência de detalhes supra-estruturais dos nucléolos e o acompanhamento do RNA durante a divisão celular (Mello, 1995).

No presente estudo, a metacromasia foi abolida da cromatina dos núcleos em prófase meiótica I e dos cromossomos durante as divisões celulares (metáfases espermatogoniais, metáfases I, anáfase e telófase) das espécies *P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans*, dessa forma, essas estruturas foram observadas em tonalidades esverdeadas. No citoplasma, pode ser observada a presença dos complexos RNA/proteínas (RNAs citoplasmáticos) em tonalidade violeta, cuja metacromasia apresentou-se variável de acordo com a fase de divisão celular e a espécie. Os núcleos, em prófase meiótica I, apresentaram um grande nucléolo e intensa metacromasia citoplasmática, indicando um maior metabolismo que se reflete na alta taxa de síntese protéica nesta fase celular. Pode ser observado, também, a presença de corpúsculos nucleolares metacromáticos extras, no interior desses núcleos, nas espécies *P. megistus* e *T. infestans*.

Outra técnica, utilizada no presente estudo, também para diferenciar DNA e RNA, foi o fluorocromo alaranjado de acridina, que emite fluorescências de diferentes cores para os ácidos nucléicos. Esse corante liga-se ao DNA de fita simples como um monômero, emitindo fluorescência verde/amarela sob excitação de $\lambda = 520$ nm, e, liga-se ao DNA de fita simples ou ao RNA como um dímero, emitindo fluorescência vermelha sob excitação de $\lambda = 650$ nm (Nicoletti & Mannuci, 2002; Berg, 2002). Dessa forma, essa coloração diferencial dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) permitiu localizar a distribuição dessas moléculas nas células dos túbulos seminíferos das três espécies de triatomíneos. Os resultados obtidos mostraram-se consistentes e confirmaram os dados obtidos anteriormente por meio da variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC), específica para a observação do material nucleolar, principalmente a distribuição do RNA ribossômico.

Quanto a técnica de impregnação por íons prata, que é um dos métodos mais clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) (nos cromossomos metafásicos) e de marcação nucleolar (nos núcleos interfásicos), achados citoquímicos descrevem duas proteínas nucleolares reduzidas por íons prata: a C23 (nucleolina) e B23 (numatrina). Dessas proteínas, somente a C23 está associada com o DNA, sugerindo ser a “verdadeira proteína Ag-RON”. O padrão de marcação por íons prata, sugere que essas duas proteínas ácidas são responsáveis pela impregnação nucleolar; a C23 indica a presença da cromatina descondensada ligada à RON, enquanto que a B23,



indica a localização dos precursores ribossomais (Ochs & Busch, 1984; Casseb-Hassan & Azeredo-Oliveira, 1999).

No presente trabalho a técnica de impregnação por íons prata mostrou um padrão similar de impregnação do material nucleolar em *P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans*. Nessas três espécies, os núcleos em prófase meiótica I apresentam corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata. Esses corpúsculos, no entanto, apresentam-se em tamanhos e em quantidades diferentes, dependendo da espécie.

Pode ser observada, nos núcleos em prófase meiótica I e, em diplóteno-diacinese, das espécies *T. infestans* e *P. megistus*, a presença de pequenos corpúsculos que se apresentam dispersos pelo núcleo. Esses corpúsculos podem ser um indício da reorganização nucleolar que ocorre durante o ciclo celular. Nas espécies *P. megistus* e *T. infestans* são observadas nitidamente, nas metáfases espermatogoniais, pequenas impregnações pelos íons prata em alguns cromossomos portadores das RONS.

No núcleo em diplóteno-diacinese da espécie *P. megistus* nota-se a impregnação de uma pequena região de um cromossomo autossomo e a completa marcação de um dos sexuais, possivelmente um dos X, sugerindo serem esses cromossomos os portadores das RONS nesta espécie. Também na espécie *R. pallescens*, na metáfase II, a marcação ocorreu nos cromossomos sexuais, o que indica serem esses cromossomos os portadores das RONS.

Um aspecto que chama a atenção é a presença - nas células das três espécies - de corpúsculos fortemente impregnados pelos íons prata, a partir



das metáfases da primeira divisão meiótica até as telófases. Provavelmente, esses corpúsculos correspondam aos PNBs, estruturas altamente argirófilas que podem representar a reunião de fragmentos nucleolares que, em fases anteriores, apareciam dispersos nos núcleos das células. Isto pode ser observado nas espécies *T. infestans* e *P. megistus*, as quais apresentaram fragmentos nucleolares dispersos nos núcleos em prófase meiótica I e diacinese. A presença dos PNBs já foi relatada em células meióticas de outras espécies de triatomíneos estudadas (Azeredo-Oliveira, 1990; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; Severi-Aguiar, 2001; Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2004), também em outras espécies de heterópteros e em ortópteros (Santos *et al.*, 1987; Cattani & Papeschi, 2002).

Um outro achado e de extrema importância, são as marcações argirófilas encontradas nas espermátides iniciais, das três espécies analisadas, o que mais uma vez corrobora a hipótese da reativação pós-meiótica dos genes para RNAr. Este fenômeno foi detectado, também, pela técnica da variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC), na qual essas regiões ficaram nitidamente metacromáticas e pela coloração com o fluorocromo alaranjado de acridina, que as destacam em vermelho. Todos os métodos confirmaram a presença dos complexos RNA/proteínas.

Alguns estudos da espermatogênese em vertebrados, não mamíferos e em mamíferos, especialmente em roedores, confirmam a ocorrência de reativação pós-meiótica dos genes para RNAr, permitindo a conclusão que a síntese de RNAr, na gametogênese dos machos, segue o mesmo padrão em alguns



vertebrados já analisados. Esse padrão deve ser muito antigo em termos de evolução, pois já existia nos primitivos cefalocordados. A conservação evolutiva da reativação pós-meiótica da RON, dos cefalocordados até o homem, indica uma necessidade de RNA ribossomal pós-meioticamente sintetizado. Esse RNAr novamente sintetizado pode ser um pré-requisito para a produção de RNAm, o qual deve ser transcrito em estádios iniciais do desenvolvimento da espermatíde (Schmid *et al.*, 1982; Assis, 2002; Assis *et al.*, 2002 a,b).

Os conhecimentos anteriores obtidos em vertebrados sobre a nucleogênese na meiose, permitem afirmar que o mesmo processo também ocorre nos invertebrados, representados no presente trabalho pelos triatomíneos, reforçando, dessa forma, a idéia que a síntese de RNA na gametogênese é um mecanismo muito antigo e, possivelmente, universal entre organismos com reprodução sexuada.

Referências Bibliográficas

- Abrams, J.M.; White, K.; Fessler, L.I. & Steller, H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, v. 117, p. 29-43, 1993.
- Assis, I.M. Análise da espermatogênese de roedores, com ênfase ao ciclo nucleolar. São José do Rio Preto, S.P. 2002, 81p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.
- Assis, I.M.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estudo da atividade nucleolar nas células espermatogênicas de *Mus musculus*. In: Congresso Nacional de Genética, 48º, Águas de Lindóia, SP, p. 268, Cd-rom, 2002a.



Assis, I.M.; Souza, R.S.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Atividade nucleolar durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus*. In: Congresso Brasileiro de Biologia Celular, XI, Porto Alegre, R.S., p. 195, n.350, 2002b.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. & Mello, M.L.S. Mg^{+2} dependent ATPase activity investigated in heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. Rev. Bras. Genética, XI, v. 2, p. 223-229, 1986.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera), São José do Rio Preto, S.P. 1990, 250p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

Berg, S. Micro-Scope. Online reference guide to *microscopy* – Fluorescence microscopy and fluorophores. 2002. Disponível em:

<<http://www.micro-scope.de/toc.html>>

Casseb-Hassan, P.M. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. HB Científica, v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999.

Cattani, M.V. & Papeschi, A.G. Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocerca fusca* (Coreidae, Heteroptera). Hereditas, v. 140, p. 105-111, 2004.

Dundr, M.; Meier, U.T.; Lewis, N. *et al.* A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosoma periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. Chromosoma, v. 105, p. 407-417, 1997.



Fakan, S. & Hernandez-Verdun, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell*, v.56, p. 189-206, 1986.

Flechon, J.E. & Kopečný, V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote*, v. 6, p. 183-191, 1998.

Howell, W. & Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia*, v. 36, p. 104-105, 1980.

Imai, H.T.; Taylor, R.W. & Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japn. J. Genet.*, v. 63, p. 159-185, 1988.

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

Mello, M.L.S. & Recco-Pimentel, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios*, v. 52, p. 175-184, 1987.

Mello, M.L.S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 28, n.2, p. 149-154, 1995.

Mello, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 20, n. 2, p. 257-264, 1997.



Morielle, A. Estudo da espermatogênese em triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) com ênfase à atividade nucleolar. São José do Rio Preto, S.P., 2000. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

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

Nicoletti, I. & Mannucci, R. Fluorescence microscopy analysis of nuclear alterations during apoptosis, 2002. Disponível em:

<<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap3.htm>>

Ochs, R.L. & Busch, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 KD/pI 5,1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp. Cell Res.*, v. 152, p. 260-265, 1984.

Ochs, R.L.; Lischwe, M.A.; Schen, E. *et al.* Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, v. 92, n.5, p. 330-336, 1985.

Olson, M.O.J.; Dundr, M. & Szebeni, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in Cell Biology*, v. 10, p. 189-196, 2000.

Santos, J.; Sentis, C. & Fernandez-Piqueras, J. Patterns of nucleolar organizer region activity during male meiosis in *Callicrania seoanei* (Orthoptera) as analyzed by silver staining: evidences for a possible reactivation in the period between the two meiotic divisions. *Genome*, v. 29, n. 3, p. 516-518, 1987.



Scheer, U.; Xia, B.; Merkert, H. *et al.* Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma*, v. 105, n. 7-8, p. 470-480, 1997.

Schmid, M. *et al.* Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*, v. 86, p. 149-178, 1982.

Schwarzacher, H.G. & Wachtler, F. The nucleolus. *Anat. Embryol.*, v. 188, p. 515-536, 1993.

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, S.P. 2001, 191p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

Tartarotti, E. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. Herreri*. *Caryologia*, v. 52, n.3-4, p. 177-184, 1999.

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

Vidal, B.C. & Mello, M.L.S. *Biologia Celular*. São Paulo. Livraria Atheneu, 317p, 1987.

Vidal, B.C. & Mello, M.L.S. Critical eletrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. *Acta Histochem. Cytochem.*, v.22, n. 4, p. 471-478, 1989.



Wachtler, F. & Stahl, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation.

Micron, v. 24, n. 5, p. 473-505, 1993.

Zatsepina, O.V.; Dudnic, O.A.; Todorov, I.T. *et al.* Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. Chromosoma, v. 105, n. 7-8, p. 418-430, 1997.



Figura 1 a-p. Túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* (a-f), *Rhodnius pallescens* (g-k) e *Triatoma infestans* (l-p) submetidos às técnicas de coloração: Azul de Toluidina (AT) (a,g,l) e variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (b-f, h-k, m-p). Observar que os cromossomos das metáfases de primeira (g, l) e segunda (a) divisões meióticas apresentam-se metacromáticos (AT). Notar que as células submetidas à técnica variante de CEC tiveram o RNA corado em azul ou violeta e o DNA corado em verde. Metáfases espermatogoniais (b,h). Núcleos em prófase meiótica I (c,i,m), as setas indicam corpúsculos nucleolares. Metáfases de primeira divisão meiótica (d,j,n). Anáfase meiótica (o). Telófase meiótica (e). Espermátides em início da espermiogênese (f,k,p) a seta e os asteriscos indicam a persistência do RNAr. Bars= 10 µm (a-l) e 5 µm (m-p).

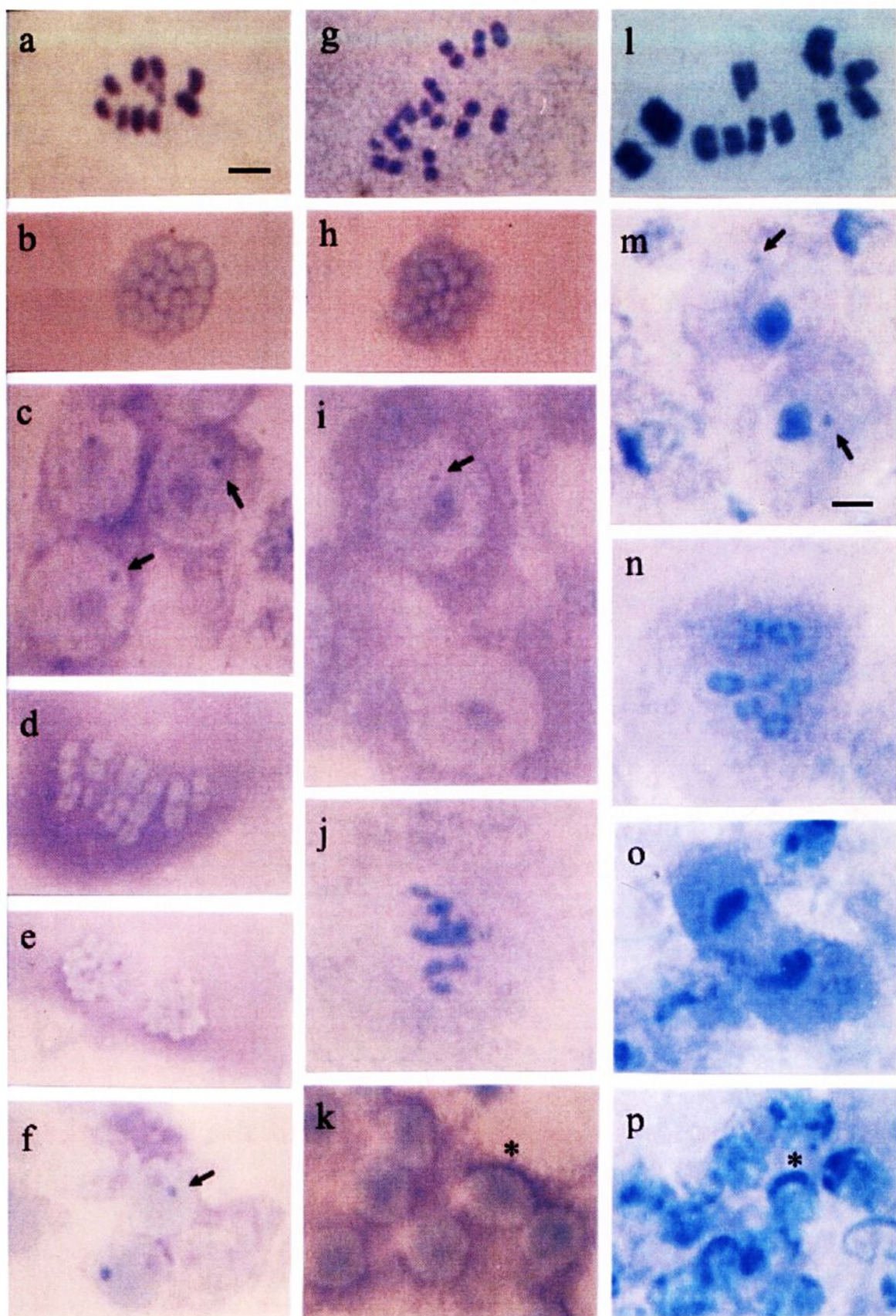


Figura 2 a-j. Túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* (a-c), *Rhodnius pallescens* (d-g) e *Triatoma infestans* (h-j) submetidos à técnica de coloração pelo fluorocromo alaranjado de acridina. Observar, nas células, a coloração vermelha, indicativa da presença de RNA (nucléolo), e as colorações verde e amarela, indicativas de DNA (cromatina/heterocromatina). Núcleos em início de prófase meiótica I (a, h) e durante o “estádio difuso” (d). Nas células de *P. megistus* e *R. pallescens* observam-se nitidamente três corpúsculos heterocromáticos amarelos. Em *T. infestans* o bloco heterocromático é maior e, geralmente, único. Metáfases de primeira divisão meiótica (b, e, i). *P. megistus* (X_1X_2Y) (b). *R. pallescens* (XY) (e). *T. Infestans* (XY) (i). Espermátides em início da espermiogênese (c, g, j). As setas indicam a persistência do RNAr destacada em vermelho. Bar= 10 μ m.

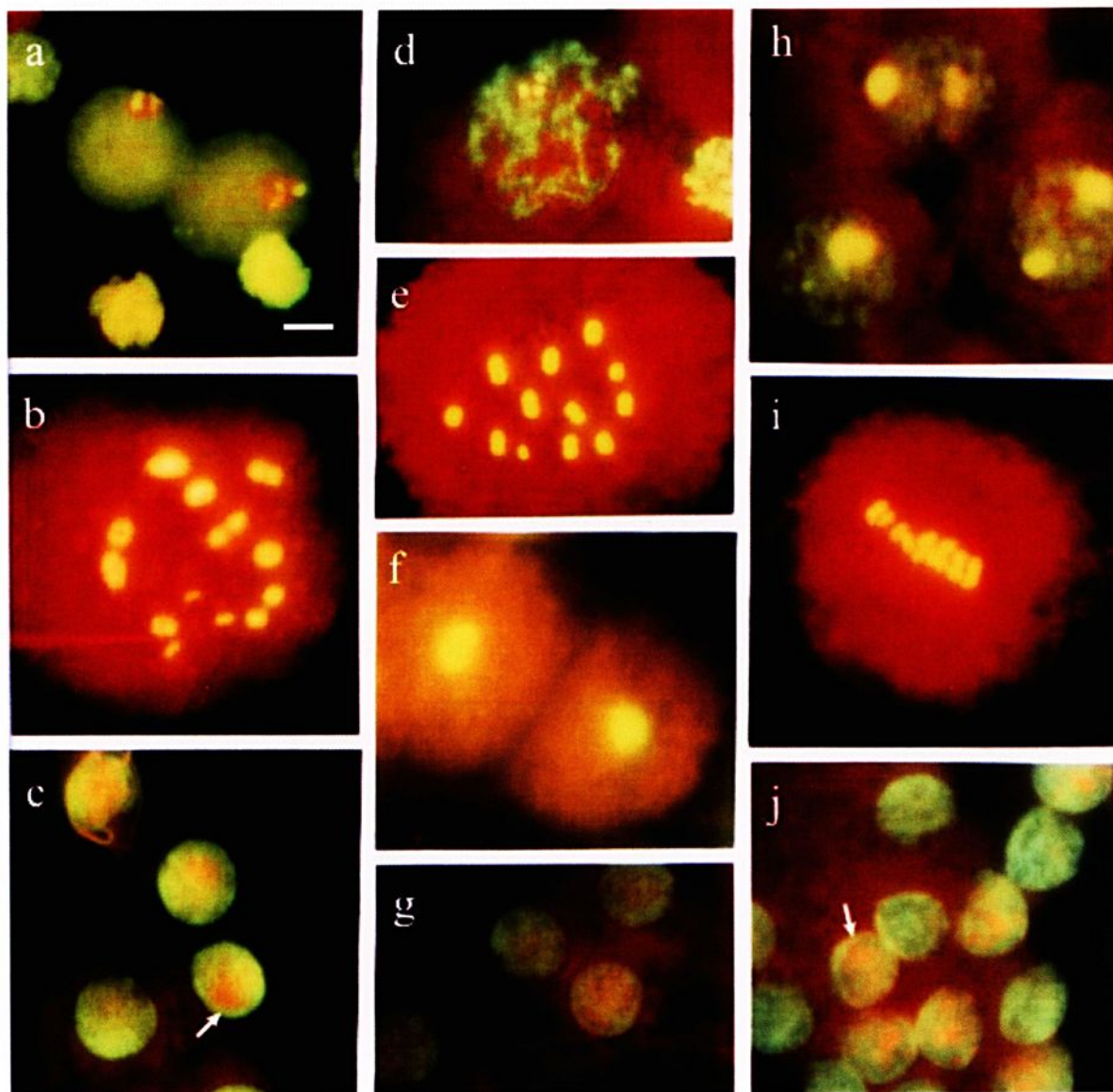
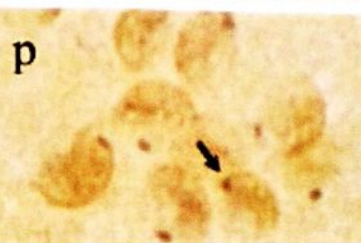
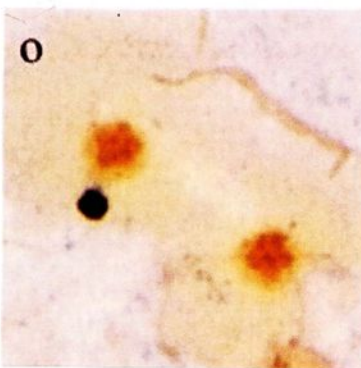
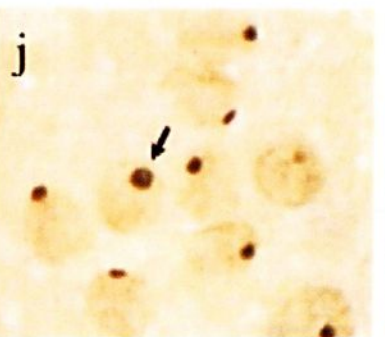
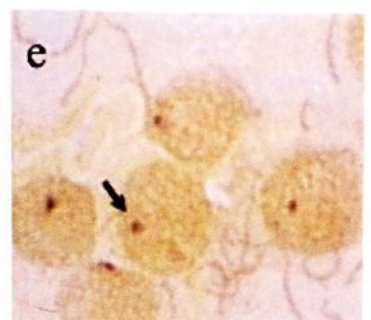
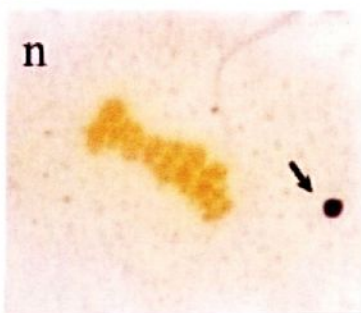
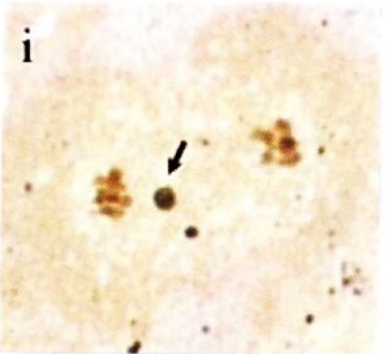
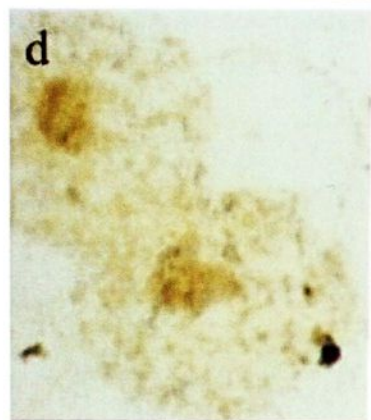
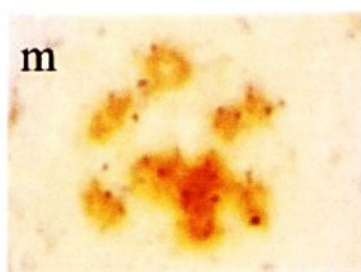
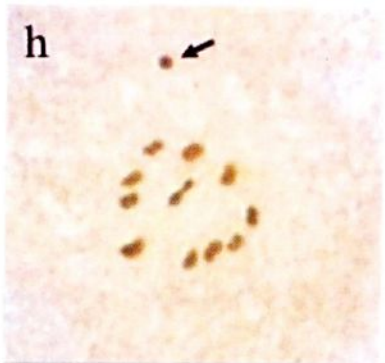
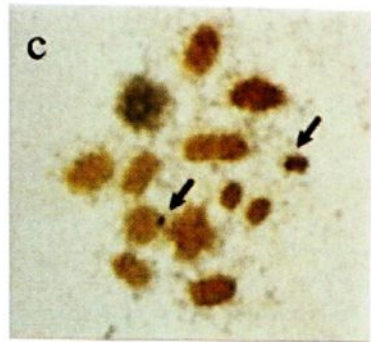
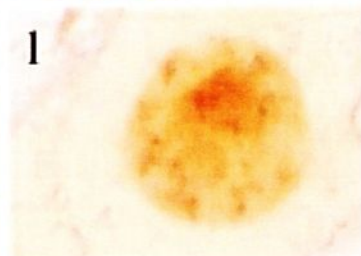
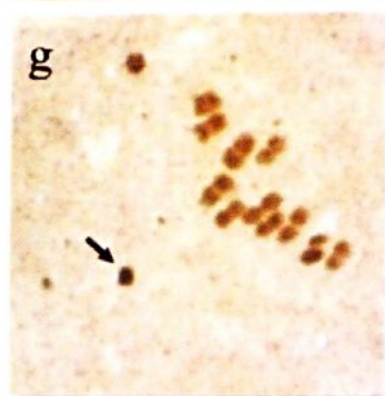
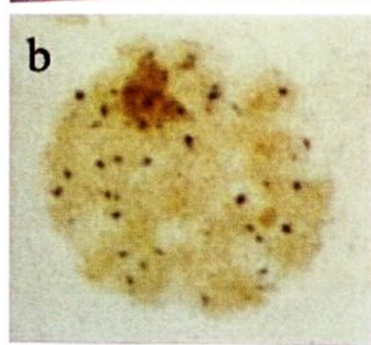
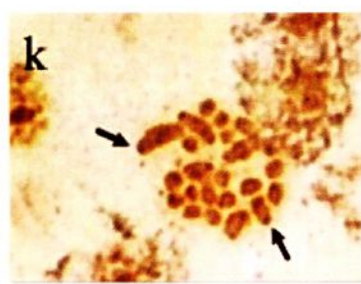
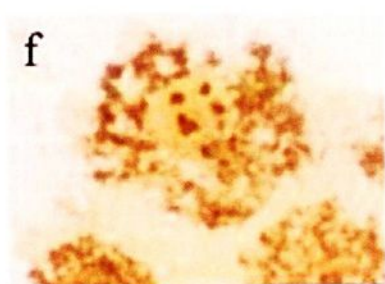
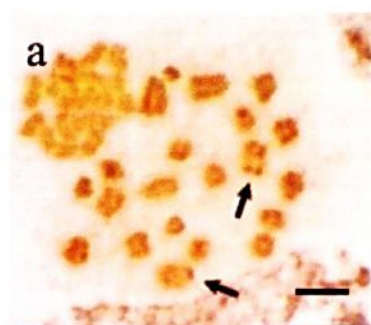


Figura 3 a-p. Túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* (a-e), *Rhodnius pallescens* (f-j) e *Triatoma infestans* (k-p) submetidos à impregnação pelos íons prata. Metáfases espermatogoniais apresentando Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) (setas) (a,k). Núcleos em prófase meiótica I (b,l) e em “estádio difuso” (f). Notar a presença de corpúsculos fragmentados impregnados pelos íons prata distribuídos aleatoriamente (b,l) e localizados no interior da região nucleolar (f). Núcleos em diplóteno-diacinese (c,m). Notar as RONs em um cromossomo autossomo e em um dos sexuais (c) (setas) e os corpúsculos nucleolares na periferia de vários cromossomos (m). Metáfases de primeira (g,n) e segunda divisões meióticas (h). As setas indicam corpúsculos nucleolares fortemente impregnados pelos íons prata. Observar a impregnação pelos íons prata dos cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos cromossomos autossomos (h). Telófases meióticas (d,i,o) com corpúsculos nucleolares fortemente impregnados pelos íons prata (setas). Espermátides em início de espermiogênese (e,j,p). As setas indicam um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata indicativo da persistência do RNAr pós-meiótico. Bar= 10 μ m.



TRABALHO II



**Caracterização diferencial dos cromossomos holocêntricos em triatomíneos
(Heteroptera, Triatominae)**

**Differential characterization of the holocentric chromosomes in triatomines
(Heteroptera, Triatominae)**

Alessandra Morielle e Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

*Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José
do Rio Preto, Brasil.*

Este trabalho será submetido para publicação na revista *Hereditas*.



RESUMO

Um estudo comparativo em cromossomos holocêntricos das espécies de triatomíneos *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*, foi realizado para caracterizar a heterocromatina, a localização dos sítios ativos de DNAr e as proteínas nucleolares. Preparações citológicas dos túbulos seminíferos foram coradas por meio da impregnação pelos íons prata, bandamento-C, duplas colorações CMA3/DA e DAPI/DA, e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S-12 kb de *Drosophila melanogaster*. Os resultados permitiram evidenciar interessantes aspectos sobre a organização cromatínica e cromossômica das células meióticas desses insetos. Em *R. pallescens* os cromossomos sexuais (XY) mostraram-se distintos dos autossomos quando submetidos à impregnação pelos íons prata, bandamento-C, CMA e FISH, confirmando que esses cromossomos são portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Em *P. megistus* foi observado que dois dos três cromossomos sexuais mostraram CMA⁺/DAPI; em prófase meiótica I inicial e em diacinese foi observada correspondência entre a impregnação pelos íons prata e FISH, indicando que nessa espécie dois cromossomos são portadores das RONs, provavelmente, um cromossomo sexual e um autossomo. Em *T. infestans*, também, foi evidenciada a correspondência entre essas duas técnicas nos cromossomos meióticos. Os dados indicaram que em triatomíneos, em geral, o número e a localização das RONs são espécie-específicas. Essas regiões podem ser consideradas importantes marcadores cromossômicos que possibilitam estudos comparativos para um melhor entendimento dos mecanismos evolutivos desses insetos hematófagos.

Palavras-chaves: Cromossomos holocêntricos, RON, CMA₃, DAPI, FISH, triatomíneos.



ABSTRACT

A comparative study in holocentric meiotic chromosomes of the triatomine species *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* and *Triatoma infestans*, was made to characterize the heterochromatin, the localization of rDNA active sites and nucleolar proteins. Cytological preparation of testicular tubules were stained with silver ion impregnation, C-banding, double staining with CMA3/DA and DAPI/DA, and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with rDNA 28S-12kb probe of *Drosophila melanogaster*. The results proved interesting aspects of the chromatin and chromosomal organization of the meiotic cells of these insects. In the species, *R. Pallescens*, the sex chromosomes (XY) were distinct in relation to the autosomal ones when submitted to silver ion impregnation, C-banding, CMA and FISH, confirming that these chromosomes carry Nucleolar Organizer Regions (NORs). In *P. megistus*, two of the three chromosomes sex showed CMA⁺/DAPI⁻ ; in meiotic initial prophase I and in diakinesis. These observations are in agreement with silver ion impregnation and FISH, indicating that in these species two chromosomes bear NORs, probably one sex and one autosomal chromosome. In *T. Infestans*, the correspondence between the two techniques was also established in meiotic chromosomes. The data indicated that in triatomines, in general, the number and localization of NORs are species-specific. These regions maybe considered important chromosomal markers that permit comparative studies for a better understanding of the evolutive mechanisms of these hematophagous insects.

Key-words: Holocentric chromosomes, NOR, CMA₃, DAPI, FISH, triatomines.

Introdução

As técnicas de bandamento têm contribuído para o conhecimento da organização cromossômica, permitindo, assim, a discriminação entre cromossomos morfológicamente similares e o estabelecimento de relações evolutivas entre táxons próximos (Vanzela & Guerra, 2000).

Por exemplo, Moura *et al.* (2003) analisaram células meióticas de algumas espécies da subfamília Scarabaeoidea (Coleoptera), utilizando colorações convencionais, técnicas de bandamento cromossômico diferencial (banda C, fluorocromos CMA₃/DA/DAPI e CMA₃/DA) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) - com sonda de DNAr 18S e 25S de *Arabidopsis thaliana*. Esses autores concluíram que ocorreu heterogeneidade da heterocromatina constitutiva intra e interespecíficas, com variações quantitativas e qualitativas, e sugeriram que os genomas dos dois gêneros analisados comportavam-se de diferentes modos.

Santos *et al.* (2000) observaram em três espécies de quirópteros, *Phyllostomus discolor*, *P. elongatus* e *P. hastatus*, homologia entre a impregnação por íons prata e a hibridação *in situ* com sonda de DNAr 28S. A coloração pelos íons prata evidenciou, um par de Região Organizadora Nucleolar (RON) localizado no braço curto do par 15 nas três espécies. Esse cromossomo é o menor do complemento, sendo que em *P. discolor* ele é meta ou submetacêntrico e, nas outras duas espécies, é acrocêntrico. A técnica de hibridação permitiu a detecção de genes ribossômicos localizados, também, no braço curto do cromossomo 15, confirmando a localização da RON. Não foram

detectadas diferenças na intensidade ou no tamanho do sinal de hibridação entre os homólogos das três espécies.

Em alguns organismos como peixes e anuros, o número e a localização dos loci DNAr/AgRON são espécie-específicos sendo importantes marcadores cariotípicos. Nesses indivíduos ficou demonstrado que a impregnação pela prata foi eficaz para detectar as RONS genômicas em concordância com os dados obtidos pela técnica de FISH (Fujiwara *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 1998).

Também em peixes, Almeida-Toledo *et al.* (2000) hibridaram células renais de *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae) com sonda de DNAr e verificaram que as regiões onde ocorreram hibridação coincidiram com as RONS impregnadas pelos íons prata. Outro estudo realizado nas espécies *Prochilodus affinis*, *P. marggravii* e *P. lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), com essa mesma sonda de DNAr, detectou a presença de genes ribossômicos na região intersticial do par de cromossomos metacêntricos, anteriormente detectada pelos íons prata, corroborando, assim, o conservadorismo dessas regiões nesse grupo de peixes. Nesse mesmo trabalho, foi confirmado, ainda, a presença de cístrons ribossômicos adicionais na região telomérica de um terceiro cromossomo em algumas metáfases dessas três espécies (Hatanaka *et al.*, 1998).

Como exemplificado, a maioria dos trabalhos citogenéticos da literatura utiliza técnicas de marcações diferenciais para o estudo de cromossomos monocêntricos. Existindo poucos estudos sobre o padrão de distribuição da heterocromatina e a localização das RONS, principalmente em triatomíneos, as informações obtidas sobre a estrutura e a composição de bases, de algumas



regiões específicas, dos cromossomos holocêntricos desses insetos são de extrema importância para a compreensão da sua estrutura molecular.

A subfamília Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) inclui 122 espécies de insetos hematófagos, sendo dividida em cinco tribos e quinze gêneros. Os triatomíneos são os vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente causal da doença de Chagas (Panzera *et al.*, 1992; 1996).

Em triatomíneos o número cromossômico diplóide nos machos estende-se de 21 a 25, sendo que os mecanismos de cromossomos sexuais variam de XY, X_1X_2Y e $X_1X_2X_3Y$. Vários autores sugerem que a fragmentação de um único X original tenha sido a principal fonte de cromossomos sexuais múltiplos em Heteroptera (Schrader, 1947; White, 1973; Ueshima, 1979). Estudos citogenéticos revelaram, também, que, na meiose, a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (De Vaio *et al.*, 1985).

Portanto, com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a estrutura e a natureza holocêntrica desses cromossomos, no presente trabalho foram analisadas células meióticas de espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, por meio de técnicas específicas que revelam o padrão diferencial da heterocromatina e localizam os sítios de DNAr e a distribuição das proteínas nucleolares.

Material e Métodos

Foram utilizados túbulos seminíferos de insetos adultos dos seguintes gêneros e espécies: *Panstrongylus megistus* (9A + X_1X_2Y), *Rhodnius*



pallenscens (10A + XY) e *Triatoma infestans* (10A + XY). Após espalhamento e fixação do material biológico (Imai *et al.*, 1988), as lâminas foram submetidas a uma série de colorações* não sequenciais: impregnação pelos íons prata (Howell & Black, 1980), para a discriminação de proteínas nucleolares; coloração pelo bandamento C (Sumner, 1972); duplas colorações pelos fluorocromos Cromomicina A₃/Distamicina (CMA₃/DA) e 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride/Distamicina (DAPI/DA) (Schmid, 1980), após pré-tratamento com RNase, para a discriminação heterocromática; e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S-12kb de *Drosophila melanogaster* (Viegas-Péquignot, 1992), para a localização do DNAr.

As fotomicrografias foram obtidas aos microscópios Zeiss-Jenaval, para as técnicas citoquímicas, e Zeiss-Axioskop e Olympus BX-FLA, para as técnicas de citogenética molecular (CMA₃/DA; DAPI/DA e FISH).

Resultados

Os túbulos seminíferos das espécies *P. megistus*, *R. pallenscens* e *T. infestans* foram submetidos a uma série de colorações e os dados obtidos foram comparados**.

Panstrongylus megistus

As células meióticas, quando submetidas à impregnação pelos íons prata apresentaram, nas metáfases espermatogoniais dois cromossomos com

* Os protocolos detalhados das técnicas estão apresentados no Apêndice I (itens: 1, 2 e 3).

** O resumo dos principais resultados sobre a estrutura dos cromossomos holocêntricos das três espécies (*P. megistus*, *R. pallenscens* e *T. infestans*) estão apresentados no apêndice III.



nítidas marcações caracterizando as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). No núcleo em prófase meiótica I, em “estádio difuso”, foi observada uma região nucleolar destacada e vários fragmentos nucleolares dispersos pelo seu interior. No núcleo em diplóteno-diacinese foi possível, também, evidenciar dois cromossomos com regiões impregnadas pelos íons prata, sendo uma marcação em um cromossomo autossomo e a outra em um sexual, provavelmente o cromossomo X, indicando, assim, a localização das RONs (Figs. 1 a-c).

Nas células testiculares, submetidas ao duplo bandamento fluorescente com CMA₃/DA, pôde-se observar que as metáfases espermatogoniais apresentaram cromossomos CMA⁺, e as metáfases de primeira e segunda divisões meióticas mostraram um dos três cromossomos sexuais CMA⁺ (Figs. 1 d-f). Quando as células foram submetidas ao duplo bandamento DAPI/DA, dos três cromossomos sexuais característicos dessa espécie, dois mostraram-se DAPI⁺ (Figs. 1 g-h).

Por meio da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S-12kb, foram evidenciadas diversas regiões cromossômicas marcadas pela sonda no núcleo em prófase meiótica I (“estádio difuso”). Nos núcleos em diplóteno-diacinese, foi verificado também, que alguns cromossomos autossomos apresentaram hibridação pela sonda de DNAr (Figs. 1 i-k).

Rhodnius pallescens

As células dos túbulos seminíferos, submetidas à impregnação pelos íons prata, mostraram, nas metáfases de segundas divisões meióticas, os



dois cromossomos sexuais (XY) impregnados pelos íons prata. No citoplasma dessas células foram visualizados alguns corpúsculos nucleolares dispersos, correspondentes aos corpúsculos pré-nucleolares (PNBs) (Figs. 2 a-b). Nas células meióticas submetidas à técnica de bandamento C, foram evidenciados, nas metáfases de primeiras divisões meióticas, sempre dois cromossomos heterocromáticos, podendo, algumas vezes, ser os dois cromossomos sexuais e, outras, um cromossomo sexual e uma região intersticial de um dos cromossomos autossomos (Figs. 2 c-d).

Nas células meióticas, submetidas ao duplo bandamento fluorescente com CMA₃/DA, foram destacadas, nas metáfases espermatogoniais, algumas regiões cromossômicas CMA⁺. Nos núcleos em prófase meiótica I, durante o “estádio difuso”, também foram verificadas duas regiões CMA⁺ correspondendo, possivelmente aos cromossomos sexuais. As metáfases de primeiras divisões meióticas, submetidas às duplas colorações pelos fluorocromos CMA₃/DA e DAPI/DA, não apresentaram distinção entre os cromossomos (Figs. 1 e-h).

Por meio da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S-12kb, foi possível constatar que os dois cromossomos sexuais (XY) apresentaram sinal de hibridação (Figs. 2 i-k).

Triatoma infestans

As células meióticas, tratadas pela técnica de impregnação argêntica, mostraram em diplóteno-diacinese alguns cromossomos com marcações



pela prata. Em metáfase e anáfase de primeiras divisões meióticas foram evidenciadas algumas regiões cromossômicas impregnadas. Alguns corpúsculos impregnados pelos íons prata, correspondentes aos corpúsculos pré-nucleolares (PNBs), puderam ser visualizados no citoplasma (Figs. 3 a-c).

Quando as células testiculares foram submetidas à técnica de bandamento C, quatro autossomos foram diferenciados nas metáfases de primeira divisão: um totalmente heterocromático; um apresentando regiões teloméricas heterocromáticas; um com duas regiões heterocromáticas (uma telomérica e outra intersticial) e outro com uma região intersticial heterocromática. Os dois cromossomos sexuais também mostraram regiões intersticiais heterocromáticas (Figs. 3 d-f).

Por meio da dupla coloração pelos fluorocromos CMA₃/DA foram evidenciados, nas metáfases espermatogoniais, cromossomos CMA⁺ e, nas metáfases de primeira divisão meiótica, um dos cromossomos sexuais também apresentou-se CMA⁺. Nas metáfases de primeira divisão meiótica, quando as células foram submetidas à dupla coloração pelos fluorocromos DAPI/DA não foi evidenciada distinção entre os cromossomos (Figs. 3 g-i).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 12kb-28S revelou, nos núcleos em diplóteno-diacinese, alguns cromossomos com sinal de hibridação, assim como nas metáfases II e anáfases meióticas (Figs. 3 j-l).



Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo, revelaram interessantes aspectos sobre a organização da estrutura cromatínica e cromossômica das células meióticas dos triatomíneos. As pesquisas citogenéticas em insetos, relacionava-se, até pouco tempo atrás, apenas à heterocromatina. A definição de heterocromatina está ligada às suas propriedades. Pode-se afirmar que, além da heterocromatina constitutiva ser um segmento cromossômico ou, algumas vezes, cromossomos inteiros que se apresentam constantemente condensados durante o ciclo celular, também é, geralmente não codificadora, e composta por DNA altamente repetido (DNA satélite) que se replica tardiamente na fase de síntese (S), ao contrário da eucromatina (Guerra, 1988).

As técnicas de citogenética molecular - incluindo o bandamento fluorescente e, também, a hibridação *in situ* fluorescente com sondas específicas - forneceram maiores informações sobre a constituição da cromatina nos invertebrados, favorecendo, assim, o avanço dos estudos nesse grupo de animais.

A heterocromatina é citologicamente detectada pelo bandamento C, sendo o método BSG (Bário/Solução Salina/Giemsa), descrito por Sumner, em 1972, o mais empregado. Técnicas utilizando fluorocromos possibilitam também a identificação de regiões específicas de heterocromatina, como, por exemplo, Quinacrina e DAPI (específicas para regiões AT), Cromomicina A₃ e Mitramicina (específicas para regiões CG) (Sumner, 1990).



A heterocromatina desempenha uma função celular essencial e parece participar dos mecanismos de pareamento de homólogos e de cromossomos não homólogos na meiose; regulação da recombinação; segregação cromossômica; assim como, na regulação da expressão gênica (Irick, 1994; John, 1988). Em uma variedade de organismos, a heterocromatina é completamente eliminada das células somáticas, no entanto, é sempre retida em células da linhagem germinativa. Sua função, em células meióticas, parece estar relacionada ao impedimento da formação de quiasmas, pois o fenômeno de *crossing-over* raramente ocorre em regiões heterocromáticas (John & Miklos, 1979; Sumner, 1990).

A distribuição da heterocromatina constitutiva varia conforme o organismo: pode ocupar praticamente toda a extensão de um cromossomo, como são os casos clássicos do cromossomo Y de *Drosophila* e de um dos cromossomos X dos mamíferos placentários XX; pode-se restringir à proximidade do centrômero (heterocromatina centromérica ou pericentromérica); às extremidades de um ou mais cromossomos (heterocromatina telomérica); à região intersticial (heterocromatina intersticial) e/ou à vizinhança da Região Organizadora Nucleolar (heterocromatina associada ao nucléolo) (Mello, 1978). Sabe-se que, na maior parte dos heterópteros, as bandas C positivas têm sido localizadas, principalmente, nas regiões teloméricas e subteloméricas, e também nas porções intersticiais dos cromossomos (Papeschi, 1995).



A caracterização e identificação dos cromossomos holocêntricos de heterópteros é prejudicada devido à dificuldade na diferenciação morfológica e ao alto grau de condensação cromossômica.

No presente estudo foi observado na espécie *Rhodnius pallescens*, em metáfases de primeira divisão meiótica, que os dois cromossomos sexuais (XY) e, às vezes, apenas um dos sexuais e uma porção de um dos autossomos apresentavam-se heterocromáticos.

Diferenças quanto à quantidade e à posição da heterocromatina em cromossomos de diferentes espécies do mesmo gênero são muito comuns. Dessa forma, espécies proximamente relacionadas podem diferir no número de bandas C^+ , na sua localização e na quantidade de heterocromatina (Sumner, 1990). Algumas espécies apresentam também uma grande variação no conteúdo de heterocromatina constitutiva de indivíduo para indivíduo o que pode ser importante no processo de especiação (Clark & Wall, 1996).

Em um estudo citogenético com três espécies do gênero *Rhodnius* (*R. pictipes*, *R. nasutus* e *R. robustus*), Pérez *et al.* (1992) evidenciaram o cromossomo sexual Y heterocromático. No entanto, somente na espécie *R. nasutus* os autossomos também apresentaram blocos heterocromáticos nas regiões terminais.

Ainda em triatomíneos, Tartarotti & Azeredo-Oliveira (1999), analisando células meióticas de duas espécies do gênero *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreri*), observaram que em *P. megistus* ocorriam bandas C positivas intersticiais ao longo dos cromossomos autossomos, e que em *P. herreri*



a heterocromatina localizava-se, preferencialmente, nas regiões terminais desses. Foi possível diferenciar também os cromossomos sexuais (X_1X_2Y), sendo que na espécie *P. herreri* esses apresentaram-se heterocromáticos durante toda a espermatogênese, e em *P. megistus* somente o cromossomo sexual Y era heterocromático, enquanto os cromossomos X_1X_2 , apresentaram-se completamente heterocromáticos em alguns núcleos, mas em outros mostraram-se com bandamento C negativo. Os autores discutiram o fato de que um padrão similar na resposta ao bandamento C ocorreu para ambos os cromossomos X, corroborando, assim, a hipótese da origem dos vários cromossomos X, em Heteroptera, por meio da fragmentação de um único X original.

No presente estudo, com base na análise das metáfases de primeira divisão meiótica da espécie *Triatoma infestans*, foi demonstrado que quatro cromossomos autossomos (3 com blocos teloméricos e 1 com bloco intersticial) e os dois sexuais (XY) (1 com bloco telomérico e 1 com bloco intersticial) são heterocromáticos. Esses dados diferem de alguns autores, em trabalhos clássicos, que descrevem um padrão distinto para *T. infestans*, onde apenas três cromossomos autossomos (com blocos cromossômicos teloméricos) e o cromossomo sexual Y são heterocromáticos (Solari, 1979; Panzera *et al.*, 1992). Pode ser sugerido que essa diferença encontrada, no presente trabalho, para o padrão heterocromático dessa espécie, relaciona-se à prolongada manutenção das colônias nos laboratórios, em cristalizadores específicos, o que, seguramente, facilita o retrocruzamento. Esse aspecto pode ter influenciado, de alguma forma,



no padrão heterocromático dos cromossomos, no caso específico da linhagem utilizada no presente trabalho.

Panzer e colaboradores (2000) estudaram vários grupos de espécies de *Triatoma* e sugeriram que taxa de evolução cromossômica está relacionada à adaptação a diferentes ambientes ou a algumas propriedades intrínsecas do complemento cromossômico. Esses mesmos autores, estudando a espécie *T. brasiliensis*, observaram que ocorriam diferenças morfológicas, ecológicas e moleculares entre as formas cromatínicas dessa espécie, indicando que as suas populações estariam passando por um processo de diferenciação que não envolveria sua organização cromossômica. Também Dujardin *et al.* (1999) reforçam essa hipótese mencionando que a diferenciação que ocorre entre populações de uma dada espécie pode levar a um processo de especiação, que em Triatominae parece ser um processo rápido, principalmente induzido por fatores ecológicos. As hipóteses levantadas por esses autores corroboram a nossa proposta, para justificar o aumento dos blocos heterocromáticos devido ao retrocruzamento provocado pelo confinamento das colônias de *T. infestans* nos cristalizadores. Por outro lado, esse achado reforça, sobretudo, a função primordial dos blocos heterocromático nos mecanismos meióticos ao longo da evolução das espécies (John, 1988).

Severi-Aguiar (2001) analisando células meióticas de espécies do gênero *Triatoma* (*T. protacta*, *T. platensis* e *T. tibiamaculata*) com bandamento C observou blocos heterocromáticos localizados, preferencialmente, nas extremidades de alguns cromossomos. Panzer *et al.* (1995), também em *T.*



platensis, observaram três ou quatro pares de cromossomos autossomos apresentando blocos heterocromáticos localizados em uma ou ambas as extremidades cromossômicas. O cromossomo sexual Y apresentou-se totalmente heterocromático enquanto o X apresentava uma região de banda C positiva e outra negativa. Em um estudo anterior realizado por Pérez *et al.* (1992), em *T. pseudomaculata*, foi observado que o cromossomo sexual X era totalmente heterocromático e que alguns autossomos possuíam blocos heterocromáticos terminais. Nesse mesmo trabalho foi verificado, um padrão semelhante em *T. matogrossensis*, isto é, o cromossomo sexual X era heterocromático, e os autossomos não possuíam bandas C positivas.

No presente estudo foi possível verificar que houve, entre os três gêneros, uma diversidade de coloração pelos fluorocromos (CMA₃/DA e DAPI/DA). A espécie *Panstrongylus megistus* apresentou nas metáfases espermatogoniais alguns cromossomos CMA⁻, e nas metáfases de primeira e segunda divisões meióticas dois de seus cromossomos sexuais (X₁X₂Y) CMA⁺ e DAPI⁺, confirmando que esses apresentam regiões ricas em CG. Esses achados são coerentes com o trabalho de Tartarotti & Azeredo-Oliveira (1999), sobre bandamento C em cromossomos meióticos de *Panstrongylus megistus*.

Na espécie *Triatoma infestans*, analisada no presente estudo, pode ser observado também, nas metáfases espermatogoniais, alguns cromossomos CMA⁻, e nas metáfases de primeira divisão meiótica, um dos cromossomos sexuais (XY) CMA⁻, o que caracteriza poucas regiões CG. Esses achados corroboram os dados de Mello & Recco-Pimentel (1987), nessa mesma



espécie. O bandamento pelo fluorocromo DAPI não distinguiu as regiões heterocromáticas.

Na espécie *Rhodnius pallescens*, as metáfases espermatogonias e os núcleos em prófase meiótica, durante o “estádio difuso”, apresentaram algumas regiões cromossômicas ricas em CG (CMA⁺). Os cromossomos metafásicos da primeira divisão meiótica não apresentaram regiões heterocromáticas, quando submetidos aos fluorocromos CMA₃/DA e DAPI/DA, pois os cromossomos apresentaram-se homogeneamente corados.

Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira (2001a) analisando células meióticas de algumas espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma*, por meio de fluorocromos CMA₃/DA e DAPI/DA, encontraram variabilidade nesse tipo de bandamento: em *T. protacta* (X₁X₂Y), um cromossomo sexual DAPI⁺ (Y) e dois DAPI⁻ (X₁X₂), um autossomo com a região telomérica CMA⁺ e um sexual CMA⁻; na espécie *T. platensis* (XY), a presença de cromocentros positivos para ambos os fluorocromos; em *T. tibiamaculata* (X₁X₂Y), o cromossomo sexual Y DAPI⁺/CMA⁻ e os sexuais X₁X₂ CMA⁺ e, finalmente, na espécie *T. vitticeps* (X₁X₂X₃Y), o cromossomo sexual Y apresentou-se DAPI⁺/CMA⁻ e os X₁X₂X₃ CMA⁺.

Os dados relatados na literatura a respeito da utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em insetos, especialmente em Heteroptera, são muito escassos. No entanto, MacGregor (1993), com base em resultados de diversos estudos citogenéticos, comparou a técnica de impregnação pelos íons prata com a de hibridação *in situ* fluorescente e demonstrou que nem



todas as RONS potencialmente ativas são coradas pelos íons prata. Isso, segundo o autor, deve-se ao fato de que somente aquelas RONS ativas no começo da intérfase mostraram esta afinidade, sugerindo que o número de RONS impregnadas pelos íons prata é menor do que o evidenciado após o uso da técnica de hibridação. Os DNAs usados como sondas podem, provavelmente, identificar marcadores cromossômicos para estudos evolutivos, comparando o nível de correspondência entre os resultados produzidos pela impregnação pelos íons prata e FISH e, também, permitem comparar a atividade dos genes nos sítios das RONS e, assim, contribuir para o entendimento dos processos evolutivos desses organismos.

No presente estudo as análises das células pelas técnicas de impregnação por íons prata e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) - com sonda de DNAr 28S-12 kb de *Drosophila melanogaster* - possibilitaram constatar, precisamente, algumas correspondências entre as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONS,) detectadas pelos íons prata, e as regiões marcadas pela sonda de DNA ribossômico (DNAr), nas três espécies analisadas. Pode-se visualizar, também, que ocorreram algumas marcações inespecíficas, como no caso da espécie *Panstrongylus megistus*, mas que não interferiram na análise dos dados. Foi observado, ainda, que algumas marcações pelos íons prata não corresponderam exatamente, em relação à quantidade de marcações, aos sítios de DNAr. Essa constatação pode ser indicativa de que as marcações evidenciadas pela prata, como é de conhecimento geral, são somente as RONS que estiveram



ativas durante a intérfase precedente, e, dessa forma, as regiões marcadas pela sonda são consideradas efetivamente os sítios de DNAr nos cromossomos.

Pode-se notar, no presente estudo, que na espécie *R. pallescens*, os cromossomos sexuais (XY) mostraram-se distintos dos autossomos quando submetidos à impregnação pelos íons prata, bandamento C, CMA e FISH, o que confirma serem esses cromossomos os portadores das RONS. Na espécie *P. megistus* verificou-se que dois cromossomos, dos três sexuais, apresentaram-se CMA⁺/DAPI⁻; nos núcleos em início de prófase I e em diacinese, observou-se marcações correspondentes obtidas pelas técnicas de impregnação pelos íons prata e de hibridação. Nessa espécie foram observadas RONS em cromossomos autossomos das metáfases espermatogoniais e, na fase de diacinese, um cromossomo sexual e um autossomo apresentaram-se como portadores. Na espécie *T. infestans* foi, evidenciada a correspondência de marcações pelos íons prata e pela hibridação nos cromossomos meióticos das seguintes fases: diacinese; metáfase II e anáfase.

Em recente estudo com espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* (*Triatoma tibiamaculata*, *T. protacta*, *T. platensis* e *T. vitticeps*), utilizando-se sonda de DNAr de *Drosophila melanogaster* 28S, foi possível verificar que, em duas espécies (*T. tibiamaculata* e *T. protacta*), alguns dos autossomos apresentavam regiões coradas. Em *T. tibiamaculata* tais regiões eram teloméricas e encontravam-se somente em um bivalente. Essas marcações pareciam coincidir com regiões CMA⁺. Em *T. platensis*, a marcação pelo FISH foi observada em um dos cromossomos sexuais, provavelmente o cromossomo X, e,

nesse caso, coincidiu com a marcação pelos íons prata. Na espécie *T. vitticeps* dois dos três cromossomos sexuais apresentaram hibridação pela sonda (Severi-Aguiar & Azeredo-Oliveira, 2001b).

Em um estudo realizado com vespas da espécie *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera), onde se procurou localizar a RON por hibridação *in situ* com sondas de DNAr de *Drosophila melanogaster* (18S, 5,8S e 28S), foi evidenciada marcação positiva no par de cromossomos heteromórficos (heteromórfico em relação ao tamanho do cromossomo). O sinal de hibridação coincidiu com a marcação positiva pela Cromomicina A₃ (CMA), fluorocromo que destaca as regiões do genoma ricas em CG. Os sinais fluorescentes foram observados na extremidade do braço longo do par heteromórfico e, portanto, confirmaram o número e a localização das RONS (Mampumbu & Pompolo, 2000; Mampumbu, 2002,).

Apesar da natureza holocêntrica dos cromossomos de triatomíneos ser considerada uma barreira para os estudos citogenéticos, devido ao seu alto grau de compactação cromatínica, foi possível verificar, no presente estudo, nas três espécies dos diferentes gêneros (*Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*) as regiões ricas em heterocromatina constitutiva diferenciando, quando possível, a composição de bases das mesmas. Pôde-se detectar também, com maior precisão as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONS) nesses cromossomos holocêntricos meióticos. Os resultados indicaram que nos triatomíneos, de forma geral, o número e a localização das RONS são espécie-específicos e, à semelhança de outros grupos de animais, são



importantes marcadores cromossômicos que possibilitam estudos comparativos visando ao melhor entendimento dos mecanismos evolutivos que atuaram nesses importantes insetos hematófagos.

Referências Bibliográficas

Almeida-Toledo, L.F.; Stocker, A.J.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. Fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer regions phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chromosome Res.*, n. 4, p. 301-305, 2000.

Clak, M.S.; Wall, W.J. *Chromosomes. The complex code*. London: Chapman & Hall, 1996, 345p.

De Vaio, E.S.; Grucci, B.; Castagnino, A.M. *et al.* Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera- Reduviidae). *Genetica*, v. 67, p. 185-191, 1985.

Dujardin, J.P./ Panzera, F. & Schofield, C.J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 223-228, 1999.

Fujiwara, A.; Syuiti, A.; Yamaha, E. *et al.* Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. *Chromosome Res.*, n. 6, p. 463-471, 1998.

Guerra, M. *Introdução à genética geral*. Ed. Guanabara, 142p. 1988.



Hatanaka, T.; Jesus, C.M.; Silva, F.H. *et al.* Hibridação *in situ* com sonda de DNAr 18S em *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). Genetics and Molecular Biology., n.3, v. 21 (supl.), p. 61, 1998.

Howell, W.M.; Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. Experientia, v. 36, p. 104-105, 1980.

Imai, H.T.; Taylor, R.W.; Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. Japn. J. Genet., v. 63, p. 159-185, 1988.

Irick, H. A new function for heterochromatin. Chromosoma, v. 103, p. 1-3, 1994.

John, B.; Miklos, G.L.G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. International review of cytology. V. 58, p. 1-114, 1979.

John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. Heterochromatin: Molecular and structural aspects. Cambridge: Cambridge University Press, 301p. 1988.

Lourenço, L.B.; Recco-Pimentel, S.M.; Cardoso, A.J. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chromosome Res., n. 6, p. 621-628, 1998.

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

Mampumbu, A.R.; Pompolo, S.G. Localização da região organizadora de nucléolo por hibridação *in situ* (FISH) em abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi*

(Hymenoptera, Apidae, Meliponini), da região de Viçosa, Minas Gerais. *Genetics and Molecular Biology*, n. 3, v. 23 (supl.), p. 20, 2000.

Mampumbu, A.R. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Fries, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Tese de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular. UNICAMP/Campinas, 2002. 55p.

Mello, M.L.S. Heterocromatina. *Ciência e Cultura*, v. 1, n.2, p. 97-102, 1978.

Mello, M.L.S.; Recco-Pimentel, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. *Cytobios*, v. 52, p. 175-184, 1987.

Moura, R.C.; Souza, M.J.; Melo, N.F.; Lira-Neto, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hereditas*, v. 138, p. 200-206, 2003.

Panzer, F.; Alvarez, F.; Sanchez-Rufas, J. *et al.* C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Genome*, v. 35, p. 1068-1074, 1992.

Panzer, F.; Pérez, R.; Panzer, Y. *et al.* Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Res.*, v. 3, p. 143-150, 1995.

Panzer, F.; Pérez, R.; Hornos, S. *et al.* Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 4, p. 515-518, 1996.



- Panzer, F.; Pérez, R.; Nicolini, P. *et al.* Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16 (supl. 2), p. 83-88, 2000.
- Papeschi, A.G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosome of *Belostoma axyrum* (Belostomatidae, Heteroptera). Cytologia, v. 60, p. 291-295, 1995.
- Pérez, R.; Panzer, Y.; Scafiezzo, S., *et al.* Cytogenetics as a tool triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 87, n. 3, p. 353-361, 1992.
- Santos, N.; Souza, M.J.; Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y. Localização cromossômica de genes 28S RNAr em *Phyllostomus discolor*, *P. elongatus* e *P. hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). Genetics and Molecular Biology, n. 3, v. 23 (supl.), p. 29, 2000.
- Schmid, M. Chromosome banding in amphibian IV. Differentiation of GC and AT rich regions in Anura. Chromosoma, v. 77, p. 83-103, 1980.
- Schrader, F. The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. Evolution, p. 134-142, 1947.
- Severi-Aguiar, G.D.C. Estudo citogenético em espécies do gênero *Triatoma* (Heteroptera, Reduviidae) com ênfase à heterocromatina e às Regiões Organizadoras Nucleolares. Tese de Doutorado em Genética, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/UNESP/São José do Rio Preto, 2001, 191p.
- Severi-Aguiar, G.D.C.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estudo da estrutura cromossômica de triatomíneos (Triatomina, Heteroptera), após coloração



diferencial por fluorocromos. In: Congresso Nacional de Genética, 47º, Cdrom. (GA 082), 2001a.

Severi-Aguiar, G.D.C.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of four species of *Triatoma* (Heteroptera, Triatominae). Biocell, 25 (supl.), p. 52, 2001b.

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

Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Research, v. 75, p. 304-306, 1972.

Sumner, A.T. Chromosome banding. Ldon: Unwin Hyman. 1990. 434p.

Tartarotti, E.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. Cytobios, v. 99, p. 113-122, 1999.

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

Vanzela, A.L.L.; Guerra, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 2, p. 453-456, 2000.

Viegas-Péquignot, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: Hybridization: Practical approach (Willman, D. ed.). Oxford University Press. IRL Press England, 1992.

White, M.J.D. Endomitosis and endopolyploidy. In: Animal cytology and evolution. Cambridge University Press, 1973. Cap. 3. p. 75-86.



Figura 1 a-k. Túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus* submetidos à impregnação pelos íons prata (**a-c**); às duplas colorações pelos fluorocromos CMA3/DA (**d-f**) e DAPI/DA (**g-h**) e à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNA ribossômico (DNAr) 28S (**i-k**). Metáfases espermatogoniais (**a,d**). Em (a) as setas indicam Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) e em (d) cromossomos CMA⁺. Núcleos em prófase meiótica I (**b,i**). Em (b) as setas indicam regiões de impregnação argêntica e em (i) sítios de DNAr. Núcleos em diplóteno-diacinese (**c,j,k**). Em (c) as setas indicam RONs e em (j,k) regiões de hibridação. Metáfases de primeira divisão meiótica (**e,g,h**). Em (e) a seta indica um cromossomo sexual CMA⁺ e em (g,h) dois cromossomos sexuais DAPI⁺. Metáfase de segunda divisão meiótica (**f**), onde a seta indica um cromossomo sexual CMA⁺. Bar= 10 μ m.

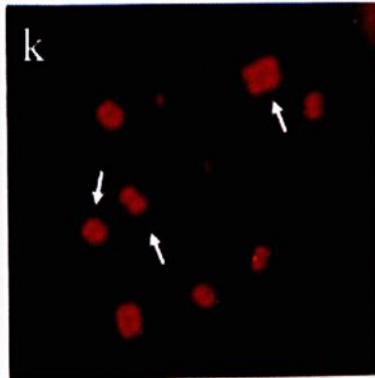
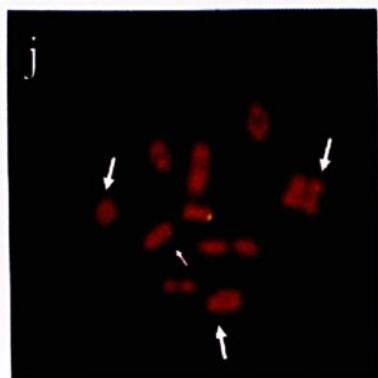
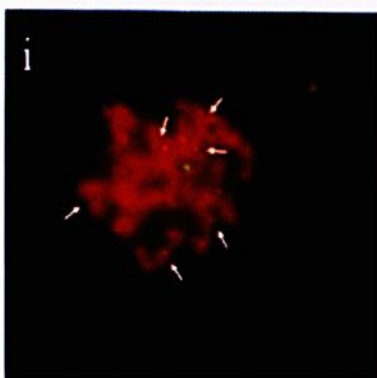
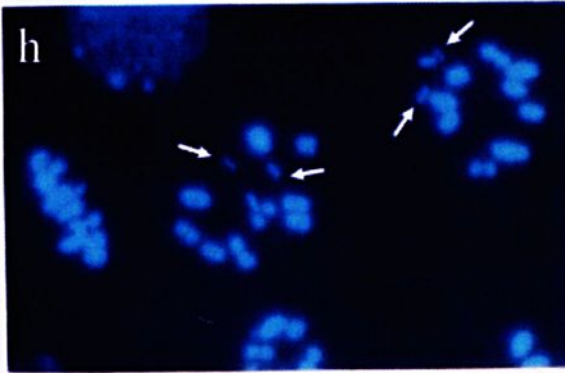
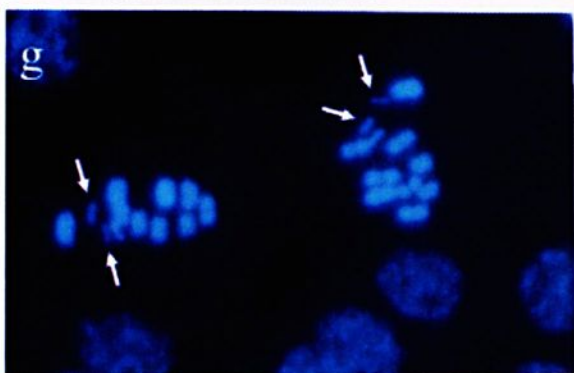
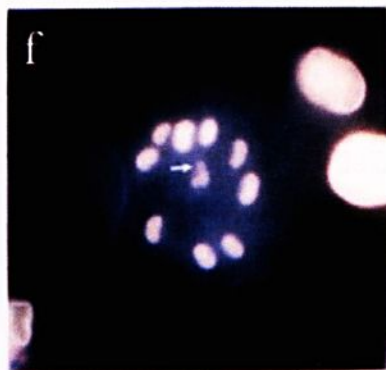
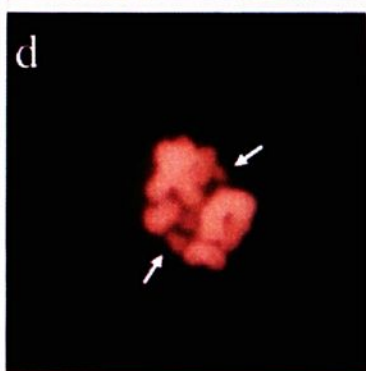
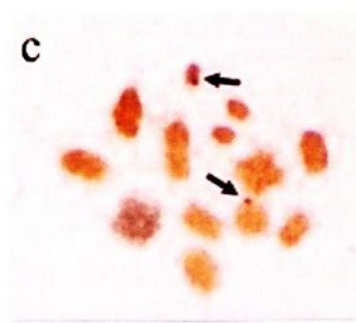
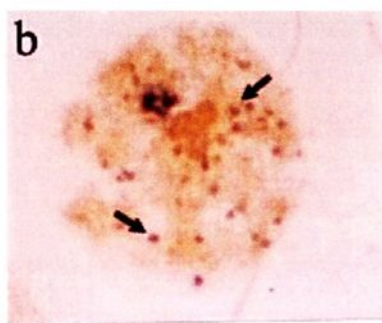
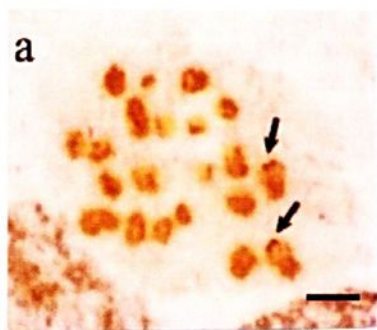


Figura 2 a-k. Túbulos seminíferos de *Rhodnius pallescens* submetidos à impregnação pelos íons prata (**a-b**); à técnica de bandamento C (**c-d**); às duplas colorações pelos fluorocromos CMA3/DA (**e-g**) e DAPI/DA (**h**) e à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 28S (**i-k**). Metáfase espermatogonial (**e**); as setas indicam cromossomos CMA⁺. Núcleo em diplóteno-diacinese (**f**); as setas indicam duas regiões CMA⁺. Metáfases de primeira (**c, d, g, h, i, j, k**) e segunda (**a,b**) divisões meióticas. Em (a,b) as setas indicam RONS nos cromossomos sexuais XY e em (c,d) indicam cromossomos e regiões heterocromáticas, sendo que em (c) os dois cromossomos sexuais (XY) apresentam-se heterocromáticos e em (d) um dos sexuais (X) está heterocromático e um dos autossomos apresenta um bloco heterocromático na região mediana do cromossomo. Em (g,h) os cromossomos corados pelos fluorocromos CMA3/DA e DAPI/DA, respectivamente, não revelaram regiões distintas. Nas figuras (i,j,k) observa-se sinais de hibridação com a sonda de DNAr nos cromossomos sexuais (XY) (setas). Bar= 10 μ m.

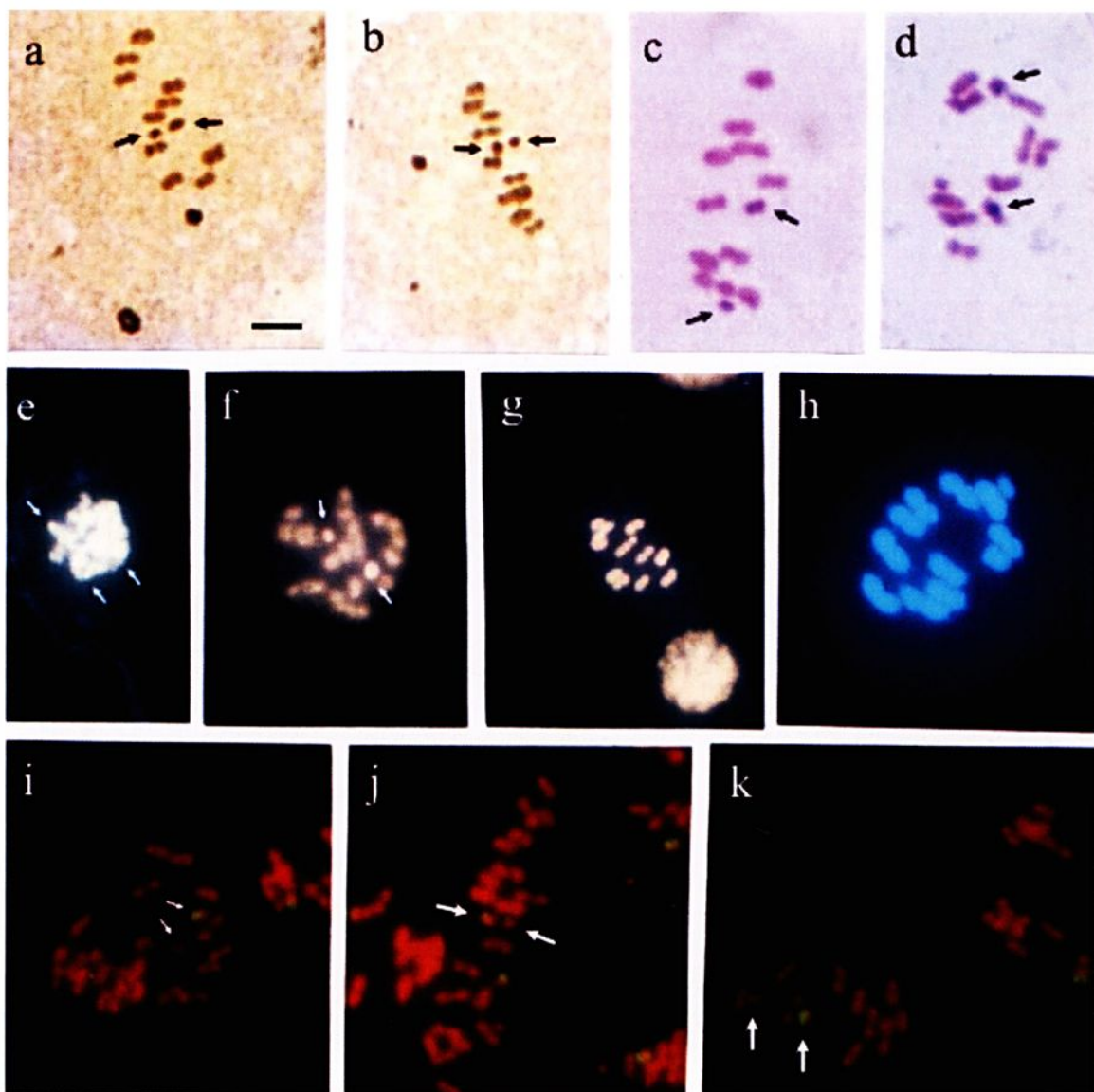
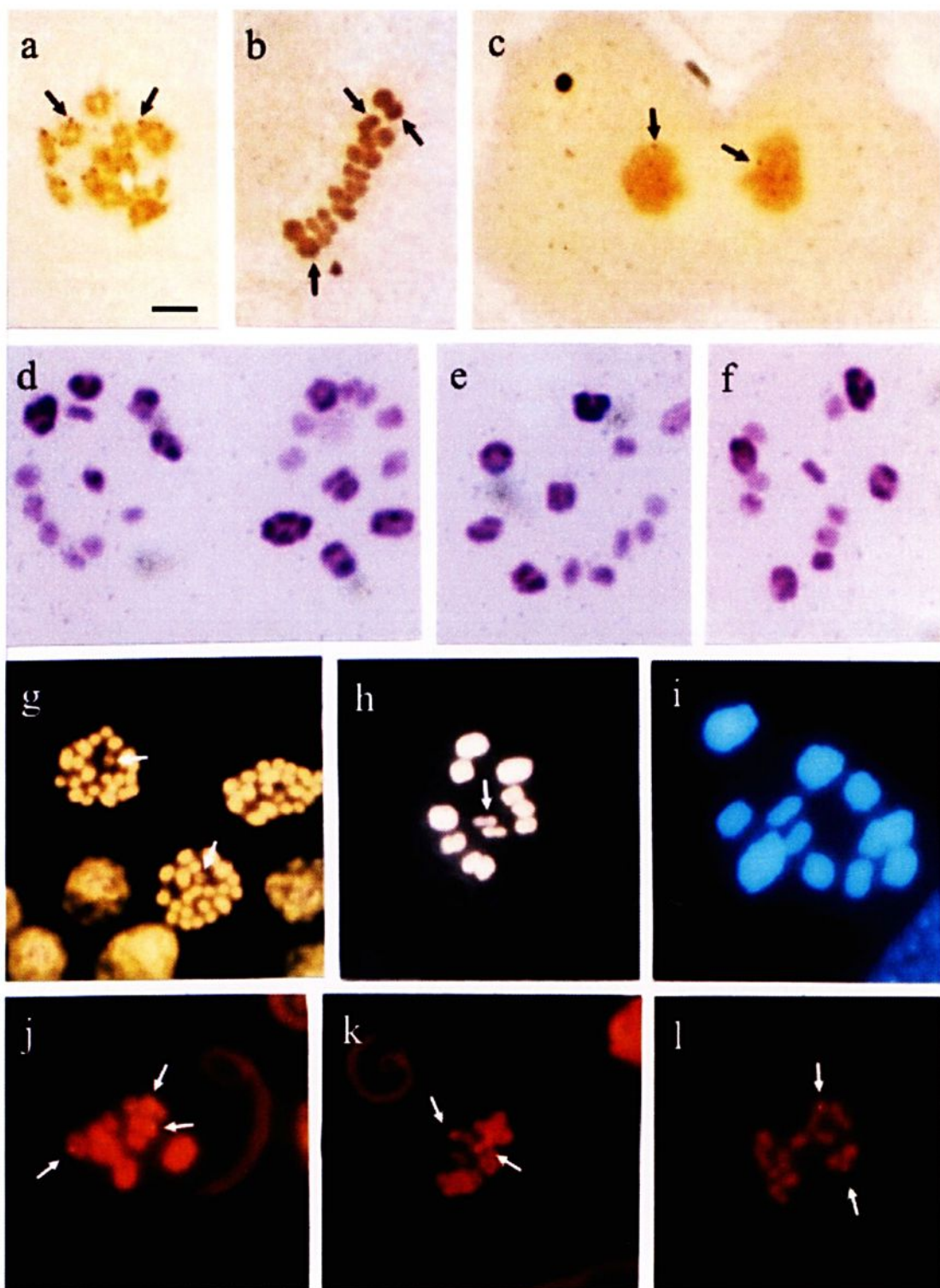


Figura 3 a-l. Túbulos seminíferos de *Triatoma infestans* submetidos à impregnação pelos íons prata (**a-c**); à técnica de bandamento C (**d-f**); às duplas colorações pelos fluorocromos CMA3/DA (**g-h**) e DAPI/DA (**i**) e à hibridação *in situ* fluorescente com sonda de DNAr 28S (**j-l**). Metáfases espermátogoniais (**g**). Núcleos em diplóteno-diacinese (**a,j**). Metáfases de primeira (**d,e,f,i**) e segunda (**h,k**) divisões meióticas. Anáfases (**c,l**). As setas em (a-c) indicam cromossomos com regiões impregnadas pelos íons prata. Em (d-f) notam-se quatro cromossomos autossomos e os dois sexuais (XY) heterocromáticos. Em (j-h) as setas indicam cromossomos CMA⁺. Em (i) a coloração pelo DAPI/DA não mostrou distinção entre os cromossomos. Em (j-l) as setas indicam regiões hibridadas pela sonda. Bar= 10 μ m.



TRABALHO III

Aspectos nucleolares na espermiogênese de triatomíneos (Heteroptera, Triatominae): análises citoquímica, histológica e ultra-estrutural

Nucleolar aspects in spermiogenesis of the triatomines (Heteroptera, Triatominae): cytochemical, hystological and ultrastructural analysis

Alessandra Morielle, Sebastião Roberto Taboga e Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira

Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Este trabalho será submetido para publicação na revista *Biology of the Cell*.



RESUMO

No presente trabalho foram realizadas análises citoquímica, histológica e ultra-estrutural em células de túbulos seminíferos das espécies de triatomíneos *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*. Os dados obtidos permitiram evidenciar o fenômeno da “persistência do material nucleolar” nas espermátides iniciais em início de diferenciação, observado como um único corpúsculo fortemente impregnado pelos íons prata ou evidenciado como um halo metacromático (técnica variante de CEC) ou como um halo vermelho (fluorocromo alaranjado de acridina). Foi verificado que durante a diferenciação, as espermátides aumentam de volume e apresentam o rompimento de sua membrana, liberando o núcleo e o *nebenkern* (acúmulo de corpúsculos residuais mitocondriais). As análises ultra-estruturais confirmaram, nas três espécies analisadas, a presença do nucléolo e dos seus produtos durante a espermiogênese, até a formação do axonema e durante a fase de elongação da espermátide. O nucléolo das espermátides iniciais apresentou aspecto reticulado, com nucleolonema bem definido, em *P. megistus*; com nítida distinção entre os componentes fibrilar e granular, em *T. infestans*; e com aspecto compacto, em *R. pallescens*. Portanto, o fenômeno da “persistência do material nucleolar” e a hipótese da reativação pós-meiótica para genes RNAr, durante a espermiogênese de triatomíneos, observada por análises citoquímicas, foram corroboradas por análises histológicas e, principalmente, ultra-estruturais. Esses achados reforçam a idéia de que a síntese de RNAr na gametogênese é um mecanismo muito antigo e, possivelmente, universal entre os organismos com reprodução sexuada.

Palavras-chaves: Espermiogênese, nucléolo, ultra-estrutura, triatomíneos.



ABSTRACT

In the present work, cytochemical, hystological and ultrastructural analyses were carried out in cells of testicular tubules in the species of triatomines, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* and *Triatoma infestans*. The data obtained supports the concept of the "persistence of the nucleolar material" in spermatids in early diferentiation, observed as a single body strongly impregnated, by silver ion, or as a halo metachromatic structure (variant CEC technique), and as a red halo (acridine orange fluorochrome). During differentiation, the spermatids increased in volume and presented the disruption of its membrane, liberating the nucleus and the *nebenkern* (mitochondrial aggregation of residual bodies). Ultrastructural analyses confirmed, in the three species analyzed, the presence of the nucleolus and its products during spermiogenesis up to the axoneme formation and during the initial phase of elongating spermatids. The nucleolus of early spermatids presented a reticulated appearance, with clear-cut nucleolonema, in *P. megistus*; and distinction between the fibrillar and granular components, in *T. Infestans* or and with a compact appearance in *R. pallescens*. Therefore, the concept of "persistence of the nucleolar material" and the hypothesis of pos-meiotic reactivation of the rRNA genes, during spermiogenesis of triatomines, as observed by cytochemical analyses were corroborated for hystological analysis and, mainly, ultrastructural methods. These results reinforce the idea that the synthesis of rRNA during gametogenesis is a very old and, possibly, a universal mechanism for organisms with sexual reproduction.

Key-words: Spermiogenesis, nucleolus, ultrastructure, triatomines.



Introdução

A espermatogênese é o processo de transformação das células primordiais, as espermatogônias, em células altamente diferenciadas, os espermatozóides. Esse processo pode ser dividido em três grandes fases: a espermiocitogênese, onde as espermatogônias originam os espermátocitos primários por divisão mitótica; a meiose, quando os espermátocitos primários dão origem aos espermátocitos secundários e, esses, subseqüentemente, às espermátides; e a espermiogênese, na qual as espermátides sofrem drásticas transformações até se tornarem células maduras (Messias Jr, 1990).

A espermatogênese em triatomíneos é considerada cística. Os cistos constituem grupos isogênicos de células onde, geralmente, uma só espermatogônia definitiva origina todo o conteúdo celular de um mesmo cisto. Dessa forma, sucessivas divisões celulares sincrônicas resultam em cistos de espermátides no mesmo estágio de diferenciação (Dunser & Davey, 1974; Schuetz, 1989).

Pode-se afirmar que os espermatozóides são células muito especializadas e altamente diferenciadas. Esses apresentam várias organelas dispersas e essenciais para o metabolismo da célula (Phillips, 1974).

Há numerosas investigações sobre os aspectos estruturais e ultra-estruturais da espermatogênese de insetos, tanto comparativas quanto citoquímicas, mas em triatomíneos, especificamente, os estudos são escassos,



principalmente quando se refere ao ciclo nucleolar e à persistência do material nucleolar durante a divisão celular e, também, durante a espermiogênese.

O fenômeno da “persistência do material nucleolar”, que é a presença do nucléolo durante a divisão celular, já foi estudado em triatomíneos ao microscópio de luz, por meio de técnicas citoquímicas, como a impregnação por íons prata e variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) (Azeredo-Oliveira, 1990; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997; Tartarotti & Azeredo-Oliveira, 1999; Morielle, 2000; Morielle & Azeredo-Oliveira, 2000; 2001a-b; 2002; 2003a-b; 2004; Severi-Aguiar *et al.*, 2002).

No entanto, pouca ênfase foi dada à presença e à atividade do material nucleolar ao longo das fases de diferenciação das espermátides. No presente trabalho, com o intuito de ampliar e corroborar os conhecimentos sobre a persistência do material nucleolar durante a espermiogênese de triatomíneos foram realizadas análises das células gaméticas dos túbulos seminíferos das espécies *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*, utilizando-se técnicas citoquímicas, histológicas e ultra-estruturais.

Material e Método

As espécies analisadas foram *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans*, pertencentes à ordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Os exemplares foram fornecidos pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) – (Araraquara, SP, Brasil)



pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, (São Paulo, SP, Brasil).

Para o emprego das técnicas citoquímicas*, os túbulos seminíferos sofreram espalhamento e fixação (Imai et al., 1988) e as lâminas foram submetidas às colorações pela variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (Mello, 1995); coloração pelo fluorocromo alaranjado de acridina (Abrams *et al.*, 1993) e impregnação pelos íons prata (Howell e Black, 1980).

Para a análise histológica e ultra-estrutural** os túbulos seminíferos desses insetos foram inicialmente fixados em glutaraldeído à 2%, paraformol 2% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.4. A seguir, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, lavado em água destilada, desidratado em seqüência crescente de acetona e incluído em Epon, sendo a polimerização da resina completada em 72 horas.

Para as análises histológicas, após a inclusão dos túbulos seminíferos, foram feitas secções de 0,5µm de espessura em ultramicrotomo e, depois, coloração com solução de Azul de Toluidina 1% e bórax 1%. Para as análises ultra-estruturais foram realizados cortes ultra-finos que, posteriormente, foram contrastados em acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo.

*/** Os protocolos detalhados das técnicas estão apresentados no Apêndice I (itens: 1,2 e 3) e no Apêndice II.



As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se os microscópios Zeiss-Jenaval, para a análise das técnicas citoquímicas e Zeiss-Axioskop, para a técnica de citogenética molecular (fluorocromo).

As eletromicrografias foram obtidas ao microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS - EM - 906, operado a 80 kV), locado no Centro de Microscopia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP (UNESP), utilizando-se filme Kodak SO-163.

Resultados

Após a impregnação pelos íons prata, que destaca as proteínas nucleolares, pôde-se observar nas espermátides iniciais a presença de um corpúsculo nucleolar marcado, indicando a persistência do material nucleolar durante a espermiogênese (Figs. 1A,B,C).

Utilizando-se o fluorocromo alaranjado de acridina, que diferencia os ácidos nucléicos - esse corante liga-se ao DNA de fita simples como um monômero, emitindo fluorescência verde/amarela, e liga-se ao DNA de fita simples ou ao RNA como um dímero, emitindo fluorescência vermelha - pôde-se observar que as espermátides, em início de espermiogênese, nas três espécies, apresentaram a cromatina compactada em tons verde/amarelo e a região nucleolar em vermelho (Figs. 1D,E,F).

Por meio da técnica da variante de CEC - que diferencia o DNA em verde e o RNA ribossômico em azul ou violeta (metacromático) - pôde-se observar que as espermátides iniciais, das espécies *P. megistus*, *R. pallescens* e



T. infestans analisadas no presente trabalho, apresentaram-se caracterizadas pela presença de um corpúsculo ou halo metacromático, indicativo de complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) pós-meióticos, visualizados pela coloração azul ou violeta. Nessas células a cromatina apresentou-se esverdeada e o RNA citoplasmático violeta (Figs. 1G,H,I).

Com base na análise histológica pode-se observar, nas três espécies analisadas, nos cistos que se encontram na zona de transformação, onde ocorre a espermiogênese, a persistência do material nucleolar nas espermátides iniciais na forma de corpúsculos. Esses corpúsculos, provavelmente, são derivados da atividade nucleolar das células meióticas. As espermátides das espécies *P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans* no decorrer da diferenciação, aumentaram de volume e apresentaram o rompimento de sua membrana nuclear liberando, assim, o núcleo e o *nebenkern* (acúmulo de corpos residuais mitocondriais) (Figs. 2A-C).

As análises ultra-estruturais possibilitaram observar, nas espermátides iniciais das três espécies analisadas (Figs. 3,4,5), a presença do material nucleolar até a fase onde começa a formação do axonema, e durante a elongação da espermátide, como observado na espécie *R. pallescens* (Figs. 4F, F').

Pode ser observado nos núcleos espermáticos, além da presença do nucléolo, algumas regiões heterocromáticas de aspecto menos elétron-denso. Nas espermátides iniciais das espécies *P. megistus* (Figs. 3A-G) e *T. infestans* (Figs. 5A-F) os nucléolos apresentaram aspecto reticulado, e, especialmente em *P.*

megistus, com a presença de nucleolonema bem definido. Na espécie *T. infestans* pode ser verificada a distinção entre o Centro Fibrilar (CF) e o Componente Granular (CG). O nucléolo da espécie *R. pallescens* (Figs. 4A-F) apresentou-se com um aspecto semelhante ao tipo de nucléolo compacto.

Observa-se, nitidamente, que durante a diferenciação espermiogênica o nucléolo, das células das três espécies, apresenta-se fragmentado, se comparado com as espermatídes iniciais, que, geralmente, apresentam nucléolos maiores (Figs. 3,4,5). Na espécie *P. megistus* foi possível observar pequenos corpúsculos elétron-densos (nucléolo fragmentado) migrando para a região do axonema (Figs. 3C,E,F,G). Na espécie *R. pallescens* esses corpúsculos estão distribuídos aleatoriamente no citoplasma (Figs. 4D,E) e, na espécie *T. infestans*, os corpúsculos posicionam-se, na maioria, na periferia do envoltório nuclear (Figs. 5D,F).

Discussão

A persistência do material nucleolar durante a espermiogênese de triatomíneos, observada por meio de análises citoquímicas, foi confirmada pelas análises histológicas e, principalmente, ultra-estruturais, realizadas no presente estudo.

As marcações argirófilas encontradas nas espermatídes iniciais, das três espécies analisadas, *P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans*, vêm corroborar a hipótese da reativação pós-meiótica dos genes para RNAr, mecanismo também observado em outros organismos. Esse fenômeno foi



corroborado, também, pela técnica da variante da Concentração Eletrolítica Crítica, na qual essas regiões ficaram nitidamente metacromáticas, e pelo fluorocromo alaranjado de acridina, que as destacou em vermelho, diferenciando-as da cromatina, que apresentou tonalidades verde/amarelo. Todos os métodos confirmaram a presença dos complexos RNA/proteínas (RNP).

Na análise histológica realizada nas células das três espécies, pode ser observada a persistência do material nucleolar nas espermatídes iniciais na forma de corpúsculos nos cistos que se encontram na zona de transformação, onde ocorre a espermiogênese. Esses corpúsculos, provavelmente, são derivados da atividade nucleolar das células meióticas. Em *Drosophila* foi verificada a presença desses mesmos corpúsculos nos núcleos das espermatídes na fase de elongação, os autores, no entanto, denominaram essa estrutura como “corpo protéico de função desconhecida” (Hales e Fuller, 1997).

As espermatídes no decorrer da diferenciação, aumentam de volume e apresentam o rompimento de sua membrana nuclear liberando, assim, o núcleo e uma estrutura descrita na literatura, denominada *nebenkern*, que, seria um acúmulo de corpos residuais mitocondriais. Estudos realizados durante a espermatogênese de *Drosophila* mostraram que, nesta espécie, a mitocôndria passa por dramáticas mudanças morfogenéticas. Nas espermatídes pós-meioticas iniciais, as mitocôndrias agregam-se no exterior de cada núcleo haplóide e fusionam-se no interior de dois derivados mitocondriais que se sobressaem, e são envolvidos mutuamente para formar o *nebenkern*, que, nesses insetos, é uma estrutura esférica (Hales e Fuller, 1997). Dumser e Davey (1974) identificaram



essa mesma estrutura na espécie *Rhodnius prolixus*. No presente trabalho foi constatado que o *nebenkern* é uma estrutura comum em triatomíneos, pois, também, foi observada nas espécies *P. megistus*, *R. pallescens* e *T. infestans*.

O nucléolo é um domínio nuclear funcional envolvido no metabolismo do RNAr. Ao microscópio eletrônico de transmissão essa organela, geralmente, apresenta, por sua vez, três domínios nucleolares: o Centro Fibrilar (CF); Componente Fibrilar Denso (CFD) e o Componente Granular (CG) (Zatsepina *et al.* 1997). A estrutura química dessas regiões compreende, basicamente, DNA – em pouca quantidade –; RNA e proteínas acídicas. O RNA associa-se às proteínas formando complexos moleculares de ribonucleoproteínas (RNPs) (Fischer *et al.*, 1991). Como o arranjo dos componentes nucleolares varia conforme o tipo celular e o grau de produção de ribossomos, algumas categorias de nucléolos foram estabelecidas de acordo com a distribuição dessas RNPs: o nucléolo reticulado, com nucleolonema; o nucléolo compacto e o nucléolo com camadas concêntricas (Thiry & Goessens, 1996; Mello, 2001).

No presente estudo foi possível evidenciar que nas espécies *P. megistus* e *T. infestans* os nucléolos das espermátides em fases mais adiantadas de diferenciação apresentaram aspecto reticulado, com a presença de nucleolonema bem definido em *P. megistus*. Na espécie *T. infestans* observou-se uma distinção mais evidente entre o Centro Fibrilar e Componente Granular. Na espécie *R. pallescens*, o nucléolo apresentou-se com aspecto compacto.

A análise ultra-estrutural forneceu também evidências da ocorrência de fragmentação e “persistência do material nucleolar” durante a fase



de espermiogênese, à semelhança do processo que ocorre durante a divisão celular.

Nas espermátides iniciais de *Oedipoda coerulescens* (Orthoptera: Acrididae), estudos ultra-estruturais mostraram um nucléolo consistindo de material fibrogranular que, durante a diferenciação, parece ser transformado em uma única massa de material fibrilar e *clusters* de corpos granulares. Esses tornam-se menores até eventualmente desaparecerem, ao passo que o material fibrilar persiste. Um comportamento similar a esse material nucleolar foi observado em microscopia de luz, no último estágio do desenvolvimento da espermátide em *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) (Rufas *et al.*, 1982).

Hofgartner *et al.* (1979) analisando quatro espécies de mamíferos (homem, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Cavia cobaya*), por meio da impregnação pelos íons prata, verificaram que ocorre o processo da reativação pós-meiótica das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Os autores constataram que as espécies exibiam um padrão muito similar de impregnação das (RONs) ao longo dos estágios da espermatogênese, sendo que os precipitados de prata podiam ser detectados desde a fase de crescimento da espermatogônia até o estágio de paquíteno da prófase meiótica I. No entanto, durante as metáfases I e II a impregnação não era mais visualizada ressurgindo somente na fase de diferenciação das espermátides e persistindo até o início da elongação.

Em vários estudos onde se analisou a espermatogênese e a oogênese nos vertebrados não mamíferos e nos mamíferos em geral, foi possível



confirmar a reativação pós-meiótica dos genes para RNAr, permitindo, assim, concluir que a síntese de RNAr na gametogênese segue o mesmo padrão em todos os vertebrados. Este padrão deve ser muito antigo em termos de evolução, pois já existia nos primitivos cefalocordados (Schmid *et al.*, 1982).

A conservação evolutiva da reativação pós-meiótica das Regiões Organizadoras Nucleolares, dos cefalocordados até o homem, indica a necessidade de RNA ribossomal pós-meioticamente sintetizado. Esse RNAr novamente sintetizado pode ser um pré-requisito para a produção de RNAm, o qual deve ser transcrito em estágios iniciais do desenvolvimento da espermátide (Schmid *et al.*, 1982).

Durante a oogênese, o fenômeno da persistência do material nucleolar, foi observado em vegetais como *Vicia faba*, em invertebrados marinhos, como o equiuróide *Urechis caupo*, no plasmódio *Physarum policephalum*, em anfíbios, como o *Xenopus laevis*, e em embriões de mamíferos, como ratos, camundongos, coelhos, eqüinos, bovinos e humanos (Das & Alfert, 1973; Tesářík *et al.*, 1986; Sato, 1988; Grøndahl *et al.*, 1996; Baran *et al.*, 1996; Verheggen *et al.*, 1998; Dundr *et al.*, 1997, 2000). De modo geral, os corpúsculos encontrados durante a oogênese, são similares aos corpúsculos nucleolares encontrados nas células mitóticas e espermatogênicas em relação à origem, estrutura e características citoquímicas e bioquímicas (Das & Alfert, 1973).

É amplamente conhecido que os precursores nucleolares fornecem a base para a formação de nucléolos, no entanto, o seu papel preciso na nucleologênese e os mecanismos que governam a reorganização nucleolar, ainda

geram discussão. A maior parte dos estudos sobre atividade gênica, durante a espermatogênese de vertebrados, ocorre em mamíferos, e grande parte desses estão restritos à demonstração da síntese de RNA pré e pós-meiótico. Alguns estudos utilizando técnicas de autorradiografia e análises ultra-estruturais demonstraram, além de uma distinta síntese de RNA pré-meiótico, uma pequena síntese pós-meiótica de RNA que declina durante os estágios mais tardios da diferenciação espermática (Schmid *et al.*, 1982).

Neste presente estudo os aspectos citoquímicos sobre a natureza dos corpúsculos nucleolares detectados nas espermátides e as análises ultra-estruturais, indicam que esses possam representar complexos RNPs que devem ser necessários nas fases iniciais da espermiogênese, quando ocorrem importantes transformações como a condensação cromatínica, formação do acrossomo e do flagelo. Esses achados permitem, portanto, reforçar a idéia de que a síntese de RNAr e o acúmulo de RNPs na gametogênese correspondem a um mecanismo muito antigo e, possivelmente, universal entre organismos com reprodução sexuada.

Referências Bibliográficas

Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). 1990. 250f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto-SP.



Baran, V; Fléchon, J.E.; Pivko, J. Nucleogenesis in the cleaving bovine embryo: immunocytochemical aspects. *Molecular Reproduction and Development*, v. 44, p. 63-70, 1996.

Casseb-Hassan, P.M. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. *HB Científica*, v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999.

Das, N.K. & Alfert, M. Prenucleolar bodies of *Urechis oocytes*. *Journal Cell Science*, 12, p. 781-797, 1973.

Dundr, M.; Meier, U.T.; Lewis, N. et al. A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma*, v. 105, p. 407-417, 1997.

Dundr, M.; Misteli, T.; Olson, M.O.J. the dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, p. 433-446, 2000.

Dunser, J.B., Davey, K.G. Endocrinological and other factors influencing testis development in *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.*, v.52, p. 1011-1022, 1974.

Hales, K.G., Fuller, M.T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. v. 90. p. 121-129, July 11, 1997.

Fischer, D.; Weisenberger, D.; Scheer, U. Review: Assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma*, v.101, p. 133-140, 1991.

Grøndahl, C. & Hyttel, P. Nucleogenesis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 769-774, 1996.

Hofgartner, F.J. et al. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in Mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma*, v. 71, p. 197-216, 1979.

Howell, W. & Black, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia*, v. 36, p. 104-105, 1980.

Imai, H.T.; Taylor, R.W. & Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japn. J. Genet.*, v. 63, p. 159-185, 1988.

Mello, M.L.S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 28, n. 2, p. 149-154, 1995.

Mello, M.L.S. Nucléolo. In: *A Célula 2001*. Editora Manole. Cap. 8, p. 101-110, 2001.

Messias Jr., N.S. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese de *Chrysomya megacephala* Fab (Diptera: Calliphoridae). 1990. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Biologia Celular) – UNICAMP, Campinas-SP.

Morielle, A. Estudo da espermatogênese em triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) com ênfase à atividade nucleolar. 2000a. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto-SP.



Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Análise da atividade nucleolar em duas espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n.3 (supplement), CA010, p.6, 2000.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Study of nucleolus and cytoplasmatic RNAs during spermatogenesis of *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). *Acta Microscopica. Proceedings of the XVIII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis*. v. 2, p. 43-44, supplement B, november 2001a.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Aspectos da nucleologênese durante a meiose de *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Heteroptera). In: Congresso Brasileiro de Genética, 47º, Águas de Lindóia, SP, 2001. CDrom, GA 097, 2001b.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Análise citoquímica da atividade nucleolar em *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). In: Congresso Regional de Histotecnologia, I, São José do Rio Preto, SP, 2002. Anais, p. 9, 2002.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Reativação pós-meiótica dos genes RNAs ribossômicos em *Rhodnius pallescens* (Triatominae - Heteroptera). In: 49º Congresso Nacional de Genética, 49º, Águas de Lindóia, SP, 2003. GA 120, 2003a.

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

Phillips, D. M. *Spermiogenesis*. Academic Press, New York, 68 pp, 1974.



- Ploton, D. et al. Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. *Chromosoma* (Berl), v. 95, p. 95-107, 1987.
- Rufas, J. S. & Gonsálvez, J. Development of silver stained structures during spermatogenesis of *Schistocerca gregaria* (Forsk) (Orthoptera: Acrididae). *Caryologia*, v. 35, n. 2, p. 261-267, 1982.
- Sato, S. Cytological evidence on the ability of the nucleolus organizing regions to assemble pre-existing nucleolar material. *Experientia*, v. 44, p. 264-266, 1988.
- Schmid, M. et al. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*, v. 86, p. 149-178, 1982.
- Schuetz, M.J.C. Estudo da espermatogênese em *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera, Reduviidae). São Paulo, SP. 1989. 71 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 1989.
- Severi-Aguiar, G.D.C.; Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Nucleolar activity during the spermatogenesis in Heteroptera. *Biocell*, v. 26, n. 2, p.303, 2002.
- Tartarotti, E. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia*, v. 52, n. 3-4, p. 177-184, 1999.
- Tavares, M.G. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Patterns of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines (Heteroptera, Reduviidae) as analysed by silver staining. *Cytobios*, v. 89, p. 93-103, 1997.



Tesarík, J.; Kopečný, V.; Plachot, M. et al. Nucleologenesis in the human embryo developing in vitro: ultrastructural and autoradiographic analysis. *Developmental Biology*, v. 115, p. 193-203, 1986.

Thiry, M. & Goessens, G. The nucleolus during the cell cycle. Springer. 146p. 1996.

Verheggen, C.; Le Panse, S.; Almouzni, G.; Hernandez-Verdun, D. Presence of pre-rRNAs before activation of polymerase I transcription in the building process of nucleoli during early development of *Xenopus laevis*. *The Journal of Cell Biology*, v. 142, n. 5, p. 1167-1180, 1998.

Wachtler, F. & Stahl, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron*, v. 24, n. 5, p. 473-505, 1993.

Zatsepina, O.V. et al. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma*, v. 105, n. 7-8, p. 418-430, 1997.



Figura 1 (A-I). Espermátides em início de espermiogênese de *Panstrongylus megistus* (A,D,G), *Rhodnius pallescens* (B,E,H) e *Triatoma infestans* (C,F,I) submetidas às técnicas de colorações pela impregnação pelos íons prata (A-C); pelo fluorocromo alaranjado de acridina (D-F) e pela variante da técnica da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (G-I). Observar, nas células coradas pelo fluorocromo alaranjado de acridina, a coloração vermelha indicativa da presença de RNA (nucléolo) e as colorações verde e amarela indicativas de DNA (cromatina/heterocromatina). Notar que as células submetidas à técnica variante de CEC apresentaram o RNA corado em azul ou violeta e o DNA corado em verde. (A-C) As setas indicam um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata indicativo da persistência do RNAr pós-meiótico. (D-I) As setas indicam a persistência do RNAr. Bar= 10 μ m.



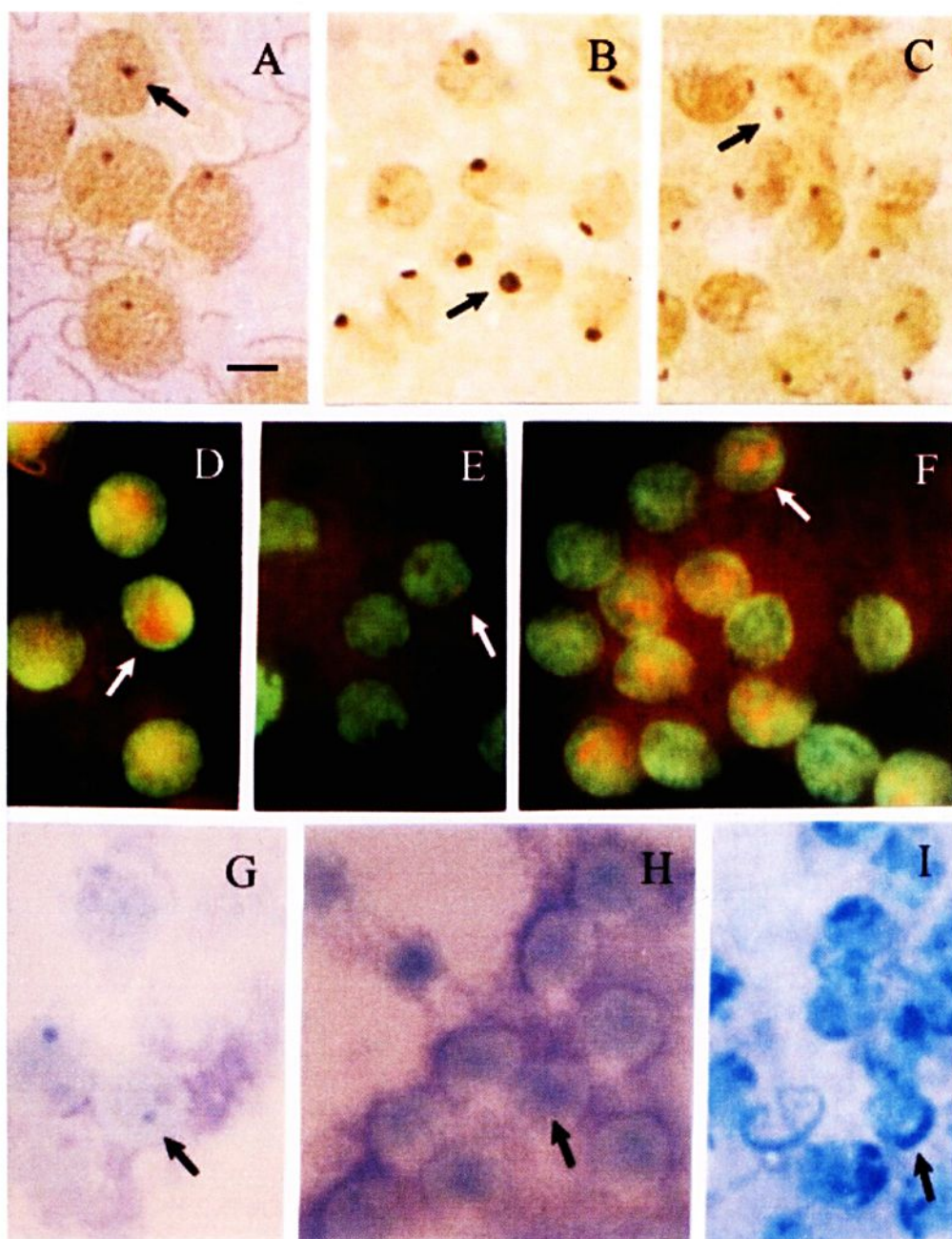


Figura 2 (A-C). Aspecto geral dos cortes histológicos dos túbulos seminíferos das espécies *Panstrongylus megistus* (A), *Rhodnius pallescens* (B) e *Triatoma infestans* (C), submetidos à técnica de coloração pelo Azul de Toluidina e Bórax, onde está evidenciada a região do cisto com células em espermiogênese. Os asteriscos (*) indicam o *nebenkern*. Bar= 10 μ m.



T. 1344/05



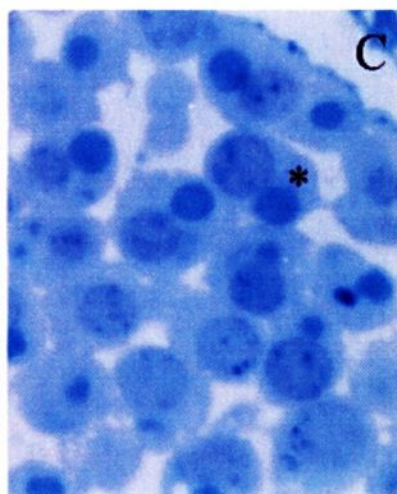
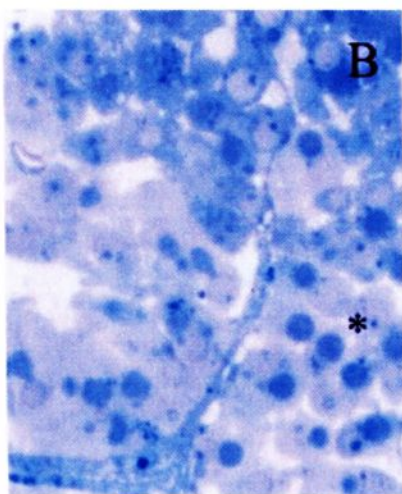
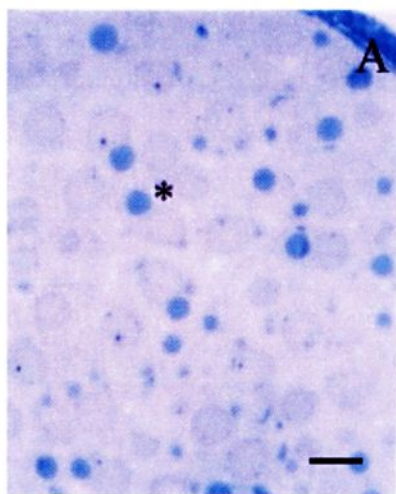


Figura 3 (A-G). Ultra-estrutura das células dos túbulos seminíferos de *Panstrongylus megistus*. Eletromicrografia das espermátides iniciais, onde são observados os nucléolos (nu), a heterocromatina (h), o derivado mitocondrial (md) e o axonema (ax). Observar que o nucléolo apresenta aspecto reticulado com a presença evidente de nucleolonema. As setas em (A) indicam os complexos de poro do envoltório nuclear. Notar a fragmentação nucleolar (E,F) e a presença desses fragmentos até a fase da formação do axonema (G). Bars: A,B,C,E,F,G = 0,56 μm e D= 0,93 μm .

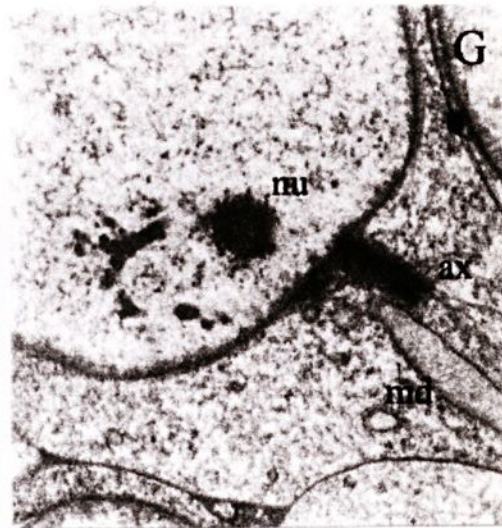
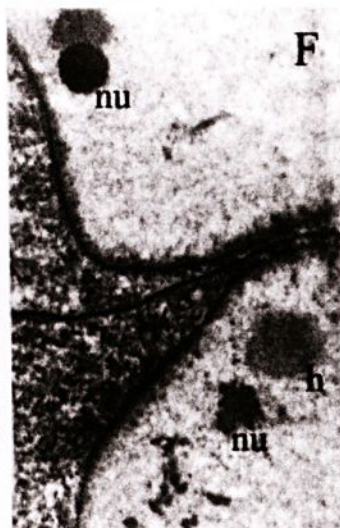
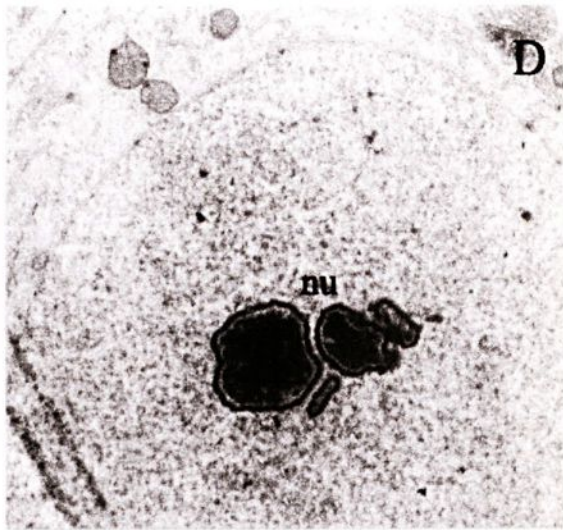
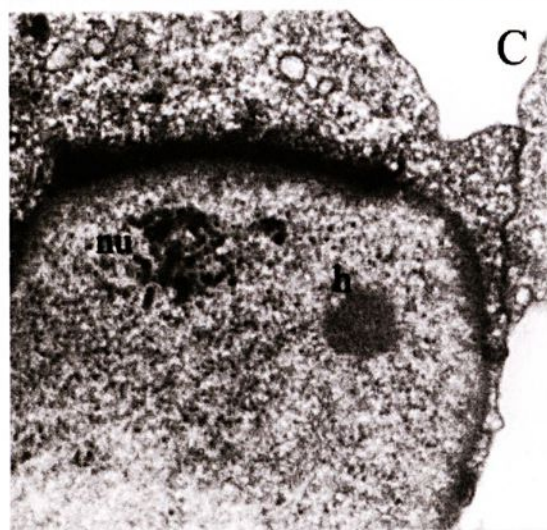
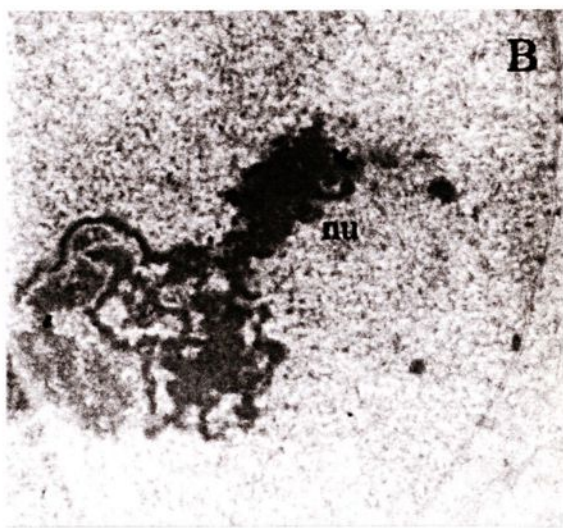
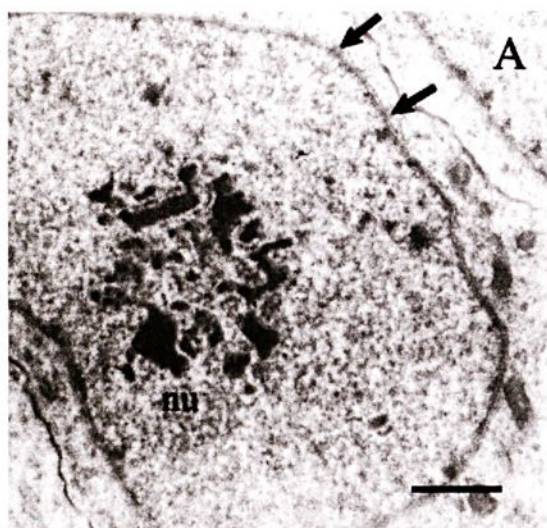


Figura 4 (A-F). Ultra-estrutura das células dos túbulos seminíferos de *Rhodnius pallescens*. Eletromicrografia das espermátides iniciais (A-E) e em estágio de alongação (F), onde são observados os nucléolos (nu), a heterocromatina (h), o derivado mitocondrial (md) e o axonema (ax). Observar o aspecto compacto do nucléolo. Os asteriscos (*) indicam os fragmentos nucleolares. Notar a fragmentação nucleolar e a permanência dos corpúsculos nucleolares até a fase de alongação da espermátide – espermátide intermediária (F). Em (F') nota-se outro plano de corte onde o corpúsculo nucleolar também é evidente. Bars: A,B,D,F= 0,56 μm e C,E,F'= 1,56 μm .

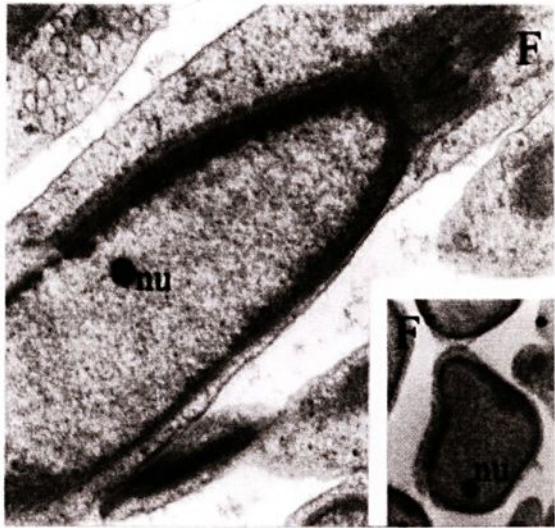
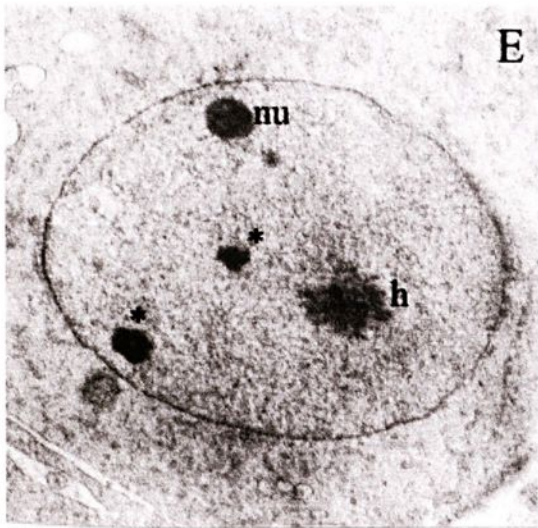
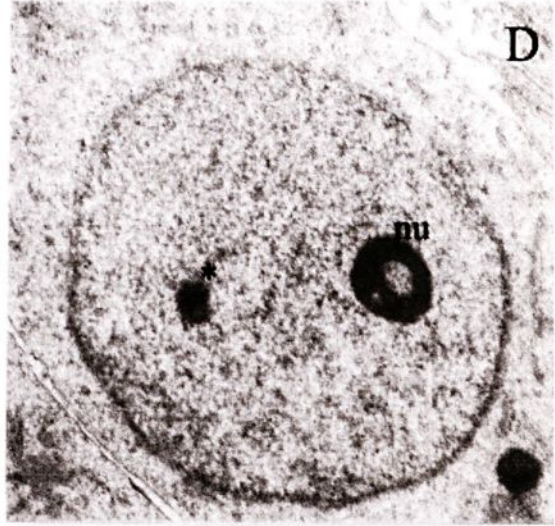
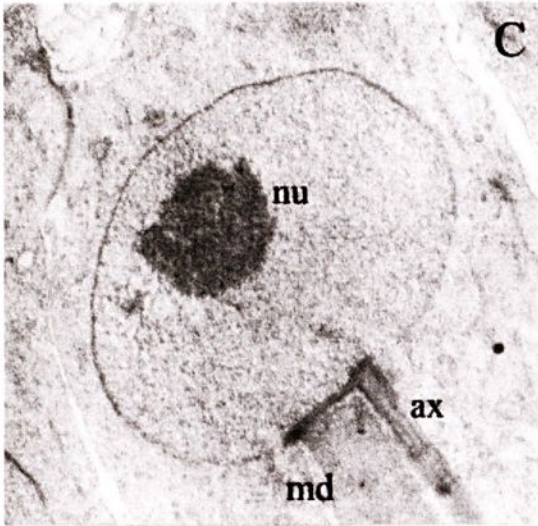
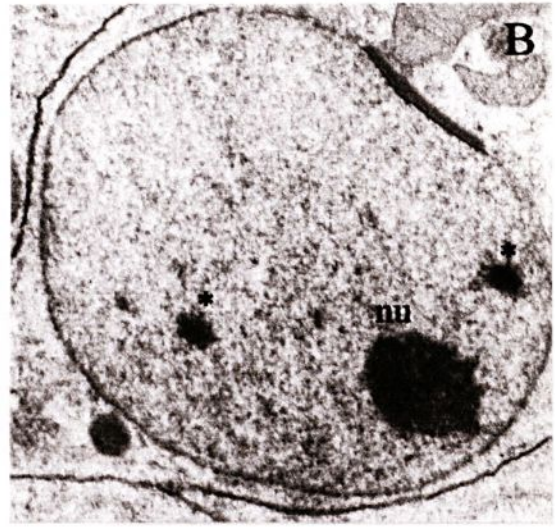
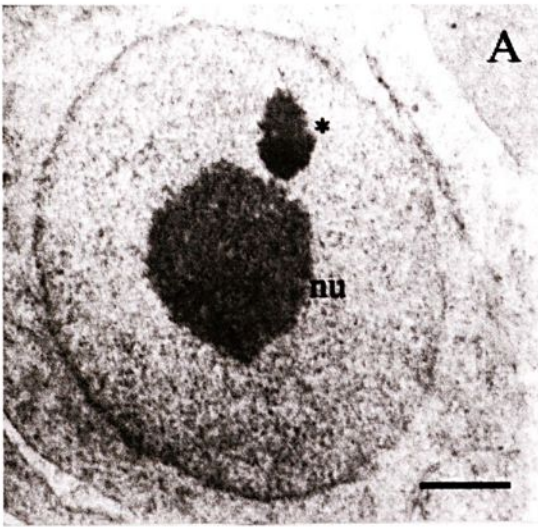
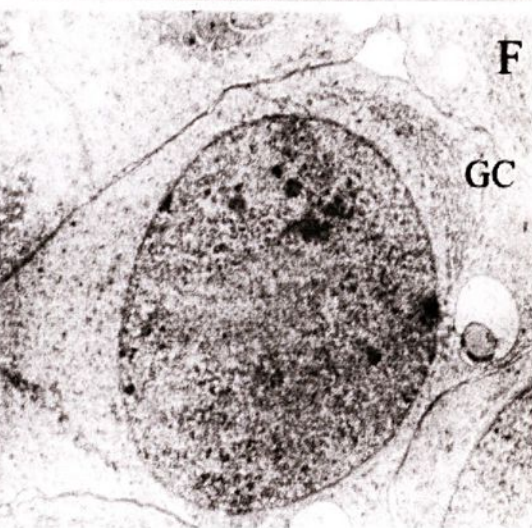
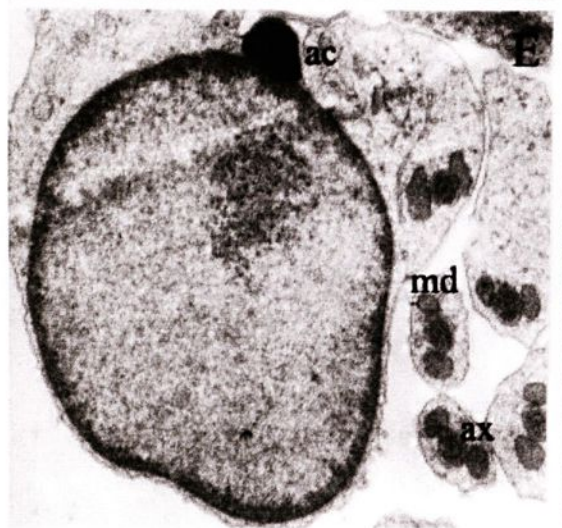
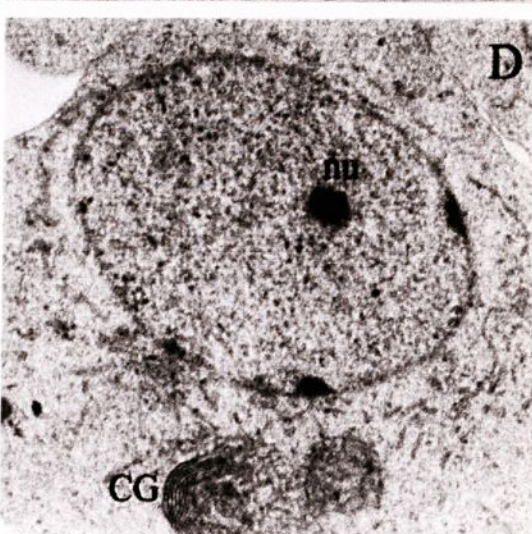
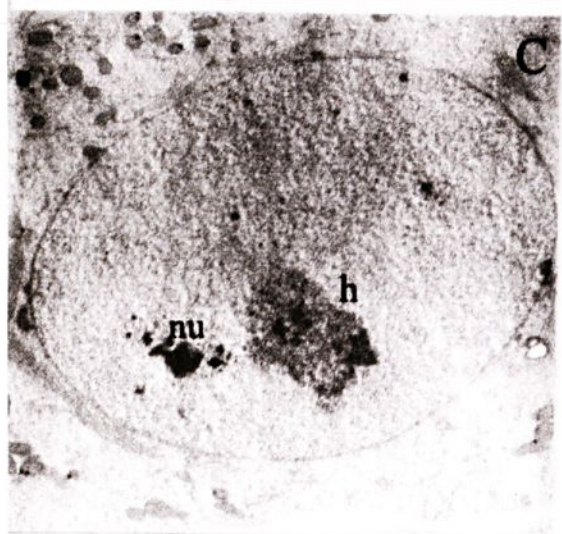
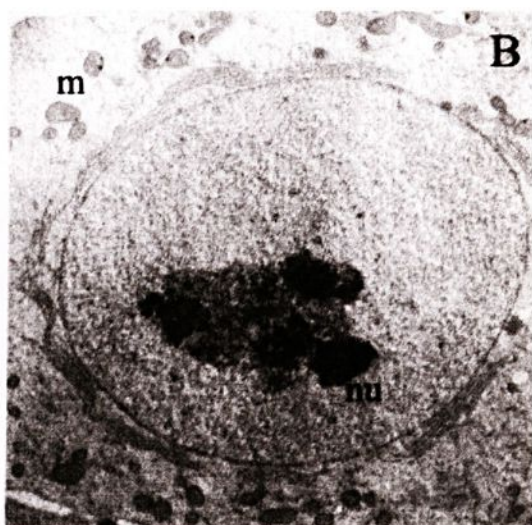
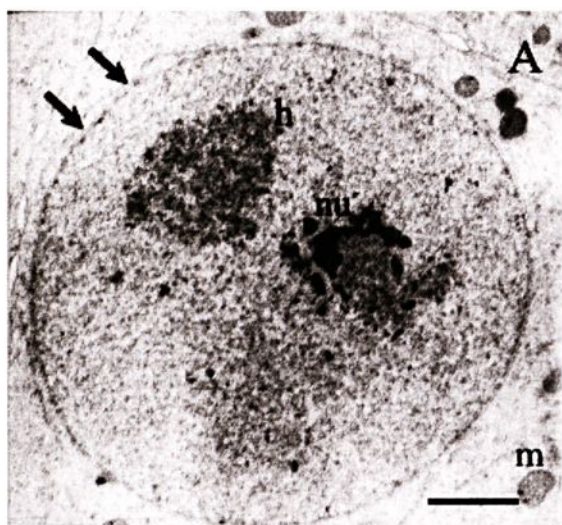


Figura 5 (A-F). Ultra-estrutura das células dos túbulos seminíferos de *Triatoma infestans*. Eletromicrografia das espermatídes iniciais, onde são observados os nucléolos (nu), a heterocromatina (h), a mitocôndria (m), os Complexos de Golgi (GC), o derivado mitocondrial (md), o axonema (ax) e o acrossomo (ac). As setas em (A) indicam os complexos de poro do envoltório nuclear. Notar a distinção entre o centro fibrilar e o componente granular do nucléolo de aspecto reticulado e a fragmentação nucleolar. Os fragmentos nucleolares posicionam-se preferencialmente na periferia do envoltório nuclear das espermatídes. Bars: D,E= 0,72 μm ; F= 0,93 μm e A,B,C= 1,21 μm .



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.C. Análise da produção leiteira e da eficiência dos animais leiteiros de duas espécies de caprinos (Capra hircus e Ovis montanus) submetidos a diferentes níveis de alimentação. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. M² dependência entre produção e eficiência alimentar em caprinos leiteiros. Rev. bras. Zootec. 31, 2, p. 273-280, 1994.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

Almeida, M.C. e Silva, M.L.S. Efeito da ingestão de alimentos sobre a eficiência alimentar em caprinos leiteiros. (Trabalho em andamento). São José do Rio Preto, SP, 1994. 23p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Instituto de Biociências, Botucatu e Ribeirão Preto.

5. Referências Bibliográficas

Almeida, M.C. Análise citogenética fotônica e ultra-estrutural das células testiculares de duas espécies de coleoptera, *Epicauta atomaria* (Meloidae) e *Palembus dermestoides* (Tenebrionilae), portadoras de sistema de determinação sexual do tipo X_{yp} . Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), UNESP/Rio Claro, 156p. 1996.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. & Mello, M.L.S. Mg^{+2} dependent ATPase activity investigated in heterochromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. Rev. Bras. Genética, XI, v. 2, p. 223-229, 1986.

Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). São José do Rio Preto, SP. 1990, 250p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

Brow, S.N. Heterochromatin. Science, v.151, p. 417-425, 1966.

Casseb-Hassan, P.M. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. HB Científica, v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999.

Clak, MS.; Wall, W.J. Chromosomes. The complex code. London: Chapman & Hall, 1996, 345p.

Das, N.K. & Alfert, M. Prenucleolar bodies of *Urechis oocytes*. Journal Cell Science, 12, p. 781-797, 1973.



De Vaio, E.S.; Grucci, B.; Castagnino, A.M. *et al.* Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica*, v. 67, p. 185-191, 1985.

Dundr, M.; Meier, U.T.; Lewis, N. *et al.* A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromosoma*, v. 105, p. 407-417, 1997.

Dundr, M.; Misteli, T.; Olson, M.O.J. the dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, p. 433-446, 2000.

Fakan, S. & Hernandez-Verdun, D. The nucleolus and nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell*, v. 56, p. 189-206, 1986.

Flechon, J.E. & Kopecny, V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote*, v. 6, p. 183-191, 1998.

Fischer, D.; Weisenberger, D.; Scheer, U. Review: assigning functions to nucleolar structures. *Chromosoma*, v.101, p. 133-140, 1991.

González-Garcia, J.M. & Rufas, J.S. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma*, v. 104, p. 287-297, 1995.

Grøndahl, C. & Hyttel, P. Nucleologensis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 769-774, 1996.

Hughes-Schrader, S. & Schrader, F. The kinetochore of the hemiptera. *Chromosoma (Berl.)*, v. 12, p. 327-350, 1961.



Imai, H.T.; Taylor, R.W. & Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japn. J. Genet.*, v. 63, p. 159-185, 1988.

Jiménez-García, L.F; Rothblum, L.I. *et al.* Nucleologenesis: use of non-isotopic in situ hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biology of the Cell*, v. 65, p. 239-246, 1989.

John, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. *Heterochromatin: Molecular and structural aspects*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 301p.

Lamond, A.I. & Earnshaw, W.C. Structure and function in the nucleus. *Science*, v. 280, p. 547-553, 1998.

Leite-Silva, C.; Santos, N. *et al.* Karyotypic characterization of the bat species *Molossus ater*, *M. Molossus* and *Molossops planirostris* (Chiroptera, Molossidae) using FISH and banding techniques. *Hereditas*, v. 138, p. 94-100, 2003.

Lent, H. & Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of the Natural History*, New York, v. 163, n. 3, 520p., 1979.

Lent, H.; Jurberg, J. & Galvão, C. *Rhodnius stali* n. sp., afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 605-614, 1993.



Lent, H.; Jurberg, J. *et al.* *Triatoma melanosoma*, novo status para *Triatoma infestans melanosoma*. Matínez, Olmeda & carcavallo, 1987 (Hemiptera, reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 89, p. 353-358, 1994.

Lent, H.; Jurberg, J. *et al.* *Belminus laportei* sp. n. da região Amazônica (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 90, p. 33-39, 1995.

Lewin, B. Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1994, 1273p.

Maffei, E.M.; Pompolo, S.G. *et al.* Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). Hereditas, v. 135, n. 1, p. 13-18, 2001.

Martínez, A.; Carcavallo, R.U. & Jurberg, J. *Triatoma gomeznunezia* new species of Triatomini from Mexico (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomologia Y Vectores 1, p. 15-19, 1994.

Mampumbu, A.R. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Tese de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular. UNICAMP/Campinas, 2002. 55p.

Mello, M.L.S. Heterocromatina. Ciência e Cultura, v. 1, n.2, p. 97-102, 1978.

Mello, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. Histochem. J., v. 15, p. 739-751, 1983.

Mello, M.L.S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. Acta Histochem. Cytochem., v. 28, n.2, p. 149-154, 1995.



Mello, M.L.S. Nucléolo. In: _ A Célula 2001. Editora Manole. Cap. 8, p. 101-110, 2001.

Mello, M.L.S. & Recco-Pimentel, S.M. Response to banding and Hoechst 33258 treatment in chromocentres of the malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. Cytobios, v. 52, p. 175-184, 1987.

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

Morielle, A. Estudo da espermatogênese em triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) com ênfase à atividade nucleolar. São José do Rio Preto, S.P., 2000. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Análise da atividade nucleolar em duas espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae). Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 3 (supplement), CA 010, p. 6, 2000.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Study of nucleolus and cytoplasmatic RNAs during spermatogenesis of *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). Acta Microscopica, v. 2, p. 43-44 (supplement B), 2001a.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Aspectos da nucleologênese durante a meiose de *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Heteroptera). In: Congresso Nacional de Genética, 47º, Águas de Lindóia, SP. CDrom, GA 097, 2001b.



Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Análise citoquímica nucleolar em *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). In: Congresso Regional de Histotecnologia, I, São José do Rio Preto, SP. Anais, p. 9, 2002.

Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Reativação pós-meiótica dos genes RNAs ribossômicos em *Rhodnius pallescens* (Triatominae, Heteroptera). In: Congresso Nacional de Genética, 49º, Águas de Lindóia, SP. CDrom, GA 120, 2003.

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

Moura, R.C.; Souza, M.J.; Melo, N.F.; Lira-Neto, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). Hereditas, v. 138, p. 200-206, 2003.

Ochs, R.L.; Lischwe, M.A.; Schen, E. *et al.* Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. Chromosoma, v. 92, n.5, p. 330-336, 1985.

Olson, M.O.J.; Dundr, M. & Szebeni, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. Trends in Cell Biology, v. 10, p. 189-196, 2000.

Pardue, M.L. & Henning, W. Heterochromatin: junk or collectors item? Chromosoma, v. 100, p. 3-7, 1990.

Parise-Maltempi, P.P. & Avancini, R.M.P. C-banding and FISH in chromosomes of the blow flies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, n.3, p. 371-377, 2001.



Pessôa, S. B. & Martins, A. V. Parasitologia Médica, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

Ploton, D.; Thiry, M. *et al.* Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. *Chromosoma (Berl.)*, v. 95, p. 95-107, 1987.

Panzer, F.; Alvarez, F.; Sanches-Rufas, J. *et al.* C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Genome*, v. 35, p. 1068-1074, 1992.

Panzer, F.; Pérez, R.; Hornos, S. *et al.* Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 4, p. 515-518, 1996.

Papeschi, A.G. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosome of *Belostoma axyrum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Cytologia*, v. 60, p. 291-295, 1995.

Pérez, R.; Panzer, Y.; Scafiezzo, S., *et al.* Cytogenetics as a tool triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, n. 3, p. 353-361, 1992.

Phillips, D.M. & Phillips, S.G. Repopulation of postmitotic nucleoli by preformed RNA. II. Ultrastructure. *J. Cell Biol.*, v. 58, p. 54-63, 1973.

Puvion-Dutilleul, F.; Bachellerie, J.P.; Puvion, E. Nucleolar organization of HeLa cells as studied by in situ hybridization. *Chromosoma*, v. 100, p. 395-409, 1991



Rocha, M.P.; Pompolo, S.D. *et al.* DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, v. 136, n.1, p. 19-27, 2002.

Rocha, M.P.; Cruz, M.P. *et al.* Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas*, v. 138, p. 133-137, 2003.

Sato, S. Cytological evidence on the ability of the nucleolus organizing regions to assemble pre-existing nucleolar material. *Experientia*, v. 44, p. 264-266, 1988.

Schrader, F. The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. *Evolution*, p. 134-142, 1947.

Schmidt, E.R.; Keyl, H.G.; Hankeln, I. In situ localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus*. *Chromosoma*, v. 96, p. 353-359, 1988.

Schwarzacher, H.G. & Wachtler, F. The nucleolus. *Anat. Embryol.*, v. 188, p. 515-536, 1993.

Schreiber, G.; Carvalho, H.C. & Espinola, H.N. Genetics of *Triatoma* and other vector species. In: Genetics of insect vector of disease. s.l. : Elsevier Publ. Cy. Amsterdam, 1967. v. 1, cap. 14, p. 149.

Schreiber, G.; Salles, J.M.; Martins, P.R. *et al.* Alterações da espermatogênese conseqüente à hibridação interespecífica ou por efeito de radiação em Triatominae. *Ciência e Cultura*, v. 10, p. 1140-1141, 1975.



Schreiber, G.; Salles, J.M.; Martins, P.R. *et al.* Cytogenetics of Triatominae (Hemiptera: Heteroptera). VI: Effect of radiations on spermatogenesis. Rev. Bras. Biol., v. 37, n.1, p. 139-145, 1977.

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, S.P. 2001, 191p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

Severi-Aguiar, G.D.C.; Morielle, A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Nucleolar activity during the spermatogenesis in Heteroptera. Biocell, v. 26, n. 2, p. 303, 2002.

Sumner, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Research, v. 75, p. 304-306, 1972.

Sumner, A.T. Chromosome banding. Ldon: Unwin Hyman. 1990. 434p.

Swarca, A.C.; Fenocchio, A.S. et al. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). Genetica, v. 119, n. 1, p. 87-92, 2003.

Tartarotti, E. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. Caryologia, v. 52, n.3-4, p. 177-184, 1999.

Tartarotti, E. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. Restriction endonuclease banding and digestion resistant heterochromatin in triatomines, genus *Panstrongylus*. Caryologia, v. 53, n. 3-4, p. 235-243, 2000.



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

Therman, E. & Susman, N. Human chromosomes: structure, behavior, and effects. New York: Springer-Verlag, 1993, 376p.

Tesarík, J.; Kopečný, V.; Plachot, M. *et al.* Nucleologenesis in the human embryo developing in vitro: ultrastructural and autoradiographic analysis. *Developmental Biology*, v. 115, p. 193-203, 1986.

Thiry, M. New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 6195-6200, 1992.

Thiry, M. & Goessens, G. The nucleolus during the cell cycle. Springer. 146p. 1996.

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

Vanzela, A.L.L. & Guerra, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 2, p. 453-456, 2000.

Verheggen, C.; Le Panse, S. *et al.* Presence of pre-rRNAs before activation of polymerase I transcription in the building process of nucleoli during early development of *Xenopus laevis*. *The Journal of Cell Biology*, v. 142, n. 5, p. 1167-1180, 1998.



- Verma, R.S. Heteromorphism of heterochromatin. In: Verma, R.S. (ed). Heterochromatin: molecular and structural aspects. Cambridge, New York: Cambridge University, 1988. 301p.
- Vitturi, R.; Colomba, M. *et al.* Chromosome analysis using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization in *Cerithium vulgatum* (Gastropoda: Cerithiidae). *Hereditas*, v. 137, p. 101-106, 2002.
- Wachtler, F. & Stahl, A. The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron*, v. 24, n. 5, p. 473-505, 1993.
- White, M.J.D. Endomitosis and endopolyploidy. I: Animal cytology and evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. Cap. 3, p. 75-86.
- Whiting, J.H.Jr.; Farmer, J. L. & Jeffrey, D.E. Improved in situ hybridization and detection of biotin-labelled *D. melanogaster* DNA probes hybridized to *D. virilis* salivary gland chromosomes. *Dros. Info. Serv.*, v. 66, p. 170-171, 1987.
- Whiting, J.H.Jr.; Pliley, M.D. *et al.* In situ hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis*. *Genetics*, v. 122, p. 99-109, 1989.
- Zatsepina, O.V.; Dudnic, O.A. *et al.* Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma*, v. 105, n. 7-8, p. 418-430, 1997.



4. CONCLUSÕES GERAIS

4. Conclusões gerais

Os resultados obtidos no presente estudo sobre os aspectos nucleolares e sobre a estrutura cromossômica em três gêneros distintos de triatomíneos – *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens* e *Triatoma infestans* – por meio de técnicas citoquímicas, de citogenética molecular, de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e da técnica convencional de ultra-estrutura, corroboraram e ampliaram os conhecimentos sobre a atividade nucleolar e a estrutura citogenética desses insetos hematófagos, agentes causais da doença de Chagas.

Em relação à contribuição científica dos trabalhos resultantes deste estudo, podem ser destacados, principalmente, os seguintes aspectos:

1. A persistência do material nucleolar, ao longo da espermatogênese, após a sua desorganização no início da prófase I, é detectada sob formas variadas e em diferentes localizações:

- corpúsculos pré-nucleolares (PNBs) (citoplasma das células profásicas; metafásicas, anafásicas e telofásicas);
- corpúsculos argirófilos aderidos à superfície cromossômica, semelhante à uma “bainha pericromossomal”;
- próximo às Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) dos cromossomos em fase adiantada de condensação;
- no núcleo das espermátides nas fases iniciais da diferenciação de espermátide a espermatozóide.



2. A reativação pós-meiótica dos genes para RNA ribossômico (RNAr) foi constatada nas espermátides das fases iniciais da espermiogênese, por meio das marcações fluorescentes, argirófilas e das análises ultra-estruturais que evidenciaram corpúsculos ricos em ribonucleoproteínas (RNPs). Esses complexos de RNA/proteínas (RNPs) devem ser necessários para os mecanismos de diferenciação celular que ocorrem na espermátide até espermatozóide.

3. A diferenciação da estrutura química das regiões heterocromáticas, dos cromossomos meióticos, com base nas técnicas de bandamento C e de duplo bandamento fluorescente (CMA3/DA e DAPI/DA), indica que a composição de bases dessas regiões apresenta-se heterogênea entre os gêneros analisados. Pode ser inferido que essa heterogeneidade na localização da heterocromatina representa uma importante característica do processo evolutivo de especiação que ocorreu entre as diversas espécies de triatomíneos, fornecendo a base para a diferenciação entre os gêneros.

4. A espécie *P. megistus* (X_1X_2Y) apresentou, nas metáfases de primeira e segunda divisões meióticas, um cromossomo sexual $CMA^-/DAPI^+$, indicando que esses cromossomos possuem regiões ricas em bases CG. Em *R. pallescens* os cromossomos das metáfases espermatogoniais e da prófase I, durante o “estádio difuso”, também apresentaram regiões CMA^+ ricas em CG, ao contrário da espécie *T. infestans* (XY) que apresentou alguns cromossomos das metáfases

espermatogoniais e um de seus sexuais, em metáfase de primeira divisão meiótica, CMA⁺, caracterizando regiões com poucas bases CG.

5. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) permitiu localizar os sítios ativos de DNAr, homólogos à sequência 28 S, nos cromossomos autossomos nas espécies *P. megistus* e *T. infestans* e nos sexuais da espécie *R. pallescens*. Foi possível constatar precisamente algumas correspondências entre as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), impregnadas pelos íons prata, e as regiões marcadas pela sonda de DNA ribossômico (DNAr), nas três espécies analisadas.

6. A espécie *Rhodnius pallescens*, apresentou correspondência de dados entre as técnicas de impregnação pelos íons prata, banda C e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Em *Panstrongylus megistus* houve similaridade entre as marcações obtidas pela banda C e os fluorocromos CMA3/DA e DAPI/DA, e entre as obtidas pelos íons prata e os sinais de hibridação. Em *Triatoma infestans* a similaridade de marcações ocorreu somente entre as técnicas CMA3, impregnação pelos íons prata e hibridação.

As características diferenciais e semelhantes na quantidade e na sequência de bases da heterocromatina, assim como na variabilidade da localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), encontradas no presente estudo, reforçaram e ampliaram os conceitos sobre a evolução dos triatomíneos.

6. APÊNDICES

I- Microscopia de Luz

1. Preparação citológica para microscopia de luz

Para a preparação das lâminas utilizou-se a técnica descrita por Imai *et al.* (1988), com modificações.

Após a dissecação dos triatomíneos adultos, em solução fisiológica Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945), sob o microscópio estereoscópico, retirou-se os testículos, que foram transferidos para uma lâmina limpa contendo solução fisiológica, para a separação dos túbulos seminíferos. Em seguida, esses túbulos foram submetidos a uma série de três fixadores: I (água destilada: etanol: ácido acético, 4:3:3); II (etanol: ácido acético, 1:1) e III (100% ácido acético). O material foi dissociado no fixador I, com o auxílio de um bastão de vidro. Adicionou-se o fixador II, em seguida, drenando-se a lâmina com papel filtro e, logo após, adicionou-se algumas gotas do fixador III, também, drenando-se a lâmina com uso de papel filtro. Deixou-se a lâmina secar ao ar.



2. Técnicas citoquímicas

2.1. Impregnação pelos íons prata (Howell & Black, 1980)

Sobre o material fixado na lâmina, foi adicionada uma gota de solução reveladora e duas gotas de solução de nitrato de prata a 50%.

Após essa etapa, a lamínula foi colocada sobre o material e a lâmina foi levada à estufa pré-aquecida a 70°C por, aproximadamente, 10 minutos, em placa de Petri forrada com papel filtro umedecido com água destilada.

Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada e, seca à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a lâmina foi montada com verniz cristal.



2.2. Coloração por Azul de Toluidina (AT) e Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (variante de CEC) (Vidal & Mello, 1987)

O procedimento dessa técnica compreende a preparação do corante Azul de Toluidina a 0,025% diluído em tampão McIlvaine pH 4,1. O tampão foi preparado com 0,1 M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato dissódico. A lâmina, contendo o material fixado, foi submetida a esse corante por 15 minutos e, então, lavada em água destilada rapidamente. Uma lâmina era utilizada como controle e outra era submetida à técnica variante de CEC.

A técnica variante de CEC consiste em mergulhar a lâmina, já corada com o AT, em uma solução de cloreto de magnésio a 0,05 M (0,50g de $MgCl^{2+}$ em 50 ml de água destilada). O tempo de exposição do material nessa solução variou de 2, 9 e 15 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada e montada em verniz cristal.

Com esse procedimento os corpúsculos nucleolares e o RNA citoplasmático ficam totalmente metacromáticos (azuis), enquanto que o DNA atinge o ponto de CEC (esverdeado). Na lâmina controle o material permanece metacromático.



2.3. Bandamento C (Sumner, 1972)

O material fixado na lâmina foi submetido a uma hidrólise ácida com ácido clorídrico (HCl) 0,2 N, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, e, então, lavado rapidamente em água destilada. Após esse procedimento, o material foi tratado com Hidróxido de Bário a 5%, a 60°C, durante 40 minutos, e lavado rapidamente em HCl 0,2 N e água destilada. Posteriormente, foi incubado em solução salina 2xSSC a 60°C, durante 1 hora, e lavado em água destilada. Após a secagem da lâmina em temperatura ambiente, o material foi submetido à solução de Giemsa a 7%, durante 15 minutos e, novamente, a lâmina foi seca à temperatura ambiente.

3. Técnicas de citogenética molecular*

3.1. Coloração pela Cromomicina A3/Distamicina A (CMA3/DA) (Schweizer, 1980)

Sobre o material fixado na lâmina foram adicionados 100 µl de solução de RNase. Após essa etapa, a lamínula foi colocada sobre o material e a lâmina foi levada à estufa pré-aquecida a 37°C, por 30 minutos, em placa de Petri forrada com papel de filtro, umedecido com 2xSSC.

Em seguida, o material foi lavado em água destilada e a lâmina seca à temperatura ambiente. Após esse procedimento foram adicionados 100 µl de distamicina (0,3 mg/ml) sobre o material e, posteriormente, a lamínula foi colocada sobre a lâmina que permaneceu no escuro por 15 minutos. Após esse período, a lâmina foi lavada em água destilada, mergulhada em tampão McIlvaine por 15 minutos e seca à temperatura ambiente.

Após essa fase, foram adicionados 100 µl de solução de cromomicina A3 (0,5 mg/ml) sobre o material e, posteriormente, a lamínula foi colocada sobre a lâmina que permaneceu no escuro por 60 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada, mergulhada em tampão McIlvaine por 15 minutos e seca à temperatura ambiente.

* As análises das lâminas foram realizadas ao microscópio de fluorescência Zeiss-Axioskop ou Olympus utilizando-se filtros apropriados para cada técnica empregada.



A lâmina foi montada com glicerol, colocada em laminário, forrada com papel alumínio ou similar, para impedir a entrada de luz. O laminário foi, posteriormente, levado à estufa a 37°C, durante 7 dias.

3.2. Coloração pelo (4'-6-diamidino-2-phenylindole/Distamicina) (DAPI/DA) (Schweizer, 1980)

Sobre o material fixado na lâmina foram adicionados 100 µl de solução de RNase. Após essa etapa, a lamínula foi colocada sobre o material e a lâmina foi levada à estufa pré-aquecida a 37°C, por 30 minutos, em placa de Petri forrada com papel de filtro umedecido com 2xSSC.

Em seguida, o material foi lavado em água destilada e a lâmina seca à temperatura ambiente. Após esse procedimento, foram adicionados, 100 µl de distamicina (0,3 mg/ml), sobre o material e, posteriormente, a lamínula foi colocada sobre a lâmina que permaneceu no escuro por 15 minutos. Após esse período, a lâmina foi lavada em água destilada, mergulhada em tampão McIlvaine por 15 minutos e seca à temperatura ambiente.

Após essa fase, foram adicionados 100 µl de solução de DAPI (0,3 µg/ml), sobre o material, recém-preparada e, posteriormente, a lamínula foi colocada sobre a lâmina que permaneceu no escuro por 15 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada em água destilada, mergulhada em tampão McIlvaine por 15 minutos e seca à temperatura ambiente.



A lâmina foi montada com glicerol, colocada em laminário forrado com papel alumínio ou similar, para impedir a entrada de luz. O laminário foi, posteriormente, levado à estufa a 37°C, durante 7 dias.

3.3. Alaranjado de Acridina (Abrams *et al.*, 1993)

O procedimento de coloração do material compreende em mergulhar a lâmina, com o material fixado, em solução de alaranjado de acridina (5µg/ml) diluído em tampão fostato (0,1 M; pH 7,2) durante 15 minutos. Após esse período, a lâmina é montada com glicerol e, logo após, deve ser realizada a análise do material.

3.4. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr – 12 kb (Viégas-Péquinot, 1992)

Para o procedimento da técnica de FISH com sonda de DNAr 28 S – 12 kb (pDm 238 – *Drosophila melanogaster* – 15 ng/µl), as preparações cromossômicas foram pré-tratadas com solução de RNase, desidratadas em uma série de etanol, secas ao ar e desnaturadas em formamida 70% (10xSSC) a 70°C, por 2 minutos e, imediatamente, desidratadas em uma série de etanol: 50%, 75% e 100%. A hibridação foi realizada por 40 horas, em câmara úmida a 37°C.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes em formamida 50% (2xSSC) e duas vezes em 2xSSC, por 5 minutos cada. Em



seguida, as lâminas foram incubadas, em placa úmida a 37°C, com o primeiro anticorpo (anti-biotina) por 45 minutos. Decorrido esse tempo as lâminas foram lavadas em PBT (0,4% de BSA 30% w/v, 0,1% de *tween* 20, completar com PBS) e incubadas, por 45 minutos, com o segundo anticorpo (RAG-FITC), em câmara úmida a 37°C. Foram, então, submetidas a uma lavagem final em PBT, coradas com iodeto de propídio e montadas com *antifade* (*vectashield*).

II- Microscopia Eletrônica

1. Fixação e contraste convencional para análise ultra-estrutural

O material, após a fixação inicial (glutaraldeído 2% - paraformol 2% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4), por 24 horas, foi lavado por 1 hora, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, foi lavado por 1 hora, em ácido tânico 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e, novamente, lavado em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, por meia hora. Posteriormente, foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 2%, por 1 hora. Após esse procedimento, o material foi lavado 2 vezes em água destilada, sendo cada banho de 15 minutos. Em seguida, iniciou-se o processo de desidratação do material em sequência crescente de soluções de acetona. Após a desidratação, o material foi pré-infiltrado em mistura de resina (*Araldite®*) e acetona 100% *over-night*. Em seguida, ocorreu a infiltração do material em resina pura na estufa à 37°C, por 2 horas, e a inclusão do material em resina pura, sendo a polimerização em estufa à 60°C, por 72 horas.

Os cortes semi-finos de 0,5 µm foram corados com solução de Azul de Toluidina 1% e bórax 1%*. Dos blocos selecionados foram obtidos cortes ultrafinos, que foram depositados em telinhas próprias, sendo, posteriormente, contrastadas em solução aquosa de acetato de uranila 2%, por 20 minutos, e solução aquosa de citrato de chumbo, por 6 minutos, intercalando lavagem entre as soluções.

* Para a análise histológica do material.



Apêndice III: Principais resultados obtidos sobre a estrutura dos cromossomos holocêntricos de três espécies dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*.

	<i>Panstrongylus</i> <i>megistus</i> ◇	<i>Rhodnius</i> <i>pallenscens</i> ◎	<i>Triatoma</i> <i>infestans</i> □
Impregnação pelos íons prata	-Metáfases espermatogoniais: 2 crs autossomos com RONS; -Prófase I ("estádio difuso"): região nucleolar e corpúsculos dispersos pelo núcleo; -Núcleos em diplóteno-diacinese: 2 crs com RONS (1 cr. sexual e 1 autossomo).	-Metáfases II: os 2 crs. sexuais (XY) impregnados indicando as RONS; ◎ -Corpúsculos pré-nucleolares (PNBs) distribuídos pela placa metafásica.	-Núcleos em diplóteno-diacinese: impregnações pelos íons prata na bainha pericromossomal dos cromossomos; -Metáfase I e anáfase I: regiões cromossômicas impregnadas e PNBs. □
Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	-Prófase I ("estádio difuso"): regiões hibridadas; -Núcleos em diplóteno-diacinese: crs. autossomos hibridados.	-Metáfases I: os 2 crs. sexuais (XY) hibridados pela sonda de DNAr. ◎	-Núcleos em diplóteno-diacinese, metáfases II e anáfases: cromossomos hibridados pela sonda. □
Bandamento C	*-Bandas C positivas intersticiais nos crs. autossomos; *-Núcleos em diplóteno-diacinese Y heterocromático; X_1X_2 ora banda C^+ , ora banda C^- (padrão devido à fragmentação de um X original em Heteroptera). ◇	-Metáfases I: 2 crs. heterocromáticos (2 crs. sexuais (XY) ou 1 sexual e uma região intersticial de um autossomo). ◎	-Metáfases I: 4 crs. autossomos e os 2 crs. sexuais (XY) com blocos heterocromáticos.
Fluorocromos CMA3/DA	-Metáfases espermatogoniais: crs. CMA negativos; -Metáfases I e II: 1 dos 3 crs. sexuais (X_1X_2Y) CMA ⁺ . ◇	-Metáfases espermatogoniais: regiões cromossômicas CMA ⁺ ; -Prófase I ("estádio difuso"): 2 regiões CMA ⁺ ; -Metáfases I: crs. sem distinção.	-Metáfases espermatogoniais: crs. CMA ⁺ ; -Metáfases I: 1 cr. sexual (X) CMA ⁺ .
Fluorocromos DAPI/DA	-Metáfases I: 2 crs. sexuais (X_1X_2Y) DAPI ⁺ . ◇	-Metáfases I: crs. sem distinção.	-Metáfases I: crs. sem distinção.

◇, ◎, □: Estes símbolos indicam, para cada espécie, as correspondências de dados entre as técnicas utilizadas.

* Dados de Tartarotti & Azeredo-Oliveira (1999), com autorização.



Alessandra Morielle .

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.



