Alessandra Morielle

Estudo da Espermatogênese em Triatomíneos do Gênero Rhodnius (Heteroptera, Triatominae) com Ênfase à Atividade Nucleolar

1910000951

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética

Alessandra Morielle

"Estudo da Espermatogênese em Triatomíneos do Gênero *Rhodnius* (Heteroptera, Triatominae) com Ênfase à Atividade Nucleolar"

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
951/00

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP

2000

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

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

Dedido a

Décio e Santa, meus pais, pelo incentivo, amor, compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pela confiança, amizade, compreensão e orientação.

À Dra. Mary Massumi Itoyama, pelo interesse e colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e incentivo e pelas sugestões durante a análise da *pro forma.*

À Dra. Sanae Kasahara, do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, pela atenção e sugestões durante a análise da *pro forma.*

Ao Dr. James Robert Coleman pela atenção e auxílio na realização do abstract desta dissertação.

À Dra. Eliana Morielle Versute, pela colaboração e pelo exemplo de pesquisador.

Aos Professores do Departamento de Biologia, pela transmissão de conhecimentos.

Ao Dr. José Maria Soares Barata, Coordenador do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, pelo fornecimento dos triatomíneos utilizados no presente trabalho. Aos funcionários deste Insetário, João Maurício Nóbrega da Silva Filho e Sr. João Luis Molina Gil, pela dedicação e disponibilidade.

À Maria Helena Carabolante, técnica do Departamento de Botânica, pela disponibilidade em fotografar os insetos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e estagiários do Departamento, pela convivência agradável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Décio Morielle e Santa de Stefani Morielle, ao meu noivo Valtenir José Ferreira de Souza pelo apoio, compreensão e companheirismo em todos os momentos, aos meus irmãos, Júnior, Eliana e Rosangela e a minha querida avó, Assunta Marcatto Destefani, que nos momentos mais difíceis sempre tem uma palavra amiga.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto.



Pegadas na Areia

Uma noite eu tive um sonho...
Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e através do céu passavam cenas da minha vida.
Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia:
Um era o meu e outro do Senhor.
Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia, notei, também, que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver, isso aborreceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

"Senhor, tu me disseste que, uma vez que eu resolvi te seguir, tu andarias sempre comigo, todo o caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo por que nas horas que eu mais necessitava de ti tu me deixaste".

O Senhor me respondeu:

"Meu precioso filho, eu te amo e jamais te deixarei nas horas da tua prova e do teu sofrimento.
Quando viste na areia, apenas um par de pegadas, foi exatamente ai, que eu te carreguei nos braços".



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

1.1. Biologia e Aspectos médico-sanitários dos triatomíneos.....1

1.2. Aspectos Citogenéticos dos Triatomíneos.....9

2. MATERIAL E MÉTODO..... 14

2.1. Espécies Analisadas, Procedência e Obtenção.....14

2.2. Manutenção e Alimentação.....17

2.3. Órgão, Estádio Analisado e Dissecação dos Insetos.....17

2.4. Preparação, Coloração das Lâminas e Estruturas Analisadas.....20

2.4.1. Coloração Padrão: Orceína Lacto-Acética.....20

2.4.2. Impregnação por Íons Prata.....20

2.4.3. Contra Coloração com Giemsa a 2%.....21

2.5. Fotomicrografias.....21

3. RESULTADOS.....23

3.1. Morfologia dos Túbulos Testiculares de *Rhodnius*.....23

3.2. Coloração com Orceína Lacto-Acética.....30

3.2.1. Espermatogênese em *Rhodnius domesticus*.....30

3.2.2. Espermatogênese em *Rhodnius neglectus*.....31

3.2.3. Espermatogênese em *Rhodnius neivai*.....32

3.2.4. Espermatogênese em *Rhodnius pallescens*.....33

3.2.5. Espermatogênese em *Rhodnius prolixus*.....34

3.2.6. Espermatogênese em *Rhodnius robustus*.....35

3.3. Impregnação por Íons Prata.....51

3.3.1. Espermatogênese em *Rhodnius domesticus*.....51

3.3.2. Espermatogênese em *Rhodnius neglectus*.....52

3.3.3. Espermatogênese em *Rhodnius neivai*.....52

3.3.4. Espermatogênese em *Rhodnius pallescens*.....53

3.3.5. Espermatogênese em *Rhodnius prolixus*.....54

3.3.6. Espermatogênese em *Rhodnius robustus*.....55

4. DISCUSSÃO.....66

4.1. Aspectos Gerais Relacionados aos Túbulos Testiculares.....66

4.2. Coloração com Orceína Lacto-Acética.....67

4.3. Impregnação por Íons Prata.....78

5. CONCLUSÕES.....90

6. RESUMO.....93

7. ABSTRACT.....95

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....97

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia e Aspectos médico – sanitários dos triatomíneos

Em 1909, o cientista brasileiro Carlos Chagas descobriu o primeiro caso humano de uma tripanossomia, sendo esta uma parasitose causada por um protozoário denominado *Trypanosoma cruzi,* responsável pela moléstia conhecida como "doença de Chagas", "tripanossomia americana" ou "tripanossomia cruzi" (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

A doença de Chagas é uma parasitose transmitida ao homem por insetos hematófogos estritos, conhecidos popularmente como "barbeiros" ou "chupanças" (PANZERA *et al.*, 1992).

São pertencentes à subfamília Triatominae (Heteroptera – Reduviidae) 122 espécies de insetos hematófogos 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).

Esta parasitose constitui, pela sua vasta distribuição, pelos altos índices de prevalência e gravidade de evolução, um dos maiores problemas de saúde pública em nosso país, bem como em vários países sul – americanos. Embora possa constituir problema urbano, como em Salvador (Bahia), é endemia, principalmente rural, de transmissão essencialmente intradomiciliária (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Segundo Chagas, a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* seria uma parasitose natural dos animais silvestres trazida às habitações humanas pelos triatomíneos. No ambiente silvestre o *Trypanosoma cruzi* infecta mamíferos de pequeno porte, não sendo prejudicial a estes, e é transmitido por triatomíneos também silvestres. Esta situação persiste até hoje em regiões esparsas ou virgens, cada vez mais raras, da América, configurando o caráter epidemiológico de uma enzootia silvestre (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1996).

A existência da doença de Chagas, portanto, pode ser considerada como um fato "acidental", na medida em que o homem entrou em contato com focos naturais, provocando desequilíbrios ecológicos, que fizeram com que os triatomíneos



procurassem novas fontes de alimento e que fossem progressivamente se adaptando a habitações de má qualidade (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1996), principalmente casas de pau-a-pique ou cafuas, também chamadas "enchimento" ou "sopapo". Os animais se instalam em frinchas e orifícios ou atrás de torrões de barro que se tornaram facilmente ninhos de "barbeiros", de onde saem à noite para se alimentarem do sangue de pessoas ou animais domésticos (PESSÔA & MARTINS, 1988).

No Brasil a área endêmica da doença de Chagas compreende mais do que três milhões de Km^2, sendo estimado que aproximadamente cinco milhões de pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (DIAS, 1987 *apud* FERNANDES *et al.,* 1997). GAZIN *et al.* (1999) acredita que atualmente este número de infectados está entre quatro a oito milhões.

A doença ocorre apenas no continente americano, distribuindo-se sobre uma grande extensão, desde o sul dos Estados Unidos até o pampa argentina, ao sul de Buenos Aires. Atinge principalmente a população rural e as estimativas, pouco exatas, da quantidade de infectados, atualmente vivos, é da ordem de 16 a 18 milhões (GAZIN *et al.,* 1999).

No Brasil, um inquérito nacional já antigo, efetuado em meio rural com todas as faixas etárias, tem mostrado uma prevalência sorológica da infecção chagásica entre 5% a 8% no Nordeste, em torno de 1% na Amazônia, entre 2% a 7% no Centro-Oeste e entre 2% a 8% no Sul do país. Devido às migrações de vários camponeses, especialmente do Nordeste, para as grandes cidades industriais do Sul, a infecção está presente nessas cidades apesar da transmissão vetorial ser ali excepcional. É importante ressaltar como forma de contaminação no meio urbano a via transfusional (GAZIN *et al.*, 1999).

Estima-se que a doença de Chagas tenha sido responsável, no Brasil, por dezesseis mil mortes por ano nas últimas duas décadas, admitindo-se que seja a doença parasitária mais importante sob o ponto de vista da disfunção socioeconômica que produz (COLLI & ALVES, 1998).

Na região Sul do Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é a área endêmica mais importante da doença de Chagas, com taxas variando de 17,6 % a 19,6 % na região sul do estado (BARUFFA & ALCÂNTARA FILHO, 1977, 1985 *apud* FERNANDES *et al.,* 1997). Investigações da fauna dos triatomíneos mostraram que, pelo menos, sete espécies de triatomíneos estavam presentes. *Triatoma infestans*



foi a única espécie vetor doméstica encontrada (COUTINHO *et al.,* 1952 *apud* FERNANDES *et al.,* 1997).

De acordo com o censo populacional realizado em 1980, estima-se que perto de 7 mil pessoas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* no Rio Grande do Sul (BARUFFA, 1987 *apud* FERNANDES *et al.,* 1997). Embora com uma alta prevalência, poucos grupos de *Trypanosoma cruzi* têm sido estudados e pouco é conhecido sobre populações parasitas que circulam nos diferentes ciclos de transmissão nesta região.

No Nordeste, a situação atual da doença de Chagas está sendo observada no sertão de Pernambuco. Os povoados estudados foram escolhidos sem nenhuma avaliação de uma situação particular da doença e podem ser considerados como uma visão da situação geral nessa região. Os vetores nesta região estão sobretudo presentes no espaço peri-domiciliar, especialmente dentro dos galinheiros. Nesses povoados, as casas têm paredes comuns e não ocorre distinção entre moradias infectadas ou não (GAZIN *et al.,* 1999).

Perto de 13% das pessoas analisadas no sertão de Pernambuco, de todas as idades, são portadores de anticorpos contra *Trypanosoma cruzi.* Neste inquérito evidenciou-se que a faixa etária dos infectados fala a favor de uma redução da transmissão: a prevalência é de 1,5% abaixo de 20 anos e de 30% acima de 40 anos. Essa grande diferença, no entanto, não pode ser explicada unicamente pelo menor tempo de exposição ao risco de ser infectado. Essa constatação não deve por enquanto levar a concluir que a situação está satisfatória, nem permite qualquer triunfalismo a respeito do controle da doença de Chagas nas regiões mais pobres do Brasil (GAZIN *et al.,* 1999).

A maioria das espécies de triatomíneos é silvestre. Algumas, entretanto, no decurso da evolução e, muito provavelmente, por mutação genética e seleção, adquiriram a capacidade de colonizar domicílios humanos, constituindo as espécies chamadas domésticas, mas que são melhores denominadas como domiciliárias, pois domiciliaram-se mas não se domesticaram (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1996).

No entanto, existem espécies que podem ser encontradas tanto nos seus biótopos naturais como artificiais, ou seja, tanto em ambientes silvestres como nas moradias humanas, constituindo as espécies denominadas vulgarmente semidomésticas. Para PESSÔA & MARTINS (1988), entretanto, tais espécies

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

constituem na realidade, duas raças ou variedades, uma colonizando casas e outra, biótopos naturais.

Mais de 30 espécies de triatomíneos já foram encontradas naturalmente infectadas (CESAR PINTO, 1943 *apud* PESSÔA & MARTINS, 1988). Mais ou menos 100 espécies são capazes de albergar e transmitir o *Trypanosoma cruzi*, no entanto, são poucas as que têm realmente importância epidemiológica. Tal importância está condicionada à domesticidade e à densidade da espécie. Nesse sentido o principal transmissor da doença de Chagas no Brasil, em particular nas regiões centro-oriental e sul, é o *Triatoma infestans*, sendo responsável por mais da metade dos 16 milhões de afetados pela doença (SCHOFIELD 1988, W.H.O. 1990 *apud* PANZERA *et al.,* 1995a).

O *Triatoma infestans* tem sido capturado principalmente em casas e adjacências (galinheiros, chiqueiros, etc.), parecendo ter-se adaptado definitivamente ao domicílio humano, mas, segundo MAZZA (1943), TORRICO (1946) e BARRETOS *et al.* (1963) *apud* PESSÔA & MARTINS (1988), parece não ter perdido totalmente os seus hábitos silvestres, pois pode ser encontrado em ecótopos naturais.

O *Triatoma infestans* é também o principal transmissor da doença de Chagas no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e Perú (PESSÔA & MARTINS, 1988). Outras espécies como, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*, adaptaram-se muito bem no Nordeste semi-árido e têm importante papel na transmissão dos parasitos nesta região (GAZIN *et al.*, 1999). A espécie *Panstrongylus megistus* encontra-se, em nosso país, no segundo lugar como transmissora da doença de Chagas, não sendo uma espécie estritamente doméstica (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Outras espécies do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* também albergam o parasita *Trypanosoma cruzi*, no entanto, encontram-se em densidades mais baixas do que as outras espécies do gênero, nas áreas por onde se distribuem (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Fora do nosso país, outra espécie de grande importância é *Rhodnius prolixus*, doméstica e principal transmissora da doença na Guiana Francesa, Venezuela e Colômbia, sendo encontrada ainda no Equador, na América Central e também no Brasil, onde, entretanto, não desempenha papel epidemiológico importante. Esta espécie, além de albergar e transmitir o *Trypanosoma cruzi* ao

homem, é o principal vetor do parasita *Trypanosoma rangeli*. Os animais silvestres e os mamíferos inferiores já foram encontrados naturalmente infectados por este protozoário (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Estudos experimentais indicaram que a espécie *R. domesticus* é um importante vetor do *Trypanossoma rangeli* entre seus hospedeiros mamíferos (GUARNIERI *et al.,* 1998). No Brasil a espécie *R. neglectus* também já foi encontrada naturalmente infectada pelo *Trypanosoma rangeli* (BRAGA *et al.,* 1998).

O conhecimento da infecção pelo *Trypanosoma rangeli* está até o presente, quase limitado à sua fase parasitológica, o estudo de numerosos casos, sobretudo na Venezuela, não revelou ainda quadros sintomatológicos ou anátomo-patológicos determinados pelo parasita. Este parasita geralmente é considerado como não patogênico ao homem (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAVIA, 1992 *apud* GUARNIERI *et al.,* 1998). No entanto, TORREALBA (1951 *apud* PESSÔA & MARTINS, 1988), na Venezuela, refere-se a "casos agudos" de "tripanossomose rangeli", insistindo na existência de manifestações clínicas evidentes, sem que tivesse conseguido demonstrar, nos casos por ele estudados, o parasitismo concomitante pelo *Trypanosoma cruzi*, pois esta associação é possível.

Os triatomíneos nascem sempre livres do tripanossoma, só vindo a contrair a infecção em qualquer estádio de suas vidas, ao sugar o sangue contaminado do homem ou de algum reservatório silvestre ou doméstico.

Algumas características biológicas destes insetos, de interesse à epidemiologia, são:

1. apresentam vida relativamente longa (1 a 2 anos) com evolução de ovo a adulto entre 4 a 7 meses, passando o inseto por 5 estádios ninfais não alados antes de chegar à forma adulta;
2. possuem boa performance biológica em termos de oviposição. As posturas são sempre parceladas, podendo constar de 1-45 ovos em cada uma, cujo total vai além de 200 ovos. Os ovos não são aglutinados uns aos outros, exceto nas espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes*, bem como nas espécies *Triatoma delpontei* e *Triatoma platensis*, nas quais os ovos são colados ao substrato, quase sempre palmeiras ou ninhos de aves, isolados ou aglutinados em grupos irregulares o que impede que caiam ao solo. Após a postura, os ovos são de coloração branca e, em contato com o ar, pela ação das oxidases, vão amarelando. Tornam-se róseos depois de 6 a 7 dias, quando o embrião adquire

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

seu maior desenvolvimento. A eclosão varia com a temperatura e a espécie. O mínimo verificado foi de 16 dias, para o *Triatoma infestans* e, em geral, este período é de 20 a 30 dias;

3. possuem capacidade de resistência ao jejum (6 a 10 meses);
4. são artrópodes de hematofagismo restrito, mas com ecletismo alimentar que permite sobreviver com qualquer tipo de sangue;
5. os triatomíneos possuem hábito noturno, fotofobia, termotropismo positivo, presença de mimetismo acentuado em certas espécies, substâncias anticoagulantes e anestésicas na saliva e hábito quase obrigatório de evacuar no momento ou pouco depois de sugar o vertebrado.

O processo usual de transmissão do *Trypanosoma cruzi* é o contaminativo, pela deposição de fezes infectadas na pele ou mucosa do homem, pois as formas infecciosas flageladas multiplicam-se no intestino posterior sendo expulsas nas fezes (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Segundo DIAS (1933 *apud* PESSÔA & MARTINS, 1988), o mesmo "barbeiro" pode eliminar grande número de tripanossomos todas as vezes que, em seguida a uma refeição, emite dejeções.

As formas infectantes, encontradas nas dejeções dos triatomíneos, penetram nas células da pele ou mucosas na região da picada. Nos triatomíneos o desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* é cíclico, extracelular e se processa no trato gastrointestinal, onde são encontradas formas em amastigota, epimastigota e tripomastigota metacíclica infecciosa, que é a forma flagelar sanguínea circulante infectante (PESSÔA & MARTINS, 1988).

No sangue dos vertebrados, o *Trypanosoma cruzi* apresenta-se sob a forma de um tripomastigota extracelular, medindo cerca de 20 μm de comprimento e não mostra formas em divisão. A reprodução acontece somente nos tecidos e, nas células dos tecidos, apresenta-se sob a forma de amastigota. Provavelmente a transformação das formas teciduais em sanguíneas ocorra com o aparecimento de formas intermediárias em epimastigotas (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Foi observado por ZELEDÓN *et al.* (1977 *apud* PESSÔA & MARTINS, 1988) uma eliminação de grande número de tripomastigotas metacíclicas através da urina de triatomíneos infectados. Essa eliminação ocorre algumas horas após o repasto sanguíneo, sendo aparentemente relacionada à rápida absorção do componente líquido do sangue e sua excreção pelos túbulos de Malpighi.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

O parasita *Trypanosoma rangeli* é transmitido pela forma inoculativa. Este protozoário desenvolve-se no intestino anterior de triatomíneos e invade a glândula salivar do hemíptero. Assim, a transmissão ocorre através da picada. Excepcionalmente, a forma flagelada infectante pode desenvolver-se no intestino posterior do inseto e, como acontece com o *Trypanosoma cruzi,* a transmissão dá-se então por contaminação (ELLIS *et al.,* 1980).

Além do processo contaminativo, que é o mais comum, pela deposição das fezes do triatomíneo no hospedeiro, existem outros meios de transmissão da doença, como a infecção chagásica congênita que está definitivamente comprovada e a transfusão sanguínea. Uma estimativa de 1979, apontava a ocorrência de 20 mil novos casos da doença de Chagas por ano, atribuídos à transfusão de sangue (PESSÔA & MARTINS, 1988).

No Brasil, houve uma diminuição do índice de 6,5% de doações infectadas para somente 1% em 1992. Segundo informação da OMS, 98% dos bancos de sangue incluem teste para a presença de soropositivos, diminuindo drasticamente o segundo maior modo de transmissão da doença (COLLI & ALVES, 1998). A transmissão da doença, também, já foi observada em transplantes de órgãos que continham formas amastigotas do parasita *Trypanosoma cruzi* (PESSÔA & MARTINS, 1988).

É preciso considerar que pouco se conhece sobre a patogenia da doença ou as reações do sistema imune sobre o parasita e discute-se ainda se a doença é de origem auto-imune. No entanto, é intensa e inconclusiva a recente discussão existente na literatura sobre ser ou não uma doença auto-imune, ou seja, se há ou não a necessidade do parasita vivo para instalação e manutenção do processo inflamatório tissular (COLLI & ALVES, 1998).

Dois tipos de enfoque estratégico podem ser visualizados: (1) a identificação de rotas metabólicas que permitam uma distinção bioquímica entre hospedeiro e parasita e (2) o processo pelo qual o parasita interage com a célula hospedeira e, afinal, nela se interna e aí sobrevive (COLLI & ALVES, 1998).

Embora o conhecimento sobre o parasita e a doença tenha experimentado grande progresso nas últimas décadas, muitas são as perguntas que permanecem, exigindo novas abordagens experimentais e, inclusive, novas hipóteses de trabalho (COLLI & ALVES, 1998).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Muitos grupos da ciência biológica ainda estudam o *Trypanossoma cruzi* e o inseto vetor, porque tanto o parasita quanto o inseto constituem modelos biológicos que apresentam desafios ao progresso do conhecimento, e também porque há ainda um grande número de seres humanos portadores da doença que deveriam ter a oportunidade de serem tratados. Os medicamentos usados atualmente (Nifurtimox e Benznidazol) têm eficácia relativa e são mais eficientes na fase aguda da doença (COLLI & ALVES, 1998).

No início da década de 80, o governo brasileiro, priorizou o combate à doença de Chagas através da aplicação maciça de inseticidas nos domicílios. Em 1982 foram iniciados extensos testes de campo para investigar inseticidas e formulações alternativas para controle dos vetores, levando à substituição do BHC e outros organoclorados por piretróides, menos tóxicos para mamíferos e com efeito residual maior (COLLI & ALVES, 1998).

É necessário enfatizar que 36% de todo território brasileiro era endêmico para doença de Chagas em 1970 e 2493 municípios (51% do total) estavam infestados com *Triatoma infestans*. Até 1993, o programa da erradicação por inseticidas de longa permanência misturados a microesferas de látex na tinta de parede eliminou o *Triatoma infestans* em 628 dos 711 municípios afetados em 1983. A prevalência da doença no grupo etário de 7-14 anos, em 10 estados brasileiros, caiu de 4,2%, em 1980, para 0,15% em 1994, significando uma redução de 96,5%. O mesmo ocorreu em outros países do cone sul como Uruguai, Argentina e Chile (COLLI & ALVES, 1998).

Ademais, ao exemplo da malária que parecia extinta na década de 50 pela ação do DDT, é teoricamente possível o surgimento de triatomíneos resistentes aos inseticidas hoje empregados (COLLI & ALVES, 1998).

Sendo a doença de Chagas contraída essencialmente nos domicílios, uma das melhores soluções para a prevenção desta seria a substituição das habitações rudimentares por casas de alvenaria. No entanto, somente isto não basta, pois estas construções também já foram encontradas infestadas por triatomíneos, mostrando que a educação sanitária das populações menos favorecidas é necessária, para o combate eficaz a esta doença. Portanto, o combate direto das populações humanas, contra os triatomíneos, poderá tornar-se uma das medidas mais eficazes contra esta endemia, pois apenas com o uso de inseticidas não se obtém resultados satisfatórios.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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. O estudo da biologia destacando, principalmente, o ciclo, a distinção entre espécies silvestres e domiciliares e ainda, o entendimento das inter-relações evolutivas entre as espécies e gêneros obtido através de dados citogenéticos podem otimizar o controle desses vetores.

1.2. Aspectos Citogenéticos dos Triatomíneos

Além da importância médico-sanitária desses hemípteros, vetores da doença de Chagas, é também notória à relevância citogenética, não só pelos aspectos ligados à procura do seu controle biológico (SCHREIBER *et al.,* 1967; SCHREIBER *et al.,* 1975, 1977), como por suas características citogenéticas incomuns (HUGHES-SCHRADER & SCHRADER, 1961).

A citogenética também tem demonstrado ser apropriada para diferenciar espécies de triatomíneos (PÉREZ *et al.,* 1992), inclusive quando se trata de espécies morfologicamente similares (PANZERA *et al.,* 1992).

As pesquisas citogenéticas, sobre os triatomíneos, iniciaram-se no Brasil em 1948, com os estudos realizados por SCHREIBER & PELLEGRINO, sobre o cariótipo das espécies: *Triatoma infestans, T. sordida, T. maculata, T. vitticeps, T. brasiliensis, T. rubrovaria, T. dimidiata, T. pallidipennis, Panstrongylus megistus, Rhodnius prolixus* e *Psammolestes coreodes*. Nesse trabalho são indicados o número de autossomos e de cromossomos sexuais e são destacados os fenômenos de heteropicnose de alguns autossomos na espécie *Triatoma infestans.*

A partir de 1972, as pesquisas em citogenética de triatomíneos continuaram com os estudos de cariótipos e a determinação do conteúdo de DNA e tamanhos nucleolares, além de novas observações sobre o fenômeno da heteropicnose dos autossomos em *Triatoma infestans*, ressaltando a importância desse fenômeno como um mecanismo de isolamento reprodutivo ao nível de meiose (SCHREIBER *et al.,* 1972).

Em triatomíneos, o número cromossômico diplóide nos machos estende-se de 21 a 25. UESHIMA (1966) sugere que o número cromossômico típico da subfamília Triatominae é 2n= 22, sendo o macho com complemento

cromossômico 20A + XY. Este número e complemento são apontados como o de maior freqüência. Alguns citogeneticistas consideram ser este o cariótipo ancestral (WHITE, 1973) mas outros (SMITH & VIRKKI, 1978 *apud* PÉREZ *et al.,* 1992) questionam esta interpretação e tentam explicar esta maior freqüência, como uma situação citológica ideal em cada grupo, proveniente de seleção natural.

KOSHY (1979a,b) descreveu o cariótipo de cinco espécies do gênero *Rhodnius*. Dessas, *R. neglectus, R. neivai* e *R. robustus* tiveram metáfases mitóticas e meióticas descritas, enquanto que para *R. pictipes* e *R. prolixus* foram descritos apenas os cariótipos somáticos. Verificou-se que o cariótipo de todas as espécies analisadas mostrou-se homogêneo, sendo constituído por dez pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais.

Um trabalho realizado por PANZERA *et al.* (1996), com 46 espécies de triatomíneos, mostrou, através do estudo citogenético de cariótipos meióticos, que os mecanismos de cromossomos sexuais em machos de triatomíneos variavam de XY (25 espécies), X_1X_2Y (19 espécies) e $X_1X_2X_3Y$ (2 espécies). Vários autores (SCHRADER, 1947; WHITE, 1973) sugerem que a fragmentação tenha sido a principal fonte de cromossomos sexuais múltiplos em Heteroptera.

Uma característica marcante dos triatomíneos refere-se a prófase da primeira divisão meiótica, que não apresenta as subfases características distintas (leptóteno, zigóteno, paquíteno). Estes estádios são denominados conjuntamente de "estádio 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.

O estudo citogenético desses insetos revelou, também, que seus cromossomos possuem cinetócoro difuso, isto é, distribuído ao longo do cromossomo e não localizado na região do centrômero e uma formação não usual na meiose, onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (DE VAIO *et al.,* 1985).

O cinetócoro é um ativo participante em muitos dos eventos da divisão celular. Além da sua função de ligação, há sugestões de que o cinetócoro desempenhe um papel tanto na formação do fuso como nos movimentos cromossômicos que ocorrem durante a mitose e meiose. Essas propriedades do cinetócoro ajudam na precisa distribuição dos cromossomos durante os processos de divisão celular (BALCZON & BRINKLEY, 1990).



Em muitos organismos, o cinetócoro está localizado em um sítio específico do cromossomo, estes, portanto, são denominados de monocêntricos, ou seja, apresentam apenas um centrômero.

Em alguns organismos como protozoários, algas, algumas ordens de insetos (Homoptera, Heteroptera e Lepidoptera) e em algumas famílias de plantas (Cyperaceae e Juncaceae) os cinetócoros são difusos. Ao microscópio eletrônico, tem sido demonstrado a existência de várias placas cinetocóricas, ou de uma única placa ao longo de quase todo o cromossomo. Ao microscópio óptico os cromossomos caracterizam-se por não apresentarem constrições primárias e os cromossomos anafásicos migrarem paralelos uns aos outros, e não em forma de V, como fazem os monocêntricos (GUERRA, 1988).

Os cromossomos com cinetócoros difusos também são conhecidos como holocêntricos. Alguns autores, no entanto, usam o termo holocinético referindo-se à mesma característica (LUCEÑO & GUERRA, 1996).

A identificação de cada cromossomo sexual em triatomíneos é difícil, porque ambos os cromossomos sexuais são heteropicnóticos e indistinguíveis dos cromossomos autossomos por coloração clássica (PÉREZ *et al.,* 1992). Até agora os cromossomos sexuais têm sido nomeados arbitrariamente de acordo com seu tamanho relativo (SCHREIBER & PELLEGRINO, 1950; UESHIMA, 1966).

Os cromossomos autossomos mostram uma pequena variação, segundo SCHREIBER & PELLEGRINO (1950). Variações impressionantes foram relatadas para *Triatoma infestans* e *T. platensis* que possuem três grandes pares de autossomos (SCHREIBER & PELLEGRINO, 1950; UESHIMA, 1966). As observações indicaram que *Triatoma pseudomaculata* tem um par de autossomos significantemente grande em relação ao resto do cariótipo. Em outras espécies, classes cromossômicas de tamanhos distintos não podem ser definidas (PÉREZ *et al.,* 1992).

Análises comparativas da metáfase I podem indicar que os cromossomos são pequenos no gênero *Rhodnius* em relação aos cromossomos do gênero *Triatoma*. No entanto, comparações intergêneros ou interespecíficas de tamanhos de cromossomos são dificultadas devido aos diferentes estágios de condensação cromossômica. Todavia, é bastante viável usar o tamanho relativo dos cromossomos, dentro das espécies, como um caráter diferencial.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Outro enfoque, embora não diretamente relacionado com o tamanho dos cromossomos pode ser o de comparar o conteúdo de DNA entre espécies. SCHREIBER *et al.* (1972) mostraram de fato que espécies do gênero *Rhodnius* têm um baixo valor de DNA comparado com espécies dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*. É de grande interesse a determinação do conteúdo de DNA em espécies de triatomíneos para possíveis interpretações de suas relações evolutivas.

Até o presente, a maioria dos resultados citogenéticos sobre triatomíneos foi obtida através da investigação cromossômica comparativa nos triatomíneos com a coloração convencional dos cromossomos. Nestes trabalhos, os critérios de comparação foram basicamente o número e a morfologia dos cromossomos, bem como a disposição destes na placa metafásica. Os dados obtidos através dessas investigações deram as primeiras indicações do processo que aconteceu durante a evolução cromossômica destes insetos.

A partir da década de 70 foram publicados diversos trabalhos de MELLO (1971, 1977, 1978a-d, 1979, 1980, 1983, 1995), MELLO & DOLDER (1977, 1978, 1980), MELLO & RAIMUNDO (1979), MELLO & VIANA (1977a,b) e de MELLO *et al.* (1973), enfocando principalmente a poliploidia, aspectos citoquímicos e citofísicos, valores de Feulgen–DNA. Foram também analisadas características ultra-estruturais (DOLDER & MELLO, 1978a-c, 1979), comportamento das heterocromatinas e eucromatinas em células somáticas de túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* e ainda realizada citoquímica de alguns grupos de enzimas: fosfatases, peroxidases e desidrogenases (AZEREDO-OLIVEIRA, 1982; AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1985; 1986a-b; 1997; 1998a,b).

No entanto, excetuando-se GEITLER (1939 *apud* AZEREDO-OLIVEIRA, 1990), MELLO & DOLDER (1978), AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO (1986a,b) e MELLO & RECCO-PIMENTEL (1987), que mostraram uma associação do nucléolo, em núcleos de células somáticas de túbulos de Malpighi, com massas heterocromáticas na espécie *Triatoma infestans*, AZEREDO-OLIVEIRA (1990), TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997a,b) que estudaram estas mesmas associações em células meióticas de cinco espécies do gênero *Triatoma* e TARTAROTTI (1998) e TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999) que, também, estudaram estas associações em células meióticas de duas espécies do gênero *Panstrongylus*, pouco se conhece até agora sobre a localização e atividade dos

nucléolos e, menos ainda, sobre RONs nos triatomíneos, sendo este, portanto o tema do presente estudo.

O estudo das RONs é de extrema importância pois nestas localizam-se os sítios do DNA ribossômico (DNAr), local de síntese da molécula RNAr 45 S, precursora das duas subunidades ribossômicas. Como se sabe, os ribossomos atuam na tradução do RNA mensageiro (RNAm), produzindo as proteínas. E é esta importância do RNA ribossômico na síntese protéica que justifica o enorme interesse pelo estudo dessas regiões cromossômicas.

Além desse aspecto do metabolismo celular, as RONs, por sua estrutura e arranjo, podem constituir-se, também, em importante fonte de variabilidade cromossômica (MORIELLE, 1987).

As RONs têm mostrado uma grande variabilidade quanto a vários aspectos. Essa variabilidade permite diferenciar não só espécies, como também linhagens e, às vezes, até mesmo indivíduos de mesma linhagem (BICUDO, 1985). Os dados provenientes das investigações sobre essas regiões, em muitas espécies, têm fornecido suporte essencial a respeito da evolução cromossômica (MORIELLE, 1987).

Portanto, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Estudar comparativamente as características das fases da espermatogênese de seis espécies do gênero *Rhodnius*: *R. domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* com ênfase a estrutura cromossômica e ao ciclo nucleolar.

2. Detectar as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) nos cromossomos meióticos dos testículos de triatomíneos adultos jovens das seis espécies.

3. Correlacionar diferenças e semelhanças citológicas, verificando a ocorrência de variabilidade interespecífica.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Espécies Analisadas, Procedência e Obtenção

As espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, Rhodnius pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* analisadas, neste estudo, pertencem à ordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, tribo Rhodniini e gênero *Rhodnius*. A procedência de cada uma das espécies consta da Tabela 1 e Figura 1.

Espécies	Procedência	Número de insetos utilizados
Rhodnius domesticus	Belém do Pará, PA: Brasil	38
Rhodnius neivai	Belém do Pará, PA: Brasil	44
Rhodnius neglectus	Guaíra, SP: Brasil	45
Rhodnius pallescens	Barro Colorado, Panamá	18
Rhodnius prolixus	Bogotá: Colômbia	43
Rhodnius robustus	Lima: Peru	47

Tabela 1: Espécies, procedência e número de insetos utilizados

Rhodnius domesticus possui distribuição pelo Brasil (Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e São Paulo). Esta espécie tem sido encontrada em habitações humanas, mas somente em casos isolados. Apesar do nome não é uma espécie doméstica. Populações de vida livre são encontradas em moitas de bromélias próximas a abrigos de roedores (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Rhodnius neglectus possui ampla distribuição geográfica no território brasileiro, encontra-se na região nordeste, sudeste e sul do país. Esta espécie é predominantemente silvestre mas, às vezes, é encontrada em habitações humanas e situações peridomésticas. Tem sido encontrada naturalmente infectada pelo *Trypanosoma cruzi* (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Rhodnius neivai distribui-se pela Colômbia e Venezuela. Tem sido encontrada naturalmente infectada pelo *Trypanosoma cruzi*. É encontrada em

habitações humanas, mas não as colonizam. É encontrada em áreas secas, com formações fitogeográficas tropical e semidesértico de flora xerofítica e psamófila. Esta espécie difere de todas as outras do gênero, por ser quase uniformemente de cor preta (CABELLO *et al.,* 1987).

Rhodnius pallescens distribui-se por Belize (antiga Honduras Britânica; América Central), Colômbia e Panamá. Foi primeiramente relatada em Belize. No Panamá, esta espécie tornou-se domiciliar e é o principal vetor da doença de Chagas. Esta espécie também tem sido encontrada em situações peridomésticas e em tocas de animais silvestres (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Rhodnius prolixus distribui-se por países como, Bolívia, Brasil (Amazonas, Goiás e Pará), Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, El Salvador, Suriname e Venezuela. Esta espécie é bem estabelecida em habitações humanas, não é considerado um importante vetor da doença de Chagas na Colômbia e Guiana Francesa. Na Venezuela é o principal vetor, e ocorre no país inteiro, do nível do mar à 2000 metros de altitude. Esta espécie constitui aproximadamente 90% de todos os triatomíneos encontrados nas habitações humanas, encontra-se também em situações peridomiciliares (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Rhodnius robustus distribui-se por países como Bolívia, Brasil (Amazonas e Pará), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. É encontrada naturalmente infectada pelo *Trypanosoma cruzi*. Na Colômbia esta espécie tem sido encontrada em habitações humanas (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

As espécies estudadas foram cedidas pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), que pertence ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. José Maria Barata. O insetário promove coletas periódicas em diversas regiões brasileiras e também recebe doações de insetos de outros países, mantendo assim um estoque que possibilita a distribuição às instituições de pesquisas solicitantes.

unesp



Figura 1. Procedência geográfica das espécies de triatomíneos, do gênero *Rhodnius,* analisadas no presente trabalho.

2.2. Manutenção e Alimentação

No insetário, os triatomíneos são mantidos em cristalizadores fechados com tecido de malha fina, à temperatura ambiente, em salas com pouca luminosidade.

A alimentação desses insetos é feita, uma vez por mês, com sangue de pato ou rato, dependendo do tamanho da colônia. No centro dos cristalizadores colocam-se separações de papelão, para apoio e acesso dos insetos aos patos. Estes são imobilizados e apresentam o abdome parcialmente exposto aos insetos durante quinze a trinta minutos, dependendo da espécie que está se alimentando. Em colônias menores ou em formação, coloca-se um rato vivo e imobilizado por uma prensa de tela metálica dentro dos cristalizadores para assegurar a alimentação dos insetos. As aves e ratos, por não serem transmissores do *Trypanosoma cruzi*, não infectam as ninfas que, a partir do primeiro estádio, já são hematófagas.

Esses insetos resistem até sete meses ao jejum e, no presente trabalho, os insetos utilizados eram recém alimentados ou estavam em jejum de até um mês. Dessa forma foi estabelecida uma padronização para evitar alterações metabólicas que poderiam modificar as estruturas nucleares.

2.3. Órgão, Estádio Analisado e Dissecação dos Insetos

O aparelho reprodutor masculino de espécimes adultos de triatomíneos é constituído de um par de testículos, um par de vasos deferentes, um par de vesículas seminais (reservatório de esperma), epidídimo (extensão do vaso deferente irregularmente enovelado), quatro pares de glândulas acessórias sob forma de bolsas e um canal ejaculador. A abertura externa do aparelho reprodutor ou gonóporo masculino, está geralmente situada sobre ou dentro de um órgão mediano, o pênis (Esquema 1a).

Para o desenvolvimento desse trabalho o órgão escolhido foi o testículo proveniente de insetos adultos jovens.

Os testículos são formados por sete túbulos testiculares, cada túbulo está ligado ao vaso deferente por um pequeno canalículo chamado vaso eferente. O túbulo testicular é revestido por uma camada celular, formando uma bainha epitelial, que algumas vezes apresenta-se subdividida em duas camadas, interiormente

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

constitui-se por quatro regiões: germário, zona de crescimento, zona de maturação e zona de transformação (Esquema 1b). No interior de cada túbulo espermático, encontram-se as células germinais masculinas, nos seus diferentes estádios de desenvolvimento, bem como outras células que lhe são associadas.

O germário está situado na porção apical do túbulo e é responsável pela formação das espermatogônias; na sua porção superior, possui uma célula germinativa, com função trófica, denominada célula apical. A partir do germário as espermatogônias são gradualmente deslocadas para a região proximal (região adjacente ao canal eferente) do túbulo, originando uma sucessão de zonas de acordo com o grau de desenvolvimento.

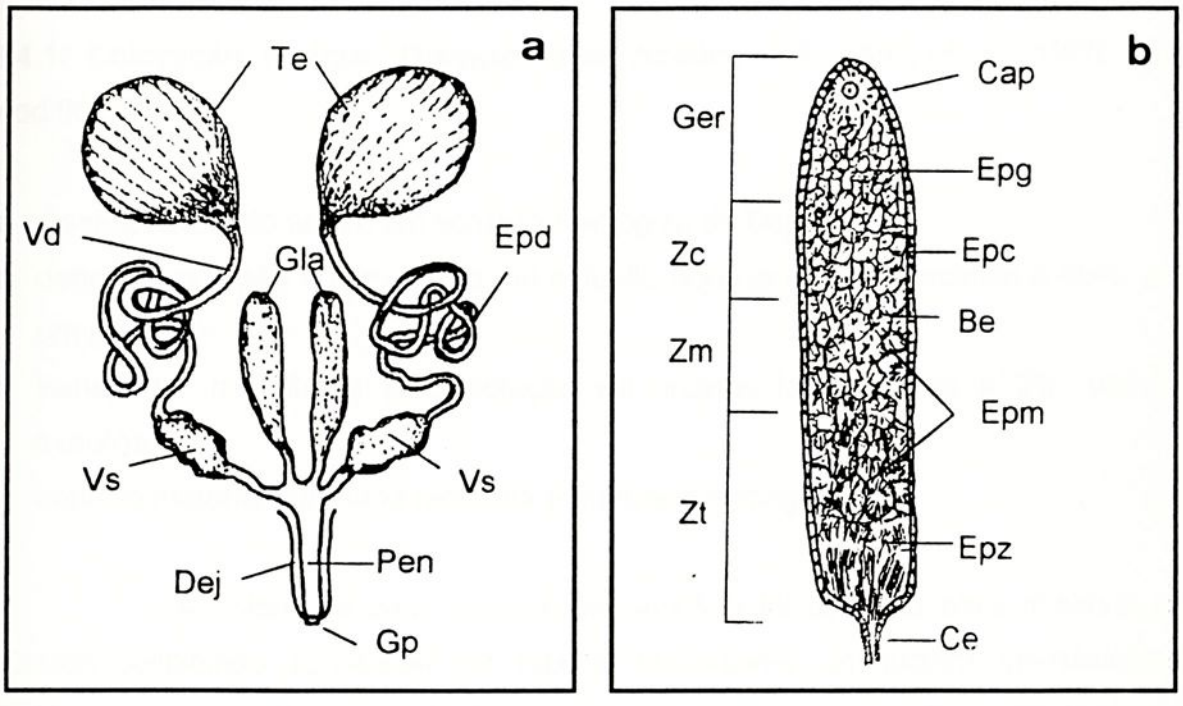
A zona de crescimento caracteriza-se pelo encistamento, multiplicação e aumento de tamanho das espermatogônias que se transformam em espermatócitos de primeira ordem. Na zona de maturação os espermatócitos primários sofrem duas divisões meióticas para transformarem-se em espermátides.

Finalmente, na zona de transformação ocorre a espermiogênese, isto é, a diferenciação das espermátides em espermatozóides.

Para a retirada dos testículos os insetos foram eterizados e as patas e asas foram seccionadas. As laterais do abdome foram cortadas (conexivo) e foi feito um corte transversal na região anterodorsal do exoesqueleto abdominal, que foi rebatido para trás e preso por um alfinete. A seguir, gotejou-se solução fisiológica (Demerec) sobre o abdome e o inseto foi então, levado ao microscópio estereoscópico (lupa).

Os testículos estão localizados na porção anterior do hemocelo, um de cada lado, e são envoltos por uma membrana clara e leitosa. Para retirar os túbulos seminíferos foi rompida a membrana do testículo e posteriormente estes foram colocados sobre uma lâmina, separados e utilizados para coloração com orceína lacto-acética e impregnação por íons prata.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18



Esquema 1. Aparelho reprodutor masculino. **a)** Organização geral esquemática: **Te-** testículos; **Vd-** vaso deferente; **Epd-** epidídimo; **Vs-** vesículas seminais; **Gla-** glândulas acessórias; **Dej-** duto ou canal ejaculador; **Pen-** pênis; **Gp-** gonóporo. **b)** Túbulo testicular: **Ger-** germário; **Zc-** zona de crescimento; **Zm-** zona de maturação; **Zt-** zona de transformação; **Cap-** célula apical ou de Verson; **Epg-** espermatogônias; **Epc-** espermatócitos; **Epm-** espermátides; **Epz-** espermatozóides; **Ce-** canal eferente; **Be-** bainha epitelial (BARTH, 1956a - com modificações).

2.4. Preparação, Coloração das Lâminas e Estruturas Analisadas

As lâminas e lamínulas utilizadas nas preparações citológicas foram colocadas em álcool, onde permaneceram até sua utilização.

2.4.1. Coloração Padrão: Orceína Lacto-Acética (DE VAIO *et al.,* 1985, com modificações)

a. dissecar o inseto adulto em solução fisiológica de Demerec;
b. depositar o órgão a ser corado em solução aquosa de ácido acético a 45%, por um minuto;
c. transportar o material para solução de orceína lacto-acética a 2%, por 10 minutos;
d. cobrir o material com uma lamínula e efetuar o esmagamento.

A coloração pela orceína lacto-acética foi utilizada para observar os núcleos poliplóides da parede dos túbulos testiculares, os núcleos interfásicos e profásicos espermatogoniais, a disposição dos cromossomos espermatogoniais e meióticos na placa metafásica e as diferenças e semelhanças existentes em cada fase.

2.4.2. Impregnação por Íons Prata

Preparação das lâminas (BICUDO, 1979)

a. dissecar o inseto adulto em solução fisiológica de Demerec;
b. transportar o órgão para uma solução aquosa de ácido acético a 45% por um minuto;
c. transportar o órgão para solução aquosa de ácido lático a 50% por 5 minutos;
d. esmagar em ácido acético a 45% entre lâmina e lamínula;
e. depositar as lâminas em câmara úmida por aproximadamente 10 minutos;
f. retirar a lamínula com o auxílio de nitrogênio líquido. As lâminas secas podem ser guardadas em freezer por vários dias.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A coloração pelos íons prata foi feita segundo a técnica de HOWELL & BLACK (1980), como descrita a seguir:

a. tratar a lâmina com o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de ácido fórmico);
b. adicionar sobre esta, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las;
c. cobrir com lamínula;
d. incubar as lâminas em estufa a 70°C, durante 8 a 12 minutos, em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada, até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada;
e. lavar a lâmina em água deionizada até que a lamínula desprenda-se, deixar secar ao ar;
f. montar a lâmina com verniz cristal.

A impregnação pelos íons prata, foi utilizada para observar o número de corpúsculos nucleolares e a localização das Regiões Organizadoras Nucleolares nos cromossomos.

2.4.3. Contra Coloração com Giemsa a 2%

As lâminas após serem coradas pelo nitrato de prata foram mergulhadas por 8 minutos em solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato (pH 6,8), sendo então lavadas e montadas com lamínulas.

Esta contra coloração, com Giemsa a 2%, foi utilizada em algumas lâminas, impregnadas pelos íons prata, da espécie *R. robustus,* que foi escolhida ao acaso, para verificação de um melhor contraste das Regiões Organizadoras Nucleolares.

2.5. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Olympus modelo BX 40, com sistema fotográfico acoplado (PM-10 AK3 automático), utilizando-se filme TEMAX 100 ASA e papel fotográfico Kodak Kodabromide F3.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Os filmes e fotos foram revelados no laboratório fotográfico do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, de acordo com as técnicas rotineiras empregadas neste processo.

A ampliação final (AF) foi calculada da seguinte forma:

AF= 100 x 3,3 x 5,5= 1815 vezes; onde

100 = aumento da objetiva
3,3 = aumento da ocular projetiva
5,5 = ampliação fotográfica

unesp

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

No presente trabalho estudamos a espermatogênese de seis espécies do gênero *Rhodnius: R. domesticus, R. neglectus, R. neivai , R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus*, com ênfase aos aspectos da espermatogênese e à atividade nucleolar (Figuras 8-25).

3.1. Morfologia dos Túbulos Testiculares de *Rhodnius*

Durante a preparação do material foram observadas pequenas variações na morfologia dos túbulos testiculares nas espécies analisadas (Figuras 2-7).

No presente trabalho, as seis espécies do gênero *Rhodnius* apresentaram dois túbulos testiculares longos e grossos e cinco curtos e finos. O aspecto geral dos túbulos é bastante semelhante em cinco espécies (*R. domesticus, R. neglectus, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus*). Em *R. neivai* os túbulos testiculares maiores apresentaram-se mais curtos e grossos quando comparados aos das outras espécies estudadas.

Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos descritos na literatura para o gênero *Rhodnius,* ou seja, a presença de dois túbulos longos e grossos e cinco curtos e finos. Contudo pudemos observar variação interespecífica quanto ao comprimento e a espessura dos túbulos longos. Em uma das seis espécies analisadas, *R. neivai,* os túbulos testiculares maiores apresentaram-se mais curtos e grossos que o das outras espécies (Figura 4b).



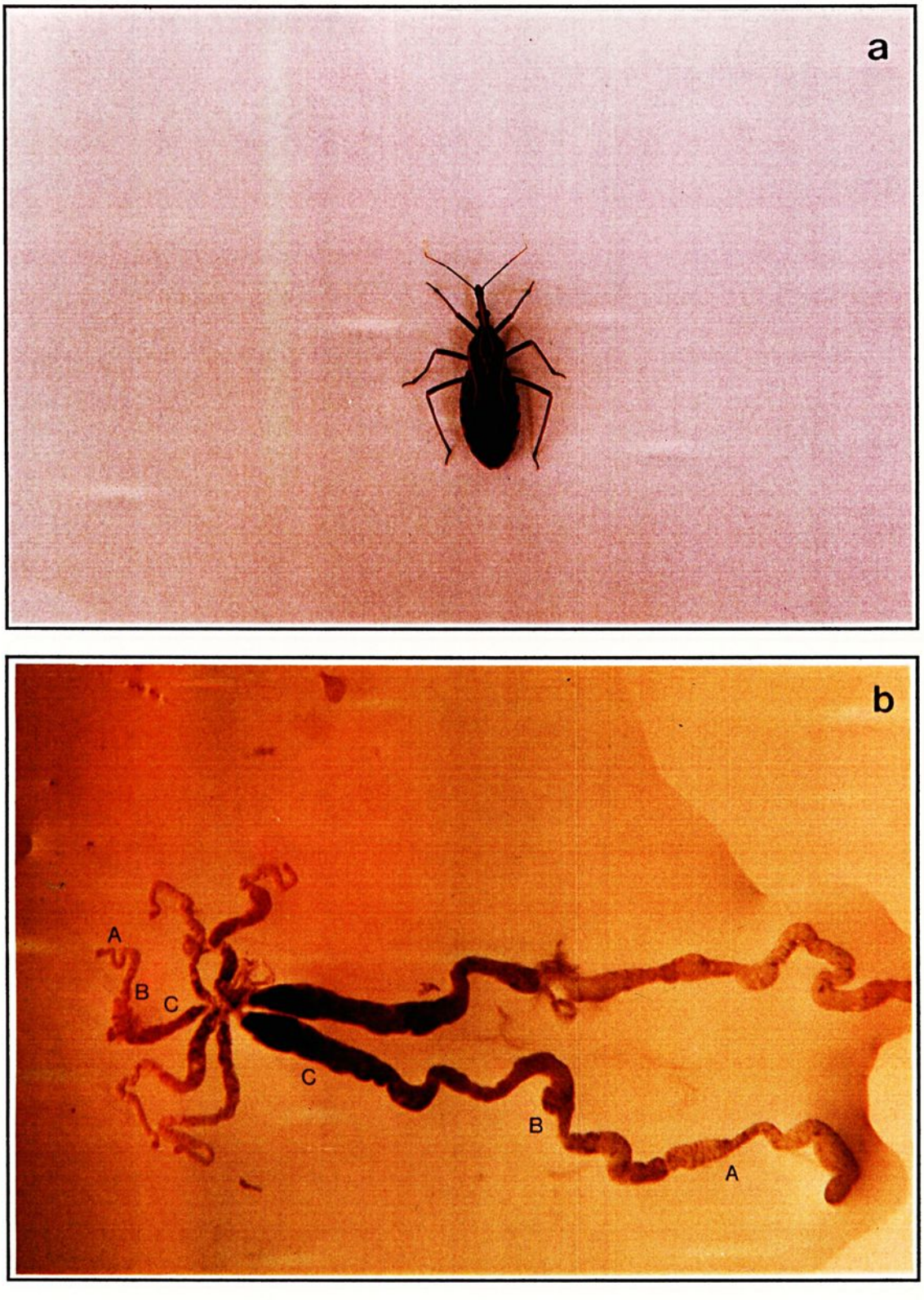


Figura 2. a) *Rhodnius domesticus,* macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção. As regiões A, B, C dos túbulos seminíferos contém respectivamente: células espermatogoniais; células meióticas e espermátides e espermatozóides (Aumento: 15x).



Figura 3. a) *Rhodnius neglectus,* macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos sete túbulos seminíferos após dissecção. Notar que os túbulos indicados pelos números 6 e 7 são maiores e mais espessos que os demais (Aumento: 15x).

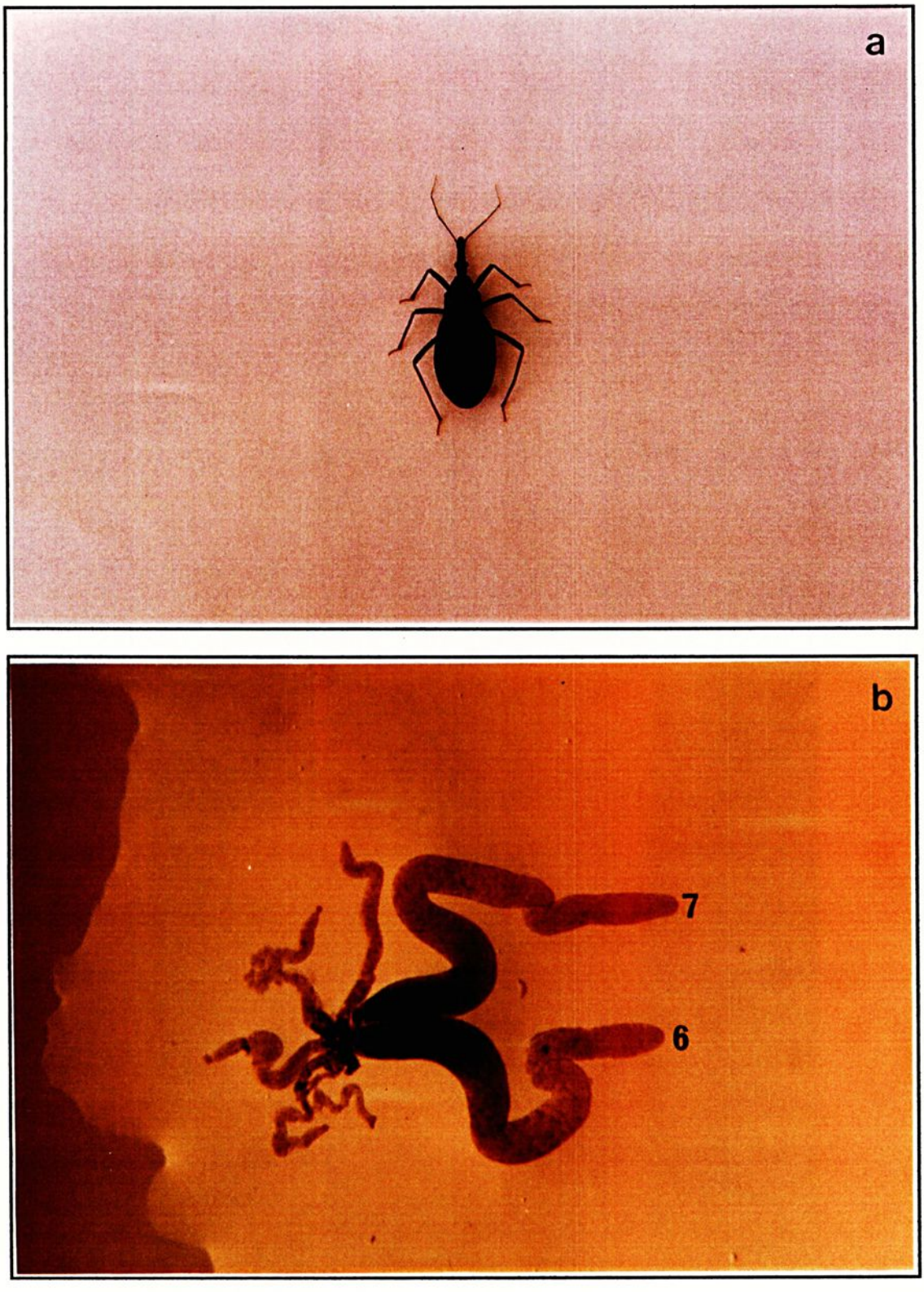


Figura 4. a) *Rhodnius neivai,* macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção. Nesta espécie os dois túbulos seminíferos maiores (6 e 7) são, mais curtos e espessos, quando comparados com os das outras espécies estudadas (Aumento: 15x).

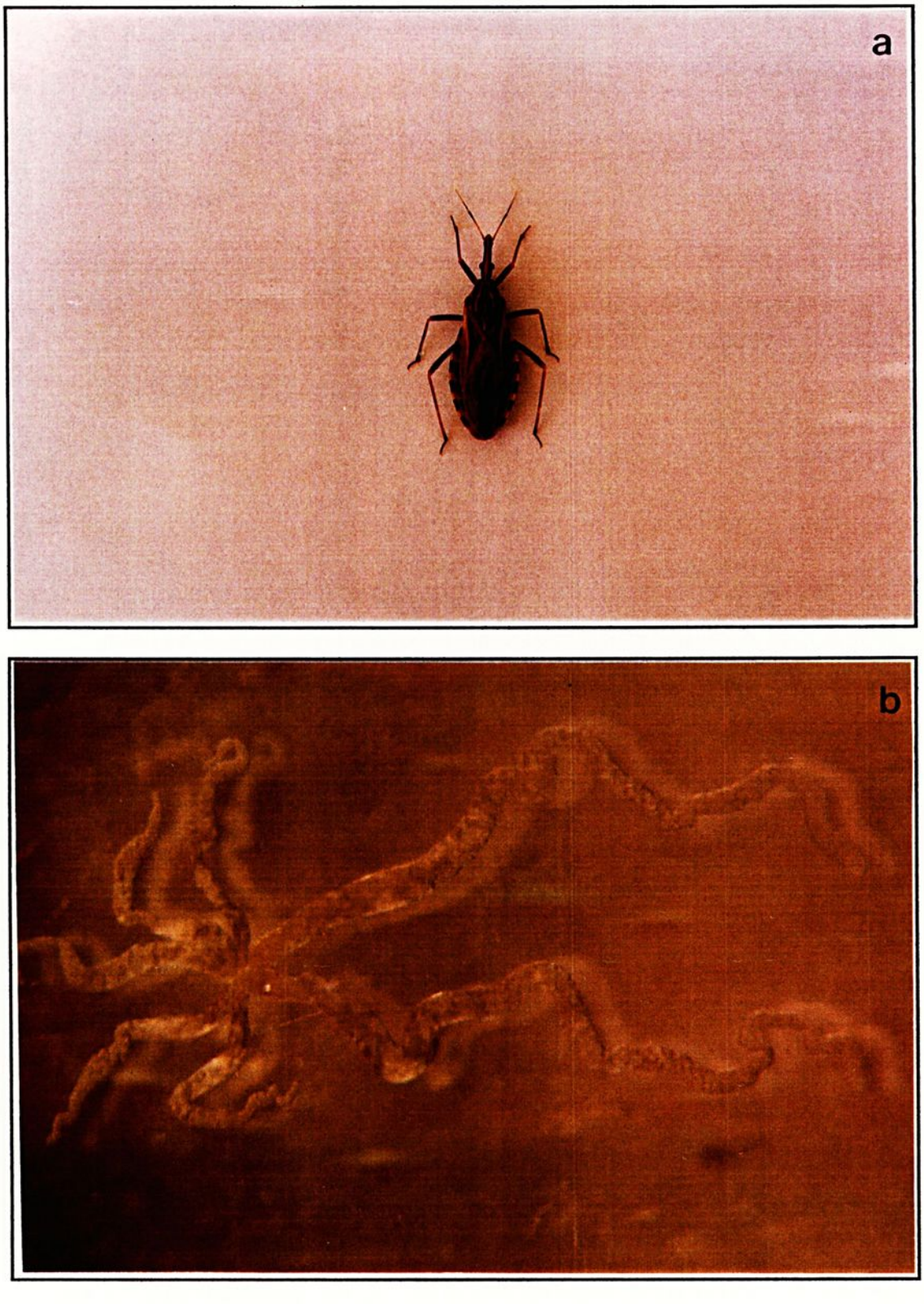


Figura 5. a) *Rhodnius pallescens,* macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção (Aumento: 15x).

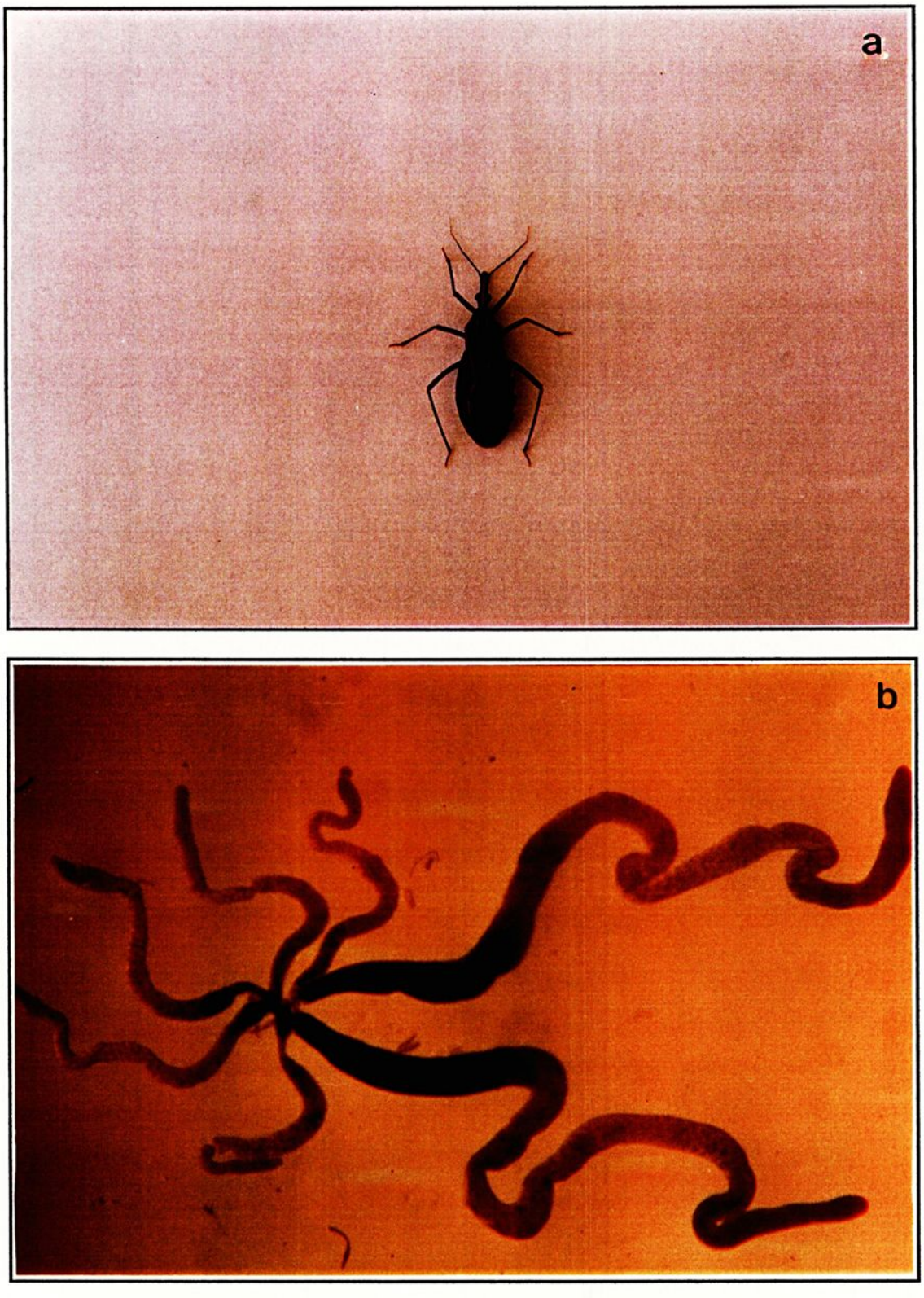


Figura 6. a) *Rhodnius prolixus,* macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção (Aumento: 15x).

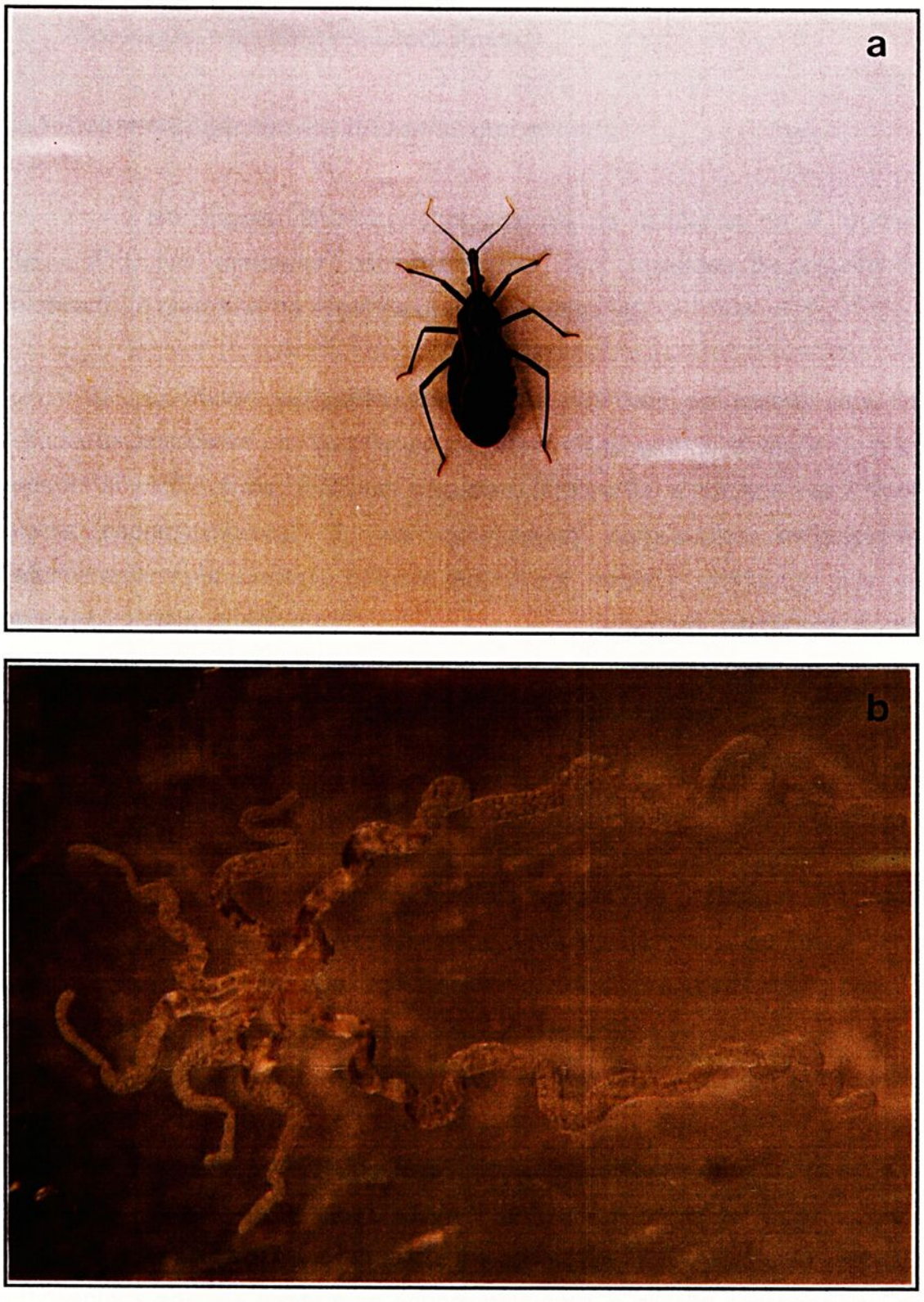


Figura 7. a) *Rhodnius robustus*, macho (Aumento: 2x). **b)** Disposição dos túbulos seminíferos após dissecção (Aumento: 15x).

3.2. Coloração com Orceína Lacto-Acética

3.2.1. Espermatogênese em *Rhodnius domesticus*

Na Figura 8 estão representados os cariótipos de *R. domesticus* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta um corpúsculo heteropicnótico grande e vários corpúsculos menores ao redor deste, sobre um halo claro (Figura 9a) e núcleos interfásicos das células espermatogoniais que apresentam corpúsculos heteropicnóticos, predominantemente centrais (Figura 9b) e os núcleos profásicos das células espermatogoniais apresentam corpúsculos heteropicnóticos periféricos e centrais (Figura 9c, setas).

A metáfase espermatogonial apresenta filamentos cromatínicos (Figura 9d, seta) unindo os cromossomos e, nota-se, também, que alguns cromossomos apresentam heteropicnose.

Na prófase I, no "estádio confuso" (Figura 9e-f), observam-se nos núcleos de um a dois corpúsculos heteropicnóticos. Os núcleos em diplóteno-diacinese (Figura 9g-i) apresentam cromossomos com quiasmas (seta). Pode-se observar que em (g-h) um dos cromossomos sexuais apresenta heteropicnose,e em (i) um dos autossomos mostra uma região heteropicnótica.

As metáfases I da meiose apresentam dez bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (Figura 9j-k,) que se dispõem na placa metafásica formando um anel. Nas metáfases II os autossomos sempre se dispõem em anel, ao redor dos cromossomos sexuais centrais (Figura 9l-m).

Nas anáfases, os autossomos segregam-se regularmente, enquanto os cromossomos sexuais dividem-se equacionalmente, a divisão segregacional destes somente ocorre na segunda divisão. Esta fase é caracterizada pela migração tardia dos cromossomos sexuais. Notar em (n) os cromossomos sexuais indicados pelas setas (Figura 9n-p). As telófases meióticas estão representadas na Figura 9(q-r).

No início da espermiogênese as espermátides são arredondadas e apresentam regiões cromatínicas condensadas (Figura 9s). Conforme se processa a

diferenciação, as espermátides iniciam um processo gradual de alongamento celular e ainda apresentam as regiões condensadas da cromatina (Figura 9t-u). No final do processo de espermiogênese já é possível observar espermatozóides (Figura 9v).

3.2.2. Espermatogênese em *Rhodnius neglectus*

Na Figura 10 estão representados os cariótipos de *R. neglectus* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta um único corpúsculo heteropicnótico, sendo possível observar um halo claro ao redor deste corpúsculo (Figura 11a). Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais possuem corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos, podendo observar-se no centro dos núcleos uma região formando um halo (Figura 11b) e os núcleos profásicos das células espermatogoniais (Figura 11c) apresentam-se com corpúsculos heteropicnóticos distribuídos predominantemente no interior dos núcleos e menos freqüentemente na periferia (seta).

As metáfases espermatogoniais (20A+XY) apresentam os cromossomos unidos por pontes cromatínicas (Figura 11d, setas) e não apresentam um arranjo ordenado dos cromossomos, sendo que estes ocupam toda a placa equatorial. Nota-se, ainda, a presença de cromossomos heteropicnóticos.

Na Figura 11(e), estão representados os núcleos no início da prófase I meiótica ("estádio confuso"), que mostram de um a três corpúsculos heteropicnóticos. Em estádio mais avançado da prófase I meiótica observam-se dois corpúsculos heteropicnóticos, provavelmente formados pelos cromossomos sexuais (Figura 11f). No núcleo da prófase I, em diplóteno-diacinese observa-se os cromossomos sexuais, que são os menores (Figura 11g, setas).

As metáfases da primeira divisão meiótica não seguem um padrão de orientação definido, sendo que os cromossomos sexuais (setas) podem aparecer no centro do anel formado pelos autossomos ou distribuídos pela placa metafásica (Figura 11h-i).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

A metáfase da segunda divisão meiótica apresenta uma disposição anelar dos autossomos com os cromossomos sexuais no centro da placa metafásica, sendo o cromossomo X maior que Y (Figura 11j).

Durante as anáfases meióticas, são observados cromossomos de migração tardia (Figura 11k-m, setas)). Na anáfase meiótica, portanto, há uma migração progressiva dos cromossomos para os pólos celulares, atingindo então o estádio telofásico, ou seja, as telófases meióticas (Figura 11n-o). Notar em (n) cromossomos de migração tardia.

Na espermiogênese nota-se que as espermátides iniciais possuem forma arredondada com um halo claro ao redor e apresentam regiões cromatínicas condensadas (Figura 11p, setas). Com o avançar da espermiogênese as células alongam-se e ainda apresentam as regiões condensadas (Figura 11q). No final do processo é possível evidenciar os espermatozóides (Figura 11r).

3.2.3. Espermatogênese em *Rhodnius neivai*

Na Figura 12 estão representados os cariótipos de *R. neivai* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares que está representado na Figura 13(a) mostra vários corpúsculos heteropicnóticos sobre um halo claro. Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos (Figura 13b) e na Figura 13(c, setas), estão representados os núcleos profásicos espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos periféricos bem evidentes.

A metáfase espermatogonial caracteriza-se por apresentar os cromossomos unidos por pontes cromatínicas (Figura 13d, seta).

Os núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese) (Figura 13e-g) apresenta um cromossomo sexual heteropicnótico bem evidenciado (e-f). Em (g) nota-se a presença de um quiasma (seta).

As metáfases da primeira divisão meiótica apresentam 10 autossomos bivalentes e dois cromossomos sexuais. Nesta fase, os cromossomos mostram uma

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

distribuição irregular, próximo a região central da placa metáfasica (Figura 13h) ou na periferia desta (Figura 13i). As metáfases da segunda divisão apresentam os 10 autossomos formando um anel, com os dois cromossomos sexuais no centro deste (Figura 13j-k).

As anáfases da segunda divisão meiótica, apresentam cromossomos com migração tardia (Figura 13l-n). Nota-se que ocorre uma migração progressiva destes cromossomos. Em (l) é possível visualizar a heteropicnose dos cromossomos sexuais (setas). Na Figura 13(o) está representada uma telófase meiótica.

As espermátides no início da espermiogênese mostram formas arredondadas e regiões cromatínicas condensadas (Figura 13p, setas). Estas no decorrer da diferenciação celular alongam-se mas, ainda apresentam as regiões cromatínicas condensadas (Figura 13q). Na Figura 13(r), estão representados os espermatozóides, alguns deles apresentam condensação cromatínica (seta).

3.2.4. Espermatogênese em *Rhodnius pallescens*

Na Figura 14 estão representados os cariótipos de *R. pallescens* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares (Figura 15a) mostra vários corpúsculos heteropicnóticos periféricos a um halo claro. Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam corpúsculos heteropicnóticos predominantemente dispersos no interior dos núcleos. Alguns núcleos mostram corpúsculos centrais (Figura 15b).

Os núcleos profásicos espermatogoniais apresentam-se com corpúsculos heteropicnóticos predominantemente dispersos em seu interior, sendo encontrados casos isolados de corpúsculos periféricos (Figura 15c, setas).

As metáfases espermatogonias apresentam cromossomos unidos por pontes cromatínicas. Notar que alguns cromossomos são heteropicnóticos (Figura 15d).

Na prófase meiótica I durante o "estádio confuso" os núcleos apresentam-se com um a dois corpúsculos heteropicnóticos (Figura 15e-f, setas). Os



núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese) apresentam dois corpúsculos heteropicnóticos (Figura 15g) e um quiasma (Figura 15h, seta).

As metáfases da primeira divisão meiótica apresentam 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (Figura 15i-j). Em (i) a placa metafásica é observada em vista frontal e, em (j), vista lateral. A metáfase da segunda divisão apresenta uma disposição anelar dos autossomos com os cromossomos sexuais no centro da placa metafásica (Figura 15k).

Nas anáfases meióticas são observados cromossomos sexuais de migração tardia (Figura 15l, setas). A telófase meiótica está representada na Figura 15m.

As espermátides no início da espermiogênese são arredondadas e apresentam uma condensação da cromatina (Figura 15n), sendo que no decorrer desta fase as células alongam-se e perdem esta condensação (Figura 15o).

3.2.5. Espermatogênese em *Rhodnius prolixus*

Na Figura 16 estão representados os cariótipos de *R. prolixus* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares (Figura 17a) apresenta um único corpúsculo heteropicnótico sendo possível observar a presença de regiões mais claras próximas ao corpúsculo. Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais (Figura 17b) sendo, observados, também, corpúsculos dispersos no interior dos núcleos. Nos núcleos profásicos espermatogoniais os corpúsculos estão localizados na periferia (Figura 17c).

As metáfases espermatogoniais apresentam cromossomos unidos por pontes cromatínicas (Figura 17d). Alguns cromossomos apresentam heteropicnose.

Os núcleos no início da prófase meiótica I ("estádio confuso") apresentam-se com três corpúsculos heteropicnóticos (Figura 17e). O núcleo da prófase I meiótica em diacinese apresenta um corpúsculo heteropicnótico e um quiasma (Figura 17f, seta).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Metáfases de primeira divisão meiótica (Figura 17g-h) apresentando em (h) uma metáfase com 10 bivalentes autossômicos dispostos em anel e dois cromossomos sexuais no centro deste. A metáfase da segunda divisão apresenta-se com uma disposição anelar dos autossomos, sendo que os sexuais localizam-se no centro do anel. O cromossomo sexual X é maior que Y (Figura 17i).

Na Figura 17(j-l), estão representadas as anáfases meióticas I. Em (k, seta) observa-se cromossomos de migração tardia. A telófase meiótica está representada na Figura 17(m).

As espermátides iniciais apresentam uma pequena região de condensação cromatínica fracamente marcada (Figura 17n, setas). Em um estádio mais adiantado da espermiogênese (maturação) estas células alongam-se e continuam exibindo a pequena região cromatínica condensada (Figura 17o, setas). As células já diferenciadas em espermatozóides mostram pequenos corpúsculos heteropicnóticos (Figura 17p, setas).

3.2.6. Espermatogênese em *Rhodnius robustus*

Na Figura 18 estão representados os cariótipos de *R. robustus* (20A + XY) em metáfase espermatogonial (a), metáfase da primeira divisão meiótica (b) e metáfase da segunda divisão meiótica (c).

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentam dois corpúsculos heteropicnóticos (Figura 19a), já os núcleos interfásicos das células espermatogoniais possuem corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais (Figura 19b) e os núcleos profásicos das células espermatogoniais (Figura 19c), os corpúsculos heteropicnóticos encontram-se dispersos pelo interior dos núcleos.

As metáfases espermatogoniais (20A+XY) apresentam os cromossomos unidos por pontes cromatínicas (Figura 19d).

Os núcleos da prófase I meiótica em "estádio confuso" estão representados na Figura 19(e-g). Notar em (e) a presença de três corpúsculos heteropicnóticos e, em (f-g, setas), a presença de dois corpúsculos heteropicnóticos.

Nas metáfases da primeira divisão meiótica os autossomos e os cromossomos sexuais estão distribuídos na placa metafásica sem nenhuma



ordenação característica (Figura 19h-i). As metáfases da segunda divisão apresentam-se com 10 cromossomos autossomos e dois cromossomos sexuais (Figura19j-k). Notar que os autossomos se dispõem em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro (j) ou próximos à periferia da placa metafásica (k).

As anáfases meióticas apresentam cromossomos de migração tardia (Figura 19l-n). A telófase meiótica está representada na Figura 19(o).

As espermátides iniciais (Figura 19p) e as espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese (Figura 19q) apresentam regiões de condensação da cromatina. As espermátides na fase final da espermiogênese apresentam um pequeno corpúsculo heteropicnótico (Figura 19r, seta).

Na Tabela 2 estão resumidos e comparados os principais resultados obtidos, através da técnica de esmagamento e posterior coloração com orceína lacto-acética, dos túbulos testiculares das seis espécies do gênero *Rhodnius* analisadas no presente estudo. Os espaços com traços indicam que as estruturas celulares dos túbulos testiculares não foram fotomicrografadas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Tabela 2: Comparações dos principais resultados obtidos através da técnica de orceína lacto-acética, em túbulos testiculares das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus.*

	R. domesticus	*R. neglectus*	*R. neivai*	*R. pallescens*	*R. prolixus*	*R. robustus*
Núcleos poliplóides das células do epitélio do túbulo testicular	✓Um corpúsculo heteropicnótico grande e vários menores	✓Um único corpúsculo heteropicnótico, com halo claro ao redor	✓Vários corpúsculos heteropicnóticos sobre um halo claro	✓Corpúsculos periféricos a um halo claro	✓Um único corpúsculo heteropicnótico ✓Presença de regiões claras	✓Dois corpúsculos heteropicnóticos
Núcleos interfásicos das células espermatogoniais	✓Corpúsculos heteropicnóticos centrais	✓Corpúsculos heteropicnóticos dispersos	✓Corpúsculos heteropicnóticos dispersos	✓Corpúsculos heteropicnóticos dispersos	✓Corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais	✓Corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais
Núcleos profásicos das células espermatogoniais	✓Corpúsculos heteropicnóticos periféricos e centrais	✓Corpúsculos heteropicnóticos dispersos	✓Corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo	✓Corpúsculos heteropicnóticos predominantemente periféricos	✓Corpúsculos heteropicnóticos na periferia do núcleo	✓Corpúsculos heteropicnóticos dispersos
Metáfases espermatogoniais	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Heteropicnose de alguns cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Heteropicnose de alguns cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Heteropicnose de alguns cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Heteropicnose de alguns cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos
Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso")	✓Presença de dois corpúsculos heteropicnóticos	✓Presença de um a três corpúsculos heteropicnóticos	———	✓Presença de um corpúsculos heteropicnóticos	✓Presença de três corpúsculos heteropicnóticos	✓Presença de dois a três corpúsculos heteropicnóticos
Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese)	✓Cromossomo sexual heteropicnótico ✓Quiasmas	✓Cromossomos sexuais são os menores	✓Cromossomo sexual heteropicnótico ✓Quiasmas	✓Cromossomos sexuais heteropicnóticos ✓Quiasmas	✓Cromossomo sexual heteropicnótico ✓Quiasmas	———

Metáfases da primeira divisão meiótica	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Cromossomos autossomos e sexuais formando um anel	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Não há ordenação na disposição dos cromossomos	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais no centro ou distribuídos aleatoriamente	✓10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais ✓Não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais
Metáfases da segunda divisão meiótica	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais	✓10 autossomos e XY ✓Autossomos se dispõem em anel ao redor dos cromossomos sexuais
Anáfases e Telófases meióticas	✓Anáfases com cromossomos de migração tardia ✓Telófases sem cromossomos com migração tardia	✓Anáfases e ✓Telófases apresentam cromossomos com migração tardia	✓Anáfases com cromossomos de migração tardia ✓Cromossomos sexuais heteropicnóticos ✓Telófases sem cromossomos de migração tardia	✓Anáfases com cromossomos de migração tardia ✓Telófases sem cromossomos de migração tardia	✓Anáfases com cromossomos de migração tardia ✓Telófases sem cromossomos de migração tardia	✓Anáfases com cromossomos de migração tardia ✓Telófases sem cromossomos de migração tardia
Espermátides	✓Regiões cromatínicas condensadas	✓Regiões cromatínicas condensadas	✓Regiões cromatínicas condensadas	✓Regiões cromatínicas condensadas	✓Regiões cromatínicas condensadas fracas	✓Regiões cromatínicas condensadas
Espermatozóides	✓Sem corpúsculo heteropicnótico	✓Sem corpúsculo heteropicnótico	✓Com um pequeno corpúsculo heteropicnótico	✓Sem corpúsculo heteropicnótico	✓Sem corpúsculo heteropicnótico	✓Com um pequeno corpúsculo heteropicnótico

unesp

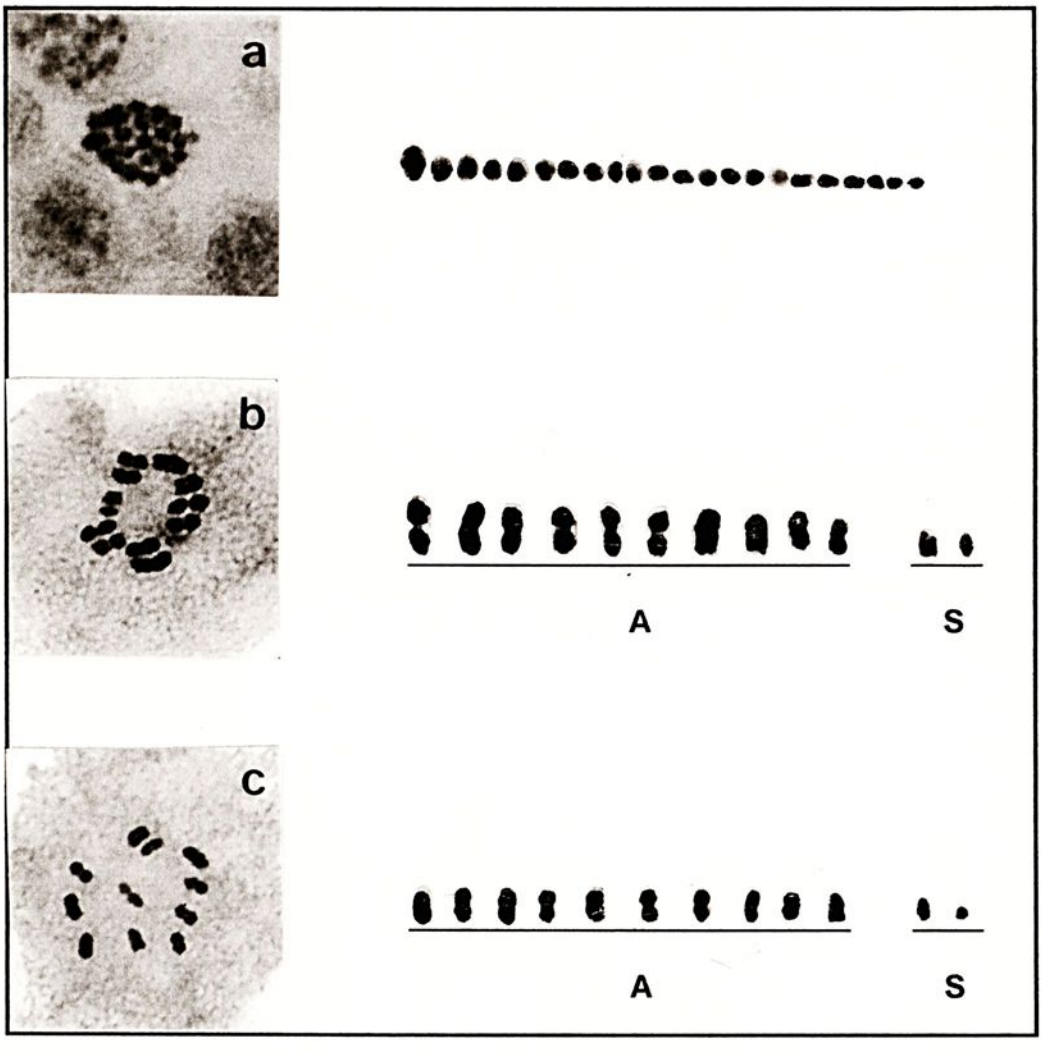
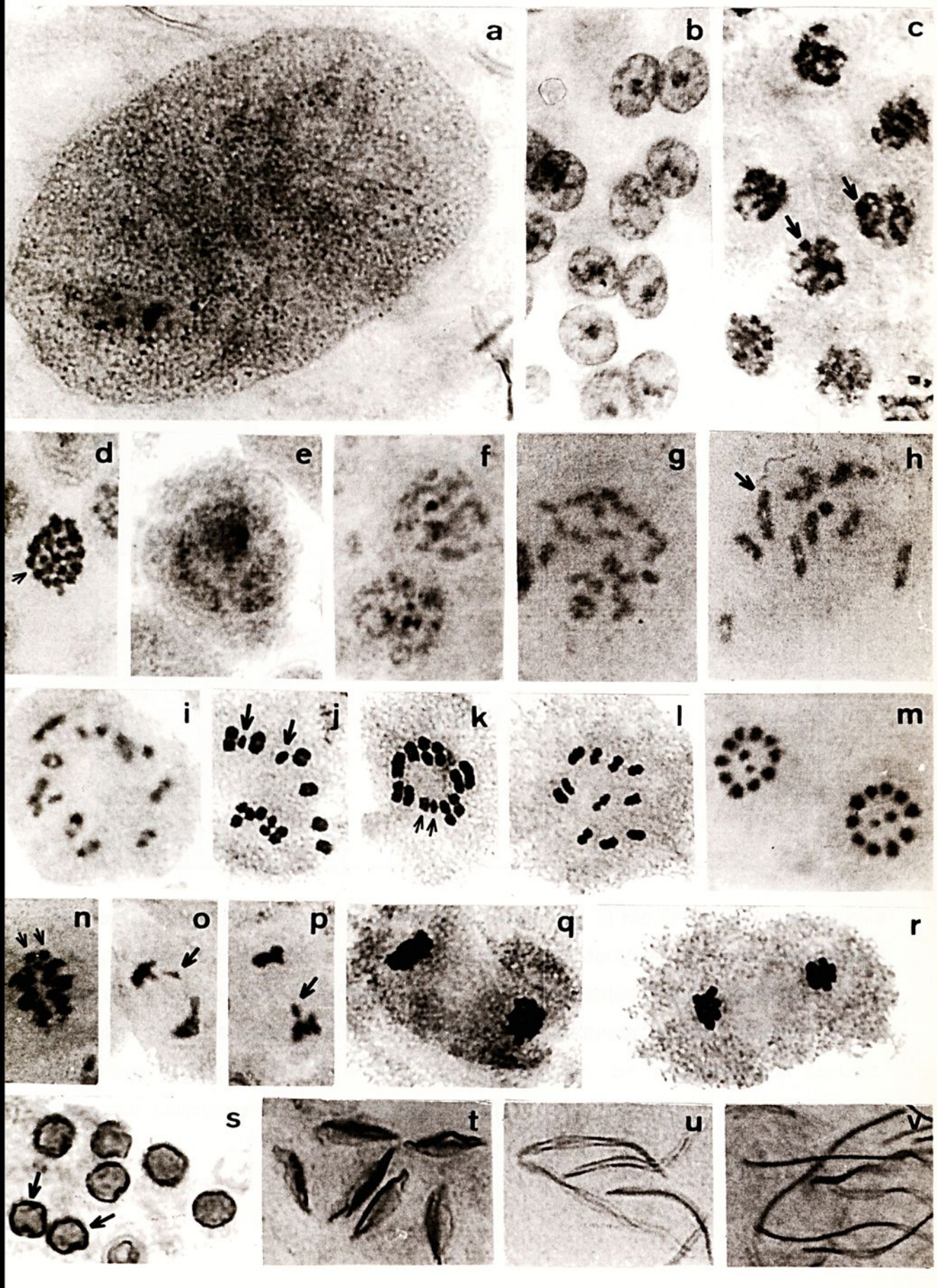


Figura 8. Cariótipos da espécie *Rhodnius domesticus*. **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 9 a-v. Túbulos testiculares de *R. domesticus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um corpúsculo heteropicnótico grande e vários corpúsculos menores ao redor deste sobre um halo claro. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Notar corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais no interior dos núcleos. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais. Observar a presença de corpúsculos heteropicnóticos periféricos (setas) e dispersos nos núcleos. Notar algumas regiões cromossômicas heteropicnóticas **(d)** Metáfase espermatogonial. A seta indica filamento cromatínico unindo os cromossomos. **(e-f)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") apresentando de um a três corpúsculos heteropicnóticos. **(g-i)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Notar a presença de quiasma (seta). **(j-k)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(l-m)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e dois cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromosssomos sexuais situam-se no centro deste. **(n-p)** Anáfases meióticas com presença de cromossomos de migração tardia (setas). Em (n) as setas indicam os cromossomos sexuais. **(q-r)** Telófases meióticas. **(s)** Espermátides no início da espermiogênese. As setas indicam regiões cromatínicas condensadas. **(t)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese. Notar que as células tornam-se progressivamente alongadas e a condensação da cromatina permanece. **(u)** Espermátides em fase final da espermiogênese. **(v)** Espermatozóides. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t
u
v

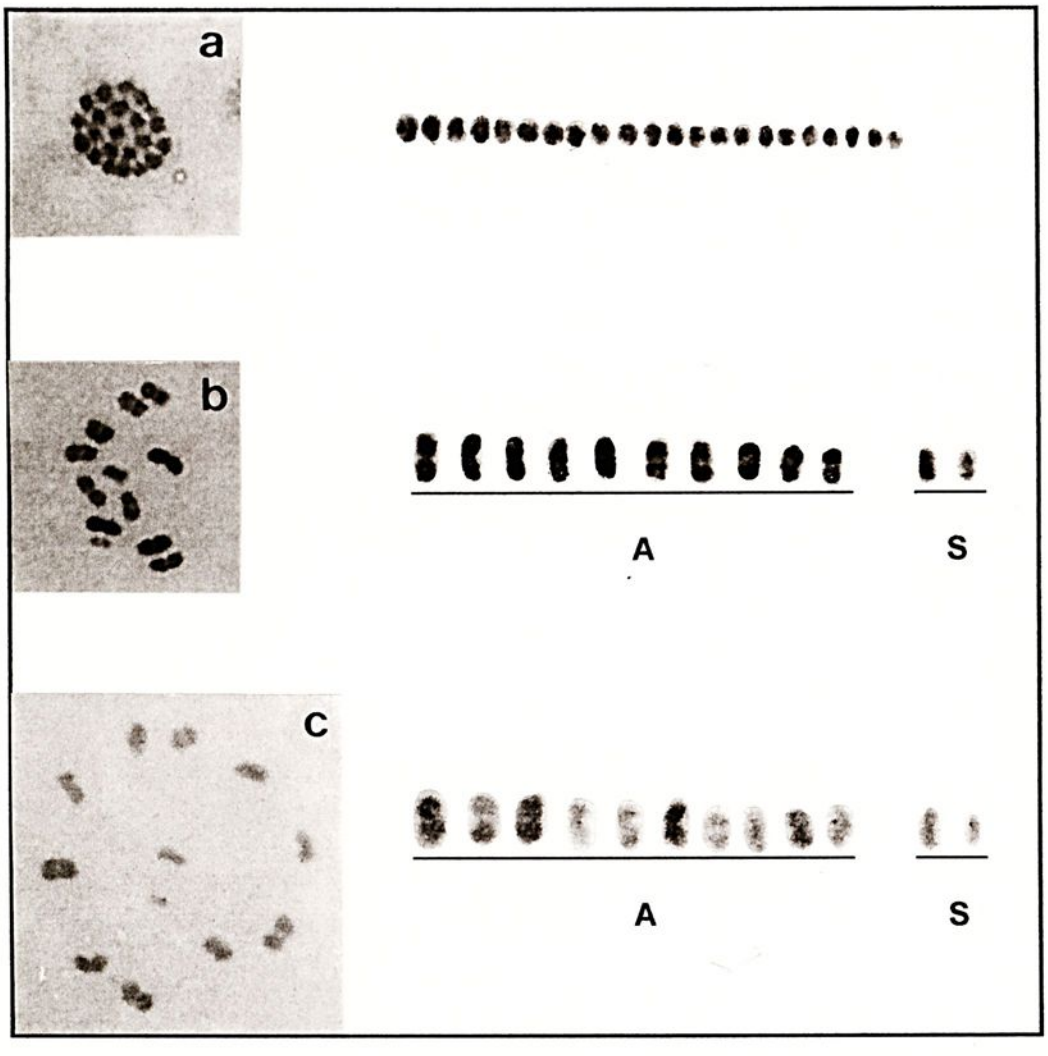
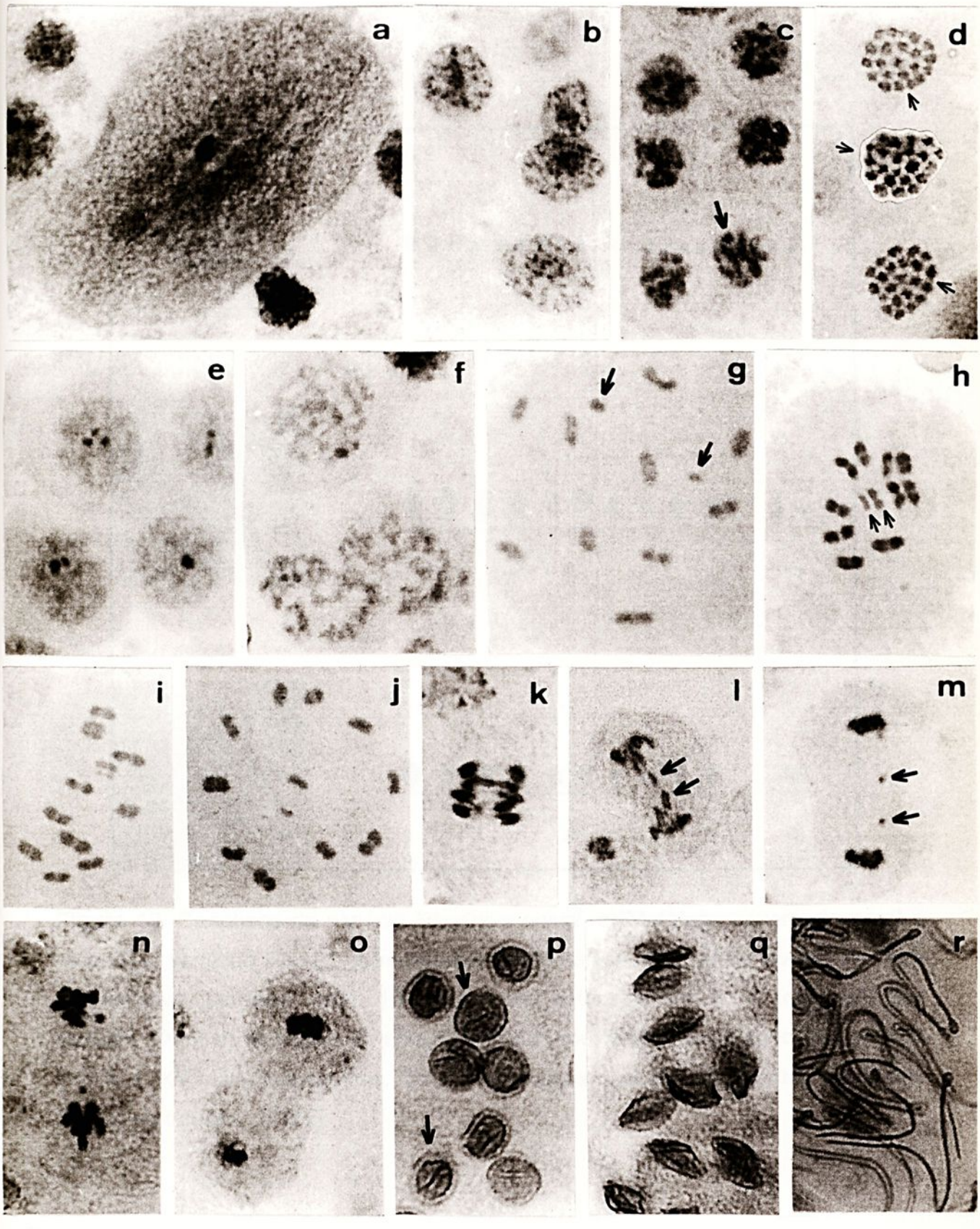


Figura 10. Cariótipos da espécie *Rhodnius neglectus.* **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 11 a-r. Túbulos testiculares de *R. neglectus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um único corpúsculo heteropicnótico. Notar a presença de um halo claro ao redor deste. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos predominantemente dispersos no interior dos núcleos e menos freqüentemente na periferia do núcleo (seta). **(d)** Metáfases espermatogoniais. As setas indicam filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Notar a presença de cromossomos heteropicnóticos. **(e)** Núcleos no início da prófase I meiótica ("estádio confuso"). Observar a presença de um a três corpúsculos heteropicnóticos. **(f)** Núcleos em estádio mais avançado da prófase I meiótica. **(g)** Núcleo da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). As setas indicam os cromossomos sexuais. **(h-i)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais indicados pelas setas. **(j)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 bivalentes e dois cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os sexuais situam-se no centro deste. **(k-m)** Anáfases meióticas. As setas indicam cromossomos de migração tardia. **(n-o)** Telófases meióticas. Notar em (n) cromossomos com migração tardia. **(p)** Espermátides no início da espermiogênese. Notar a presença de um halo claro ao redor destas. As setas indicam regiões condensadas da cromatina. **(q)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese. Notar as regiões condensadas da cromatina e o alongamento progressivo das células. **(r)** Espermatozóides. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r

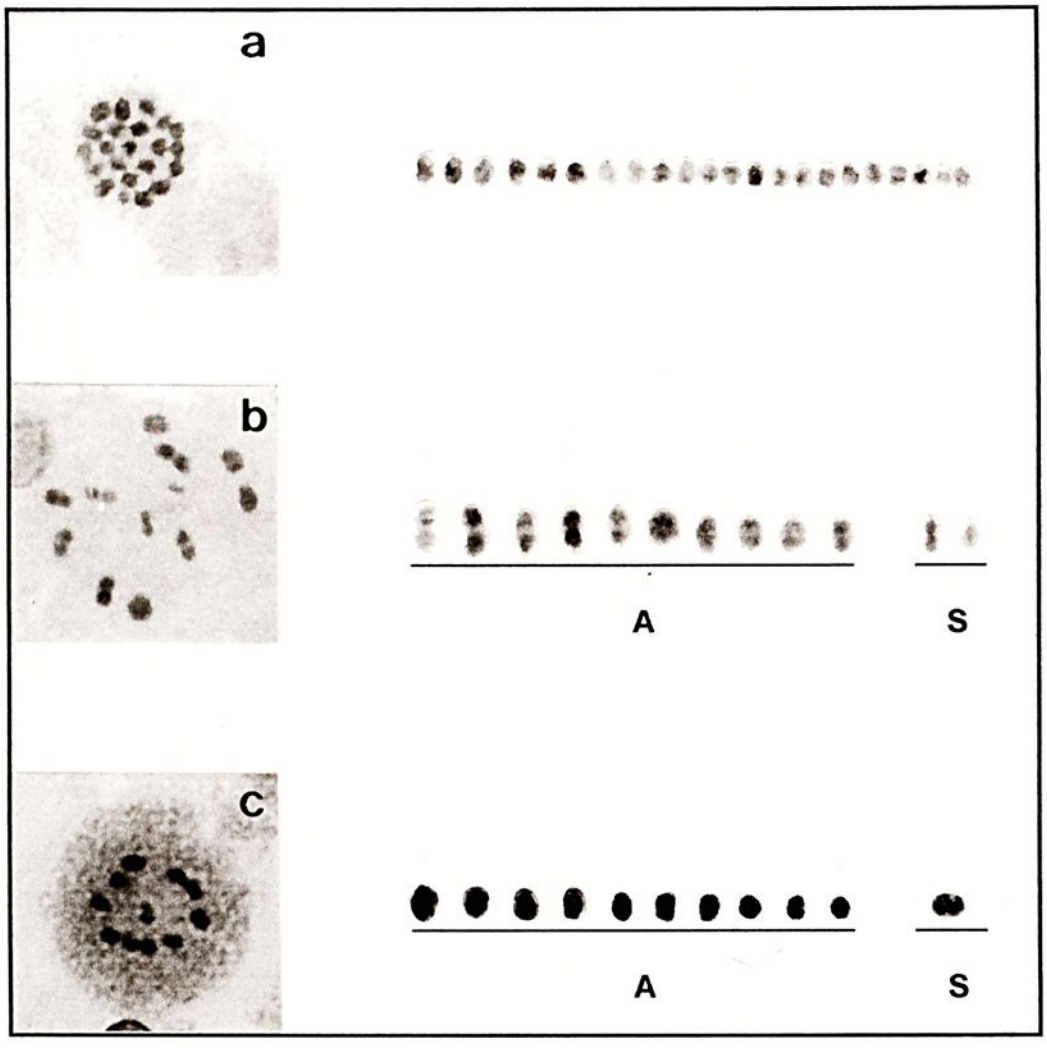
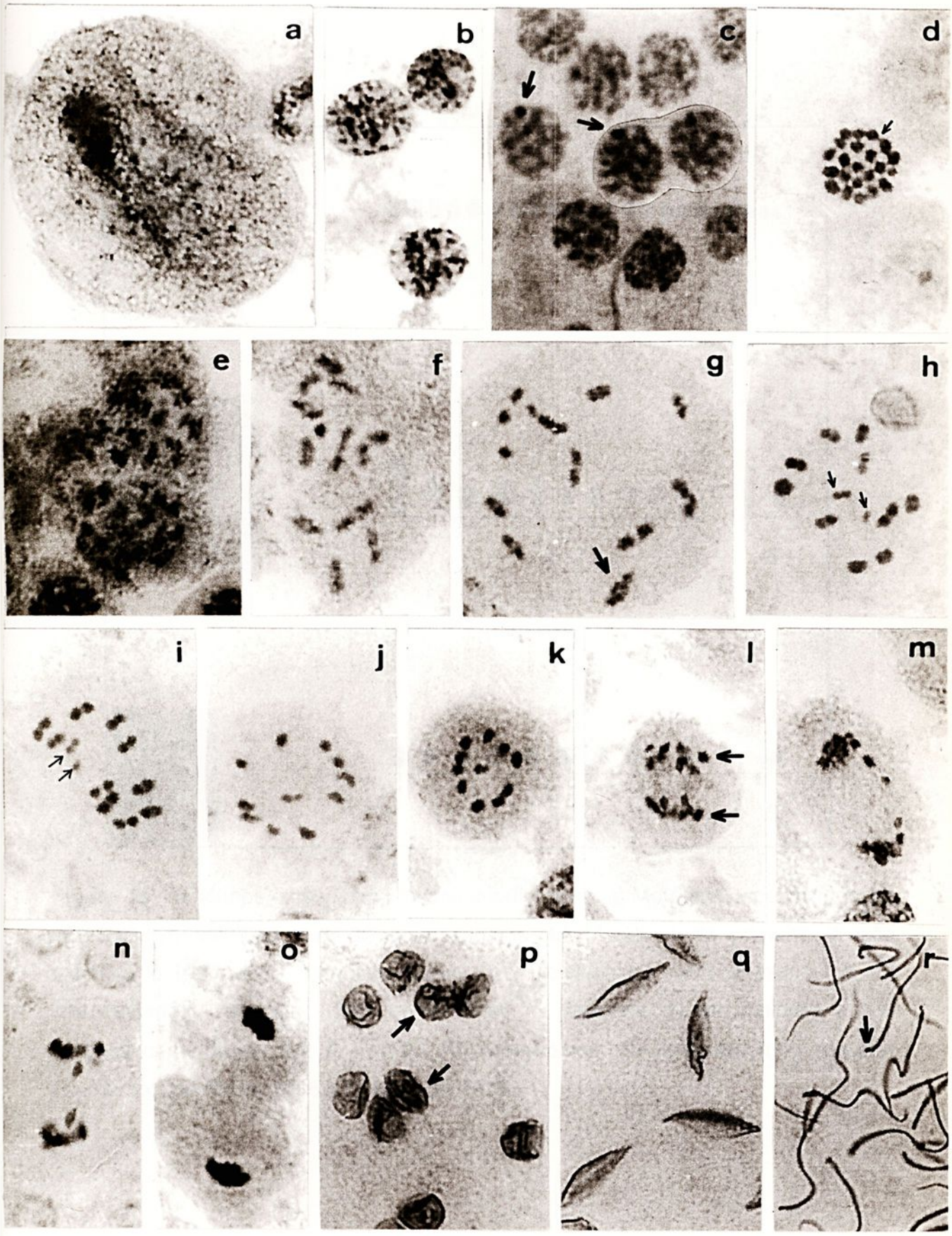


Figura 12. Cariótipos da espécie *Rhodnius neivai.* **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 13 a-r. Túbulos testiculares de *R. neivai* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com a presença de vários corpúsculos heteropicnóticos sobre um halo claro. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais. Observar corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais. As setas indicam corpúsculos heteropicnóticos na periferia dos núcleos. **(d)** Metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos (seta). **(e-g)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Em (g) a seta indica um quiasma. **(h-i)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (setas). **(j-k)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e dois cromossomos sexuais. Observar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. **(l-n)** Anáfases meióticas. Notar a presença de cromossomos com migração tardia. Em (l) as setas indicam os cromossomos sexuais heteropicnóticos. Em (m) observa-se a migração progressiva dos cromossomos tardios (sexuais). **(o)** Telófase meiótica. **(p)** Espermátides no início da espermiogênese com regiões pouco condensadas da cromatina (setas). **(q)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese. Notar o alongamento das células e a presença de regiões pouco condensadas da cromatina. **(r)** Espermatozóides. Notar a presença de pontos heteropicnóticos em alguns espermatozóides (seta). (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r

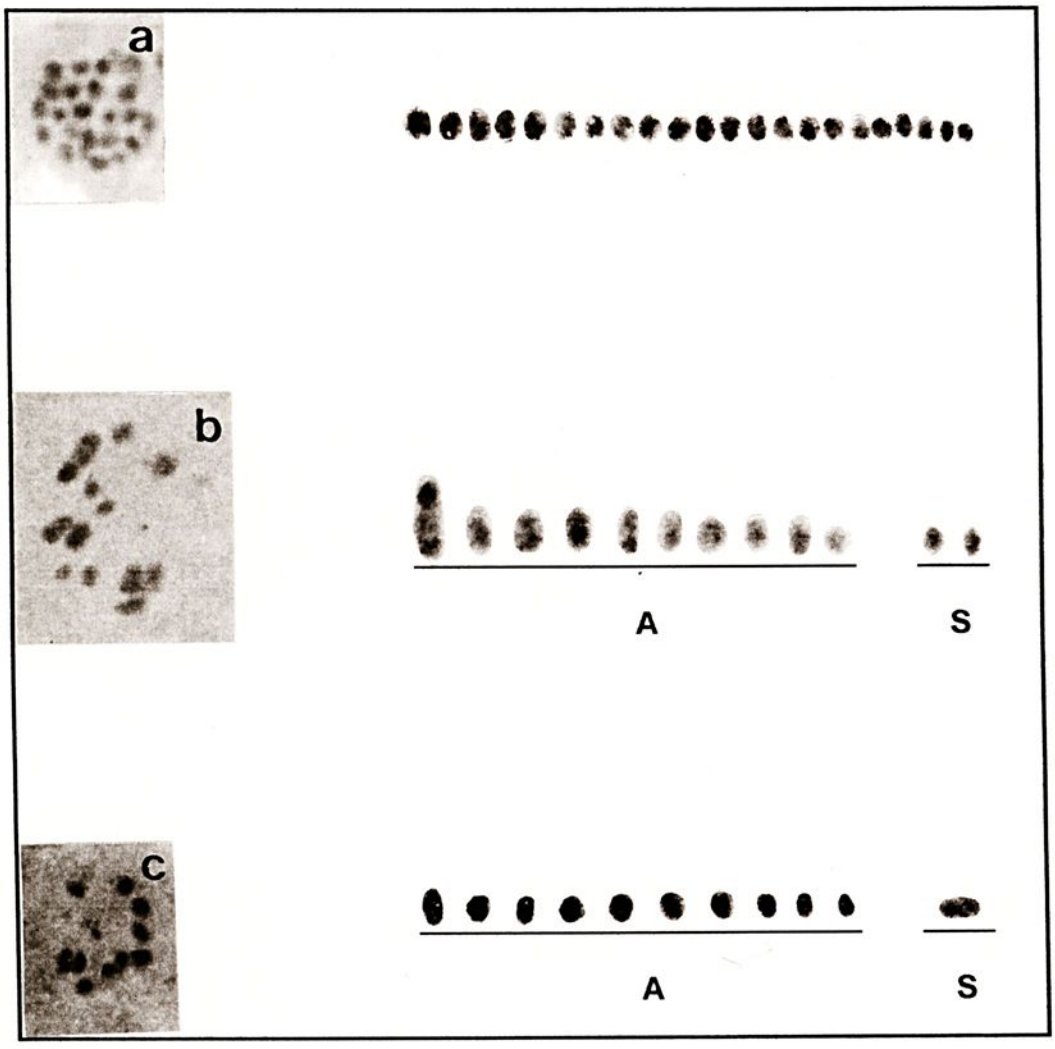
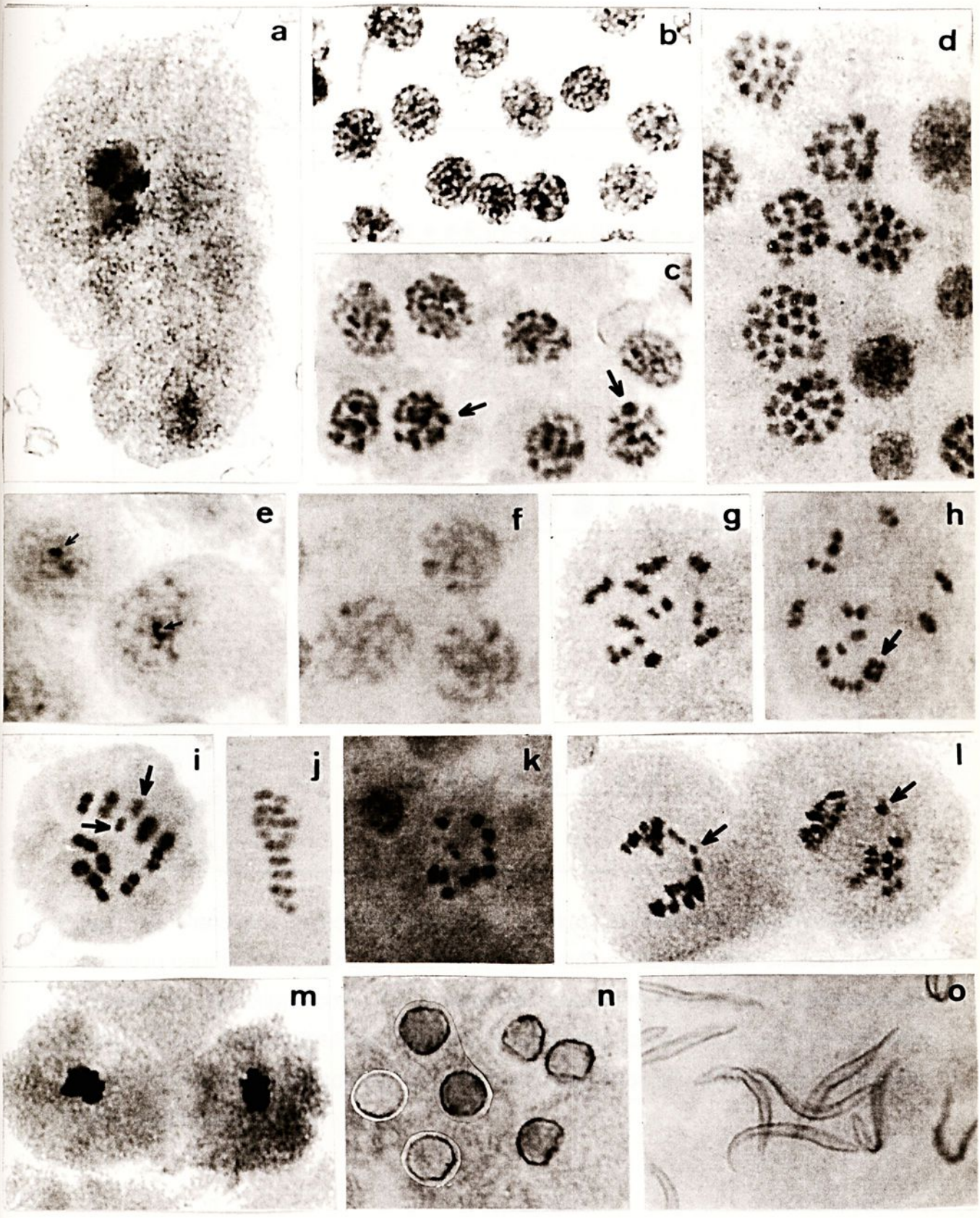


Figura 14. Cariótipos da espécie *Rhodnius pallescens.* **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 15 a-o. Túbulos testiculares de *R. pallescens* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Núcleo poliplóide das células da parede dos túbulos com a presença de pequenos corpúsculos heteropicnóticos periféricos a um halo claro. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos predominantemente dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos distribuídos no interior dos núcleos e na periferia (seta). **(d)** Metáfases espermatogoniais com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Notar alguns cromossomos heteropicnóticos**. (e-f)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") com um a dois corpúsculos heteropicnóticos (setas). **(g-h)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Em (h) a seta indica um quiasma. **(i-j)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (setas). Em (i) vista frontal, em (j) vista lateral. **(k)** Metáfase da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e dois cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se nó centro deste. **(l)** Anáfases meióticas com cromossomos de migração tardia (setas). **(m)** Telófase meiótica. **(n)** Espermátides no início da espermiogênese com regiões cromatínicas condensadas. **(o)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese. Notar o alongamento das células. (1815x).




a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o

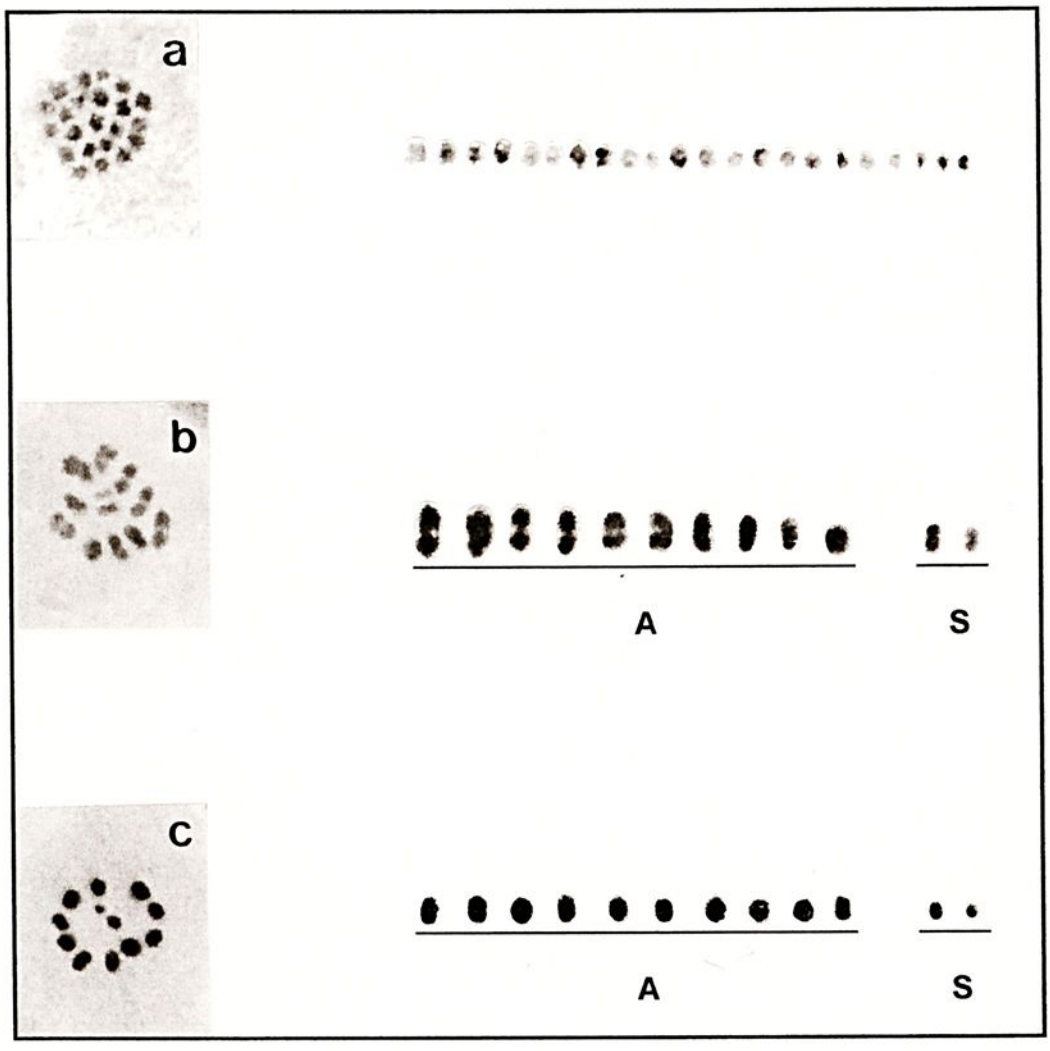
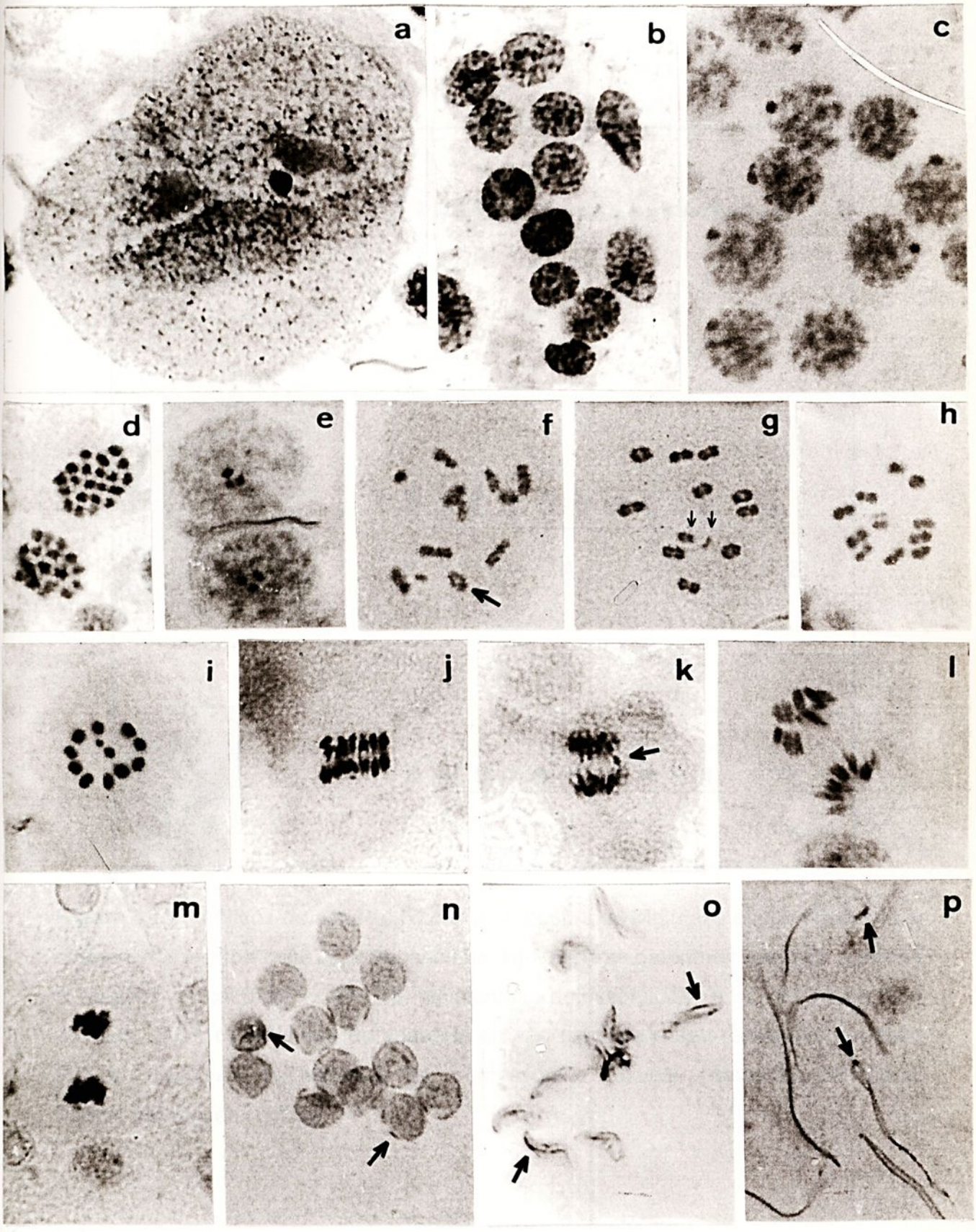


Figura 16. Cariótipos da espécie *Rhodnius prolixus*. **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 17 a-p. Túbulos testiculares de *R. prolixus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um corpúsculo heteropicnótico. Notar a presença de regiões mais claras nas proximidades do corpúsculo. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais no interior dos núcleos. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos na periferia dos núcleos. **(d)** Metáfases espermatogoniais com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Notar a presença de cromossomos heteropicnóticos. **(e)** Núcleos no início da prófase I meiótica ("estádio confuso") com três corpúsculos heteropicnóticos. **(f)** Núcleo da prófase I meiótica (diacinese). A seta indica a formação de quiasma. **(g-h)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (setas). Notar em (h) que os cromossomos sexuais se dispõem no cento do anel formado pelos autossomos. **(i)** Metáfase da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e dois cromossomos sexuais. Observar que os autossomos são dispostos em anel e os cromossomos sexuais situam-se no centro deste. **(j-l)** Anáfases meióticas apresentando cromossomo com migração tardia (seta). **(m)** Telófase meiótica. **(n)** Espermátides no início da espermiogênese com uma pequena região de condensação cromatínica (setas). **(o)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese (maturação) com pequenas regiões de condensação cromatínica (setas). **(p)** Espermatozóides. Notar a presença de corpúsculos ou pontos heteropicnóticos (setas). (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p

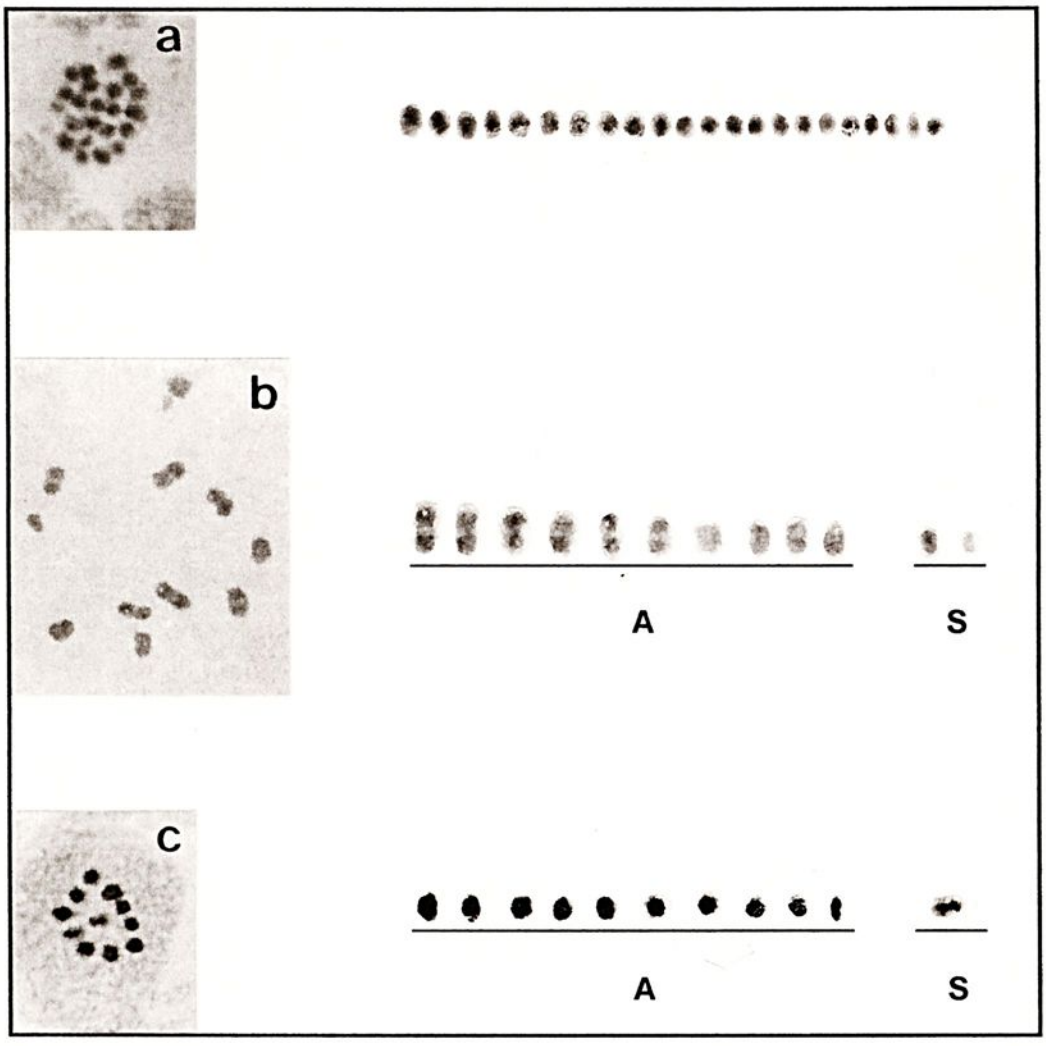
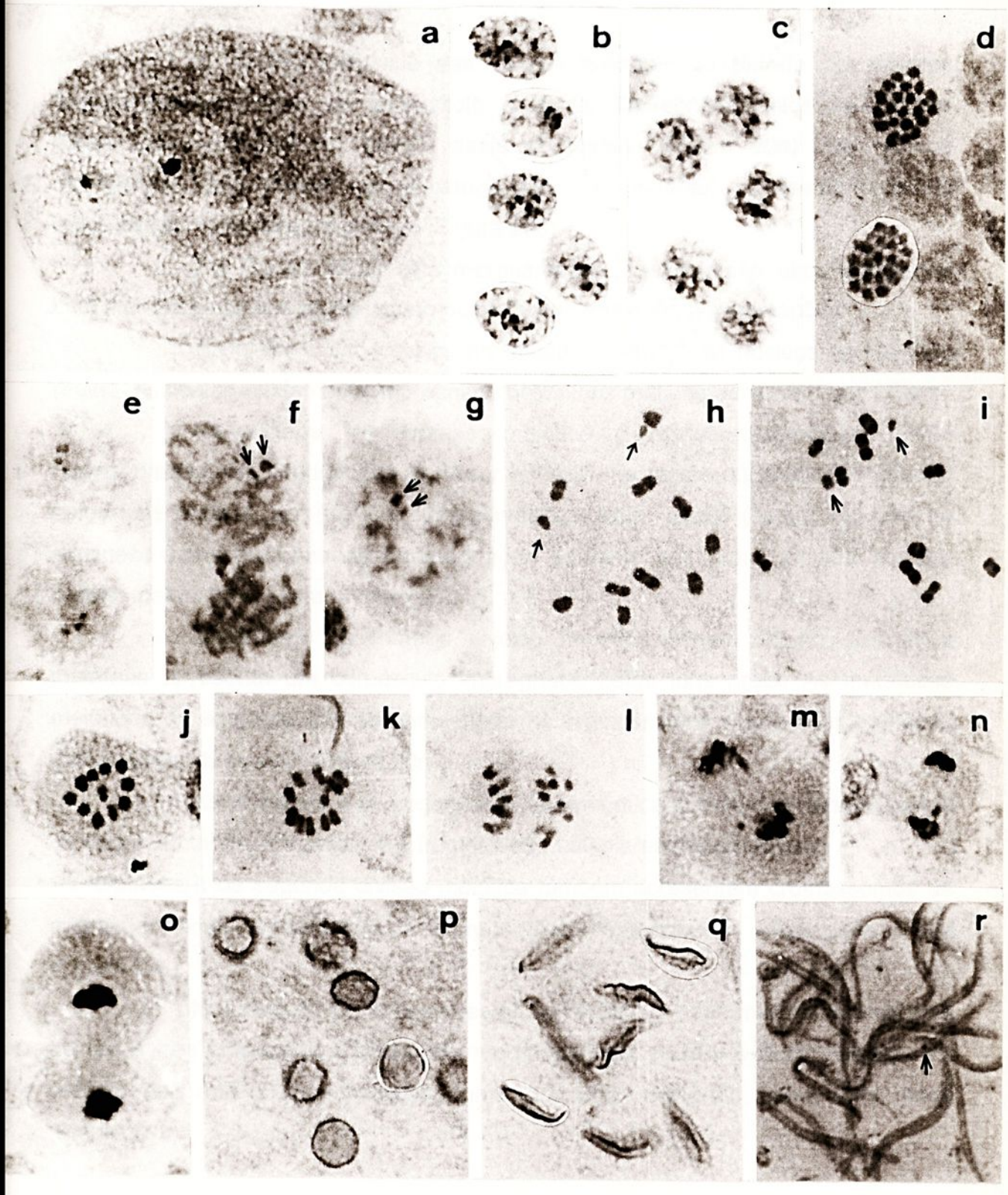


Figura 18. Cariótipos da espécie *Rhodnius robustus*. **a)** Metáfase espermatogonial e respectivo cariótipo com 22 cromossomos. **b)** Metáfase da primeira divisão meiótica e respectivo cariótipo com 10 bivalentes autossômicos e 2 cromossomos sexuais (XY). **c)** Metáfase da segunda divisão meiótica e seu respectivo cariótipo (10 A + XY). A= autossomos, S= cromossomos sexuais. (Aumento: cariótipos: 2396x, metáfases: 1815x)

Figura 19 a-r. Túbulos testiculares de *R. robustus* submetidos à técnica de orceína lacto-acética. **(a)** Nucleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com a presença de dois corpúsculos heteropicnóticos. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos predominantemente centrais. **(c)** Núcleos profásicos das células espermatogoniais com corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos. **(d)** Metáfases espermatogoniais com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. **(e-g)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso"). Notar em (e) a presença de três corpúsculos heteropicnóticos e, em (f-g), a presença de dois corpúsculos heteropicnóticos (setas). **(h-i)** Metáfases da primeira divisão meiótica com 10 bivalentes autossômicos e dois cromossomos sexuais (setas). **(j-k)** Metáfases da segunda divisão meiótica com 10 autossomos e dois cromossomos sexuais. Notar que os autossomos são dispostos em anel e os cromosomos sexuais situam-se no centro deste. **(l-n)** Anáfases meióticas com presença de cromossomos com migração tardia. **(o)** Telófase meiótica. **(p)** Espermátides no início da espermiogênese apresentando condensação cromatínica. **(q)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese (maturação). Notar a presença de regiões de condensação cromatínica. **(r)** Espermátides na fase final da espermiogênese. A seta indica um ponto heteropicnótico. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r

3.3. Impregnação por Íons Prata

3.3.1. Espermatogênese em *Rhodnius domesticus*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. Observa-se vesículas no interior deste corpúsculo (Figura 20a). Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais, no entanto, apresentam vários corpúsculos nucleolares dispersos (Figura 20b).

Na Figura 20(c), está representada uma metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos e tênues marcações.

Na prófase I da meiose, no "estádio confuso", os núcleos apresentam região nucleolar nitidamente impregnada pelos íons prata na periferia (Figura 20d).

Os núcleos da prófase meiótica I (diplóteno-diacinese) estão representados na Figura 20(e-g). Notar em (e) uma região nucleolar impregnada pelos íons prata e, em (f-g), a fragmentação desta região (setas). No final de diacinese é possível observar a impregnação evidente dos cromossomos sexuais (setas) pelos íons prata (Figura 20h-k).

Metáfases da primeira divisão meiótica (Figura 20l-m). Em (l) a metáfase apresenta um corpúsculo impregnado pelos íons prata. As metáfases meióticas da segunda divisão apresentam os cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata (setas) (Figura 20n-o).

As anáfases II da segunda divisão meiótica apresentam cromossomos de migração tardia, corpúsculos e fragmentos nucleolares (Figura 20p-q).

As telófases II da segunda divisão meiótica também apresentam cromossomos de migração tardia (Figura 20r) e corpúsculos impregnados pelos íons prata (Figura 20s).

No início da espermiogênese (Figura 20t) as espermátides apresentam de um a três corpúsculos fortemente marcados pela prata. As espermátides, em estádio mais adiantado, apresentam uma pequena marcação pelos íons prata (Figura 20u).



3.3.2. Espermatogênese em *Rhodnius neglectus*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede do túbulos testiculares apresenta um único corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata (Figura 21a). Notar a presença de vesículas no interior deste corpúsculo. Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam várias marcações nucleolares (Figura 21b).

A metáfase espermatogonial apresenta filamentos cromatínicos unindo os cromossomos (Figura 21c).

Na prófase I da meiose, no "estádio confuso" (Figura 21d-e), os núcleos apresentam região nucleolar nitidamente impregnada pelos íons prata em (d). Notar em (e) pontos dispersos impregnados pelos íons prata.

Os núcleos em diplóteno-diacinese (Figura 21f-h) apresentam em (f, seta) uma região nucleolar composta por três corpúsculos heteropicnóticos próximos uns dos outros e pequenos corpúsculos ligados aos cromossomos. E, em (g), pode-se notar pequenos corpúsculos impregnados pelos íons prata ligados aos autossomos.

As metáfases da primeira divisão meiótica não apresentam marcações nítidas, mas pode-se notar pequenos pontos impregnados pelos íons prata em alguns cromossomos autossômicos (setas) (Figura 21i).

Metáfases da segunda divisão meiótica (Figura 21j-k). Notar em (j) a presença, na placa metafásica, de fragmentos nucleolares e em (k) a presença de um ponto impregnado pelos íons prata em um dos cromossomos sexuais.

Durante a anáfase meiótica é possível observar fragmentos impregnados pelos íons prata (Figura 21l-m). Notar em (m) além de um fragmento, a presença de um corpúsculo nucleolar (seta).

As espermátides no início da espermiogênese e em estádios mais adiantados apresentam apenas uma marcação nucleolar impregnada pelos íons prata (Figura 21n-o). Os espermatozóides não apresentam marcação (Figura 21p).

3.3.3. Espermatogênese em *Rhodnius neivai*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentam vários corpúsculos nucleolares devido à impregnação pelo

nitrato de prata (Figura 22a). Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam vários corpúsculos impregnados pelos íons prata (Figura 22b).

A metáfase espermatogonial apresenta filamentos cromatínicos (seta) unindo os cromossomos e algumas regiões cromossômicas impregnadas pelos íons prata (Figura 22c).

Na prófase I da meiose, no "estádio confuso" (Figura 22d-f), os núcleos apresentam uma região nucleolar nitidamente impregnada pelos íons prata (d-f) e vários corpúsculos impregnados (d) dispersos pelo núcleo. Notar em (e-f) que a região nucleolar aparece formada por vários corpúsculos nucleolares. O núcleo em diacinese não apresenta nenhuma marcação característica pelos íons prata (Figura 22g).

As metáfases da primeira (Figura 22h-j) e segunda (Figura 22k) divisões meióticas apresentam fragmentos impregnados pelos íons prata (setas) dispersos pela placa metafásica. Notar algumas regiões cromossômicas com marcação.

As anafáses (Figura 22l-n) apresentam pontes cromatínicas em (l-m) e cromossomos de migração tardia (n). Na Figura 22(o) está representada uma telófase meiótica.

No início da espemiogênese as espermátides apresentam de um a dois corpúsculos impregnados pelos íons prata (Figura 22p) e, no decorrer desta fase, as espermátides apresentam apenas um corpúsculo nucleolar e pequenos fragmentos impregnados pelos íons prata (Figura 22q). Os espermatozóides não apresentam marcação (Figura 22r).

3.3.4. Espermatogênese em *Rhodnius pallescens*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta um único corpúsculo impregnado pelos íons prata. Nota-se, no interior deste, a presença de vesículas e, em sua proximidade uma região clara (Figura 23a). Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam pequenos corpúsculos, dispersos, impregnados pelos íons prata (Figura 23b).

As metáfases espermatogoniais apresentam filamentos cromatínicos unindo os cromossomos e algumas regiões cromossômicas impregnadas pelos íons prata (Figura 23c).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Na prófase I da meiose, no "estádio confuso" (Figura 23d-e), os núcleos apresentam uma região nucleolar impregnada pelos íons prata e fragmentos nucleolares dispersos em seu interior. As setas em (e) indicam fragmentos nucleolares. Os núcleos da prófase I meiótica durante o paquíteno apresentam uma região fortemente impregnada pelos íons prata. Notar a condensação cromatínica (Figura 23f).

As metáfases da primeira divisão meiótica apresentam corpúsculos e fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata (Figura 23g-h). Nas metáfases da segunda divisão meiótica é possível evidenciar impregnação pelos íons prata nos cromossomos sexuais (setas), marcações de corpúsculos e fragmentos nucleolares (setas maiores) (Figuras 23i-l).

As anáfases meióticas apresentaram corpúsculos e fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata (Figura 23m-n, setas).

As espermátides, no início da espermiogênese e em estádio mais adiantado, mostram apenas um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata (Figura 23o-p). Os espermatozóides mostram-se sem marcação (Figura 23q).

3.3.5. Espermatogênese em *Rhodnius prolixus*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta um único corpúsculo impregnado pelos íons prata (Figura 24a). Nota-se, também, a presença de cinco regiões ou corpúsculos mais claros dentro do núcleo. Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais, no entanto, apresentam vários corpúsculos impregnados pelos íons prata, uns maiores, outros menores (Figura 24b).

Nas metáfases espermatogoniais observam-se filamentos cromatínicos unindo os cromossomos e algumas regiões cromossômicas impregnadas pelos íons prata (Figura 24c).

Na prófase I da meiose, no "estádio confuso", os núcleos apresentam uma região nucleolar nitidamente impregnada pelos íons prata (Figura 24d-e). Os núcleos em diplóteno-diacinese (Figura 24f-g) mostram uma região nucleolar impregnada pelos íons prata formada por três corpúsculos nucleolares em (f) e por dois corpúsculos em (g). No final de diacinese os núcleos apresentam os

cromossomos sexuais nitidamente impregnados pelos íons prata (Figura 24h-j, setas).

A metáfase meiótica da primeira divisão apresentada no detalhe mostra um corpúsculo impregnado pelos íons prata (Figura 24k). As metáfases da segunda divisão meiótica (Figura 24l-n) apresentam-se com fragmentos nucleolares dispersos impregnados pelos íons prata (l) e, nota-se em (m-n) que um dos cromossomos sexuais apresenta-se menos condensado.

As anáfases apresentam corpúsculos e fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata (Figura 24o-q). Nota-se em (o) a presença de um corpúsculo tenuemente marcado formando uma ponte com um corpúsculo menor (seta).

As espermátides iniciais mostram dois corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata (Figura 24r), ao passo que as espermátides, em estádio mais adiantado da espermiogênese, apresentam um único corpúsculo impregnado (Figura 24s). A Figura 24(t) mostra espermatozóides sem marcação.

3.2.6. Espermatogênese em *Rhodnius robustus*

O núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresenta uma região impregnada pelos íons prata. Notar na periferia desta um corpúsculo heteropicnótico e duas outras regiões mais claras (Figura 25a). Os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentam vários corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata, uns maiores, outros menores (Figura 25b).

A metáfase espermatogonial apresenta algumas marcações nítidas e filamentos cromatínicos unindo os cromossomos (Figura 25c).

Na prófase I, no "estádio confuso", os núcleos apresentam uma marcação nucleolar intensa (Figura 25d-f). Notar que em (e), além da marcação de uma região nucleolar, este núcleo apresenta mais três corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata. No diplóteno-diacinese é possível observar uma região nucleolar impregnada pelos íons prata e a marcação dos cromossomos sexuais (setas) e de alguns autossomos (ponta das setas) (Figura 25g-h).

Nas metáfases da primeira divisão meiótica são observados alguns fragmentos nucleolares (Figura 25i-j). Nas metáfases da segunda divisão meiótica é

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

observado que um dos cromossomos sexuais apresenta-se menos condensado (Figura 25k-n).

Nas anáfases meióticas observam-se cromossomos de migração tardia e alguns fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata (seta) (Figura 25o-r).

No início da espermiogênese as espermátides apresentam três corpúsculos evidentes e, em estádios mais adiantados, apresentam um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata (Figura 25s-t).

Na Tabela 3 estão resumidos e comparados os principais resultados obtidos, através da técnica de esmagamento e posterior impregnação por íons prata, dos túbulos testiculares das seis espécies do gênero *Rhodnius* analisadas neste estudo. Os espaços com traços indicam que as estruturas celulares do túbulo testicular não foram fotomicrografadas

Tabela 3: Comparações dos principais resultados obtidos através da impregnação por íons prata, em túbulos testiculares das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus.*

	R. domesticus	*R. neglectus*	*R. neivai*	*R. pallescens*	*R. prolixus*	*R. robustus*
Núcleos poliplóides das células do epitélio do túbulo testicular	✓Presença de um corpúsculo nucleolar com vesículas no seu interior	✓Um único corpúsculo nucleolar com vesículas no seu interior	✓Vários corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata	✓Presença de um corpúsculo nucleolar com vesículas no seu interior ✓Presença de um corpúsculo claro	✓Presença de um corpúsculo impregnado pelos íons prata ✓Presença de corpúsculos claros	✓Presença de um corpúsculo impregnado pelos íons prata ✓Presença de corpúsculos claros
Núcleos interfásicos das células espermatogoniais	✓Corpúsculos nucleolares dispersos no interior dos núcleos	✓Presença de várias marcações nucleolares impregnadas pelos íons prata	✓Corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos	✓Corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos	✓Corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos	✓Corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos
Metáfases espermatogoniais	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos e marcações tênues	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Impregnação de alguns cromossomos pelos íons prata	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Impregnação de alguns cromossomos pelos íons prata	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Impregnação de alguns cromossomos pelos íons prata	✓20+XY ✓Pontes cromatínicas unindo os cromossomos ✓Impregnação de alguns cromossomos pelos íons prata

unesp

Núcleos da prófase I meiótica ("estádio cofuso)	✓Presença de um corpúsculo nucleolar periférico	✓Presença de uma região nucleolar impregnada pelos íons prata	✓Um corpúsculo e pequenos fragmentos nucleolares	✓Presença de uma região nucleolar impregnada pelos íons prata	✓Presença de uma região nucleolar impregnada pelos íons prata	✓Marcação nucleolar intensa
Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese)	✓Cromossomos sexuais fortemente impregnado pelos íons prata ✓Final de diacinese: presença de cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata	✓Presença de região nucleolar impregnada pelos íons prata, com cromossomos sexuais envolvidos nesta região ✓Impregnação de alguns autossomos	✓Sem marcação característica	_____	✓Presença de regiões nucleolares impregnadas pelos íons prata, com cromossomos sexuais envolvidos nesta região ✓Final de diacinese: presença de cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata	✓Presença de um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata ✓Presença de impregnação pelos íons prata em alguns autossomos e nos cromossomos sexuais
Núcleos da prófase meiótica I (paquíteno)	_____	_____	_____	✓Presença de um grande corpúsculo impregnado pelos íons prata	_____	_____
Metáfases da primeira divisão meiótica	✓Presença de corpúsculo nucleolar impregnado	✓Alguns bivalentes autossômicos apresentam impregnação pelos Íons prata	✓Presença de alguns bivalentes autossômicos e fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata	✓Presença de corpúsculo e fragmentos nucleolares no interior da célula	✓Presença de corpúsculo nucleolar no interior da célula	✓Presença de fragmentos nucleolares no interior da célula

unesp

Metáfases da segunda divisão meiótica	✓Cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata	✓Presença de fragmentos nucleolares e de um dos cromossomos sexuais impregnado pelos íons prata	✓Presença de alguns autossômicos e fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata	✓Cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata ✓Presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares	✓Presença de fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata ✓Um dos cromossomos sexuais menos condensado	✓Presença de fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata e de um dos cromossomos sexuais menos condensado
Anáfases e Telófases meióticas	✓Anáfase II e Telófases II com presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares ✓Cromossomos com migração tardia	✓Anáfases com fragmentos e corpúsculo impregnados pelos íons prata	✓Anáfases com presença de pontes cromatínicas e cromossomos com migração tardia	✓Anáfases com fragmentos e corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata	✓Anáfases com fragmentos e corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata	✓Anáfases com fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata
Espermátides	✓No início da espermiogênese de um a três corpúsculos impregnados pelos íons prata ✓Nos estádios mais avançados um corpúsculo	✓No início da espermiogênese e nos estádios mais avançados com um corpúsculo impregnado pelos íons prata	✓No início da espermiogênese com um a dois corpúsculos impregnados pelos íons prata ✓Nos estádios mais avançados um corpúsculo	✓No início da espermiogênese ✓Nos estádios mais avançados com um corpúsculo impregnado pelos íons prata	✓No início da espermiogênese com dois corpúsculos impregnados pelos íons prata ✓Nos estádios mais avançados um corpúsculo	✓No início da espermiogênese com dois corpúsculos impregnados pelos íons prata ✓Nos estádios mais avançados um corpúsculo

Figura 20 a-v. Túbulos testiculares de *R. domesticus* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um corpúsculo impregnado pelos íons prata. Observar vesículas claras no interior do corpúsculo. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos nucleolares dispersos. **(c)** Metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. **(d)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") com corpúsculos nucleolares periféricos. **(e-g)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Notar em (e) a região nucleolar e, em (f-g), a fragmentação desta região (setas). **(h-k)** Núcleos da prófase I meiótica (final de diacinese). Observar em (i-j) a impregnação dos cromossomos sexuais pelos íons prata (setas). **(l-m)** Metáfases da primeira divisão meiótica (vista lateral). A seta indica corpúsculo nucleolar. **(n-o)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Em (n) vista lateral e, em (o), vista frontal. Notar a impregnação pelos íons prata nos cromossomos sexuais (setas). **(p-q)** Anáfases da segunda divisão meiótica com presença de cromossomos de migração tardia, corpúsculos e fragmentos. **(r-s)** Telófases da segunda divisão meiótica apresentando cromossomos com migração tardia. Notar em (r, seta) um fragmento impregnado e, em (s), corpúsculos impregnados pelos íons prata. **(t)** Espermátides no início da espermiogênese com presença de um a três corpúsculos marcados fortemente. **(u)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com pequena marcação pelos íons prata (setas). **(v)** Espermátides na fase final da espermiogênese com um ponto de marcação (seta). (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

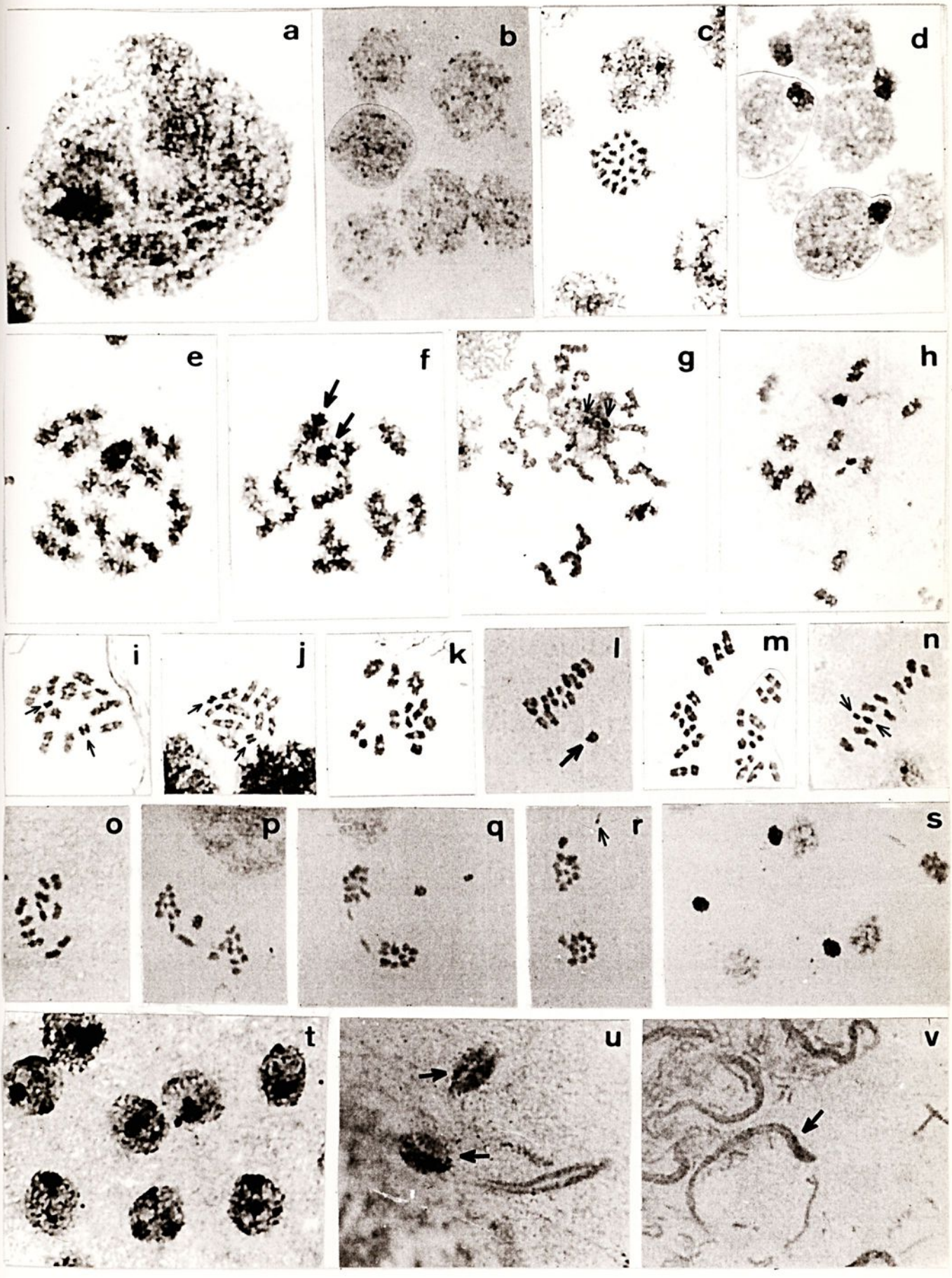

a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t
u
v

Figura 21 a-p. Túbulos testiculares de *R. neglectus* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um único corpúsculo impregnado pelos íons prata. Notar a presença de vesículas no interior deste corpúsculo. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentando vários corpúsculos nucleolares (setas) no interior dos núcleos. **(c)** Metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. **(d-e)** Núcleos no início da prófase I meiótica ("estádio confuso"). Observar a presença de uma região nucleolar impregnada pelos íons prata em (d). **(f-h)** Núcleo da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Notar em (f) a presença de região nucleolar (seta) e em (f-g) pequenos fragmentos impregnados pelos íons prata ligados aos autossomos. **(i)** Metáfases da primeira divisão meiótica. As setas indicam pequenos pontos de impregnação pelos íons prata em autossomos. **(j-k)** Metáfases da segunda divisão meiótica com fragmentos impregnados pelos íons prata (setas). Notar em (k) um pequeno ponto de impregnação em um dos sexuais (seta). **(l-m)** Anáfases meióticas. Observar fragmentos impregnados pelos íons prata. Em (m) a presença de um corpúsculo nucleolar (seta). **(n)** Espermátides no início da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata em cada célula. **(o)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. **(p)** Espermatozóides sem impregnação pelos íons prata. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

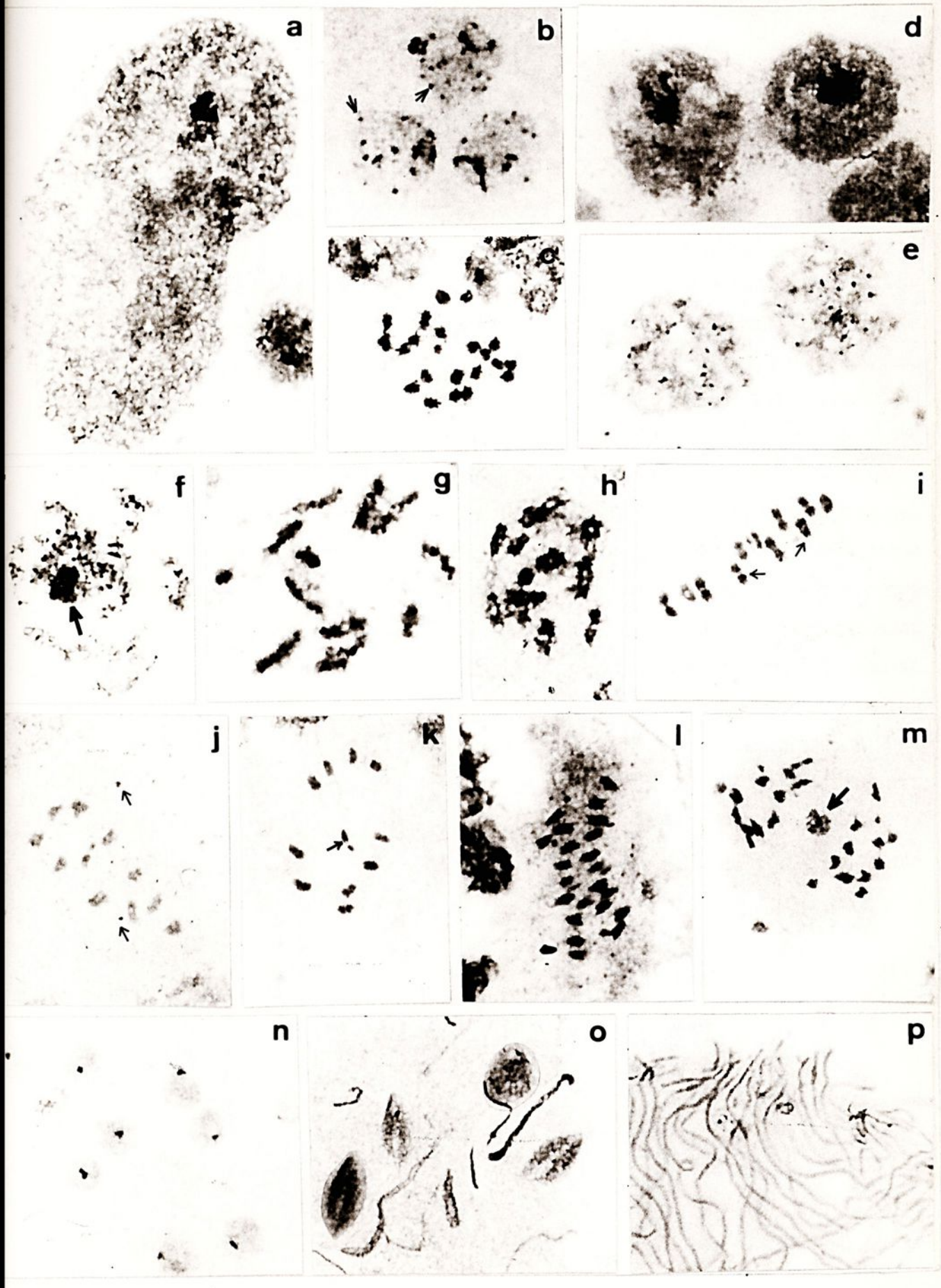

a
b
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p

Figura 22 a-r. Túbulos testiculares de *R. neivai* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com a presença de vários corpúsculos impregnados pelos íons prata sobre um halo claro. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos (seta). Notar alguns cromossomos impregnados pelos íons prata. **(d-f)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") com uma região nucleolar impregnada pelos íons prata. Notar em (d) a presença de pequenos fragmentos dispersos nos núcleos impregnados pelos íons prata. **(g)** Núcleo da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). **(h-j)** Metáfases da primeira divisão meiótica. Notar regiões cromossômicas e fragmentos impregnados pelos íons prata (setas). **(k)** Metáfase da segunda divisão meiótica com fragmentos impregnados pelos íons prata dispersos. **(l-n)** Anáfases meióticas. Notar a presença de pontes cromatínicas anafásicas em (l-m) e de cromossomos com migração tardia em (n). **(o)** Telófase meiótica. **(p)** Espermátides no início da espermiogênese com um a dois corpúsculos nucleolares (setas). **(q)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar e pequenos fragmentos impregnados pelos íons prata no seu interior. **(r)** Espermatozóides sem marcação. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

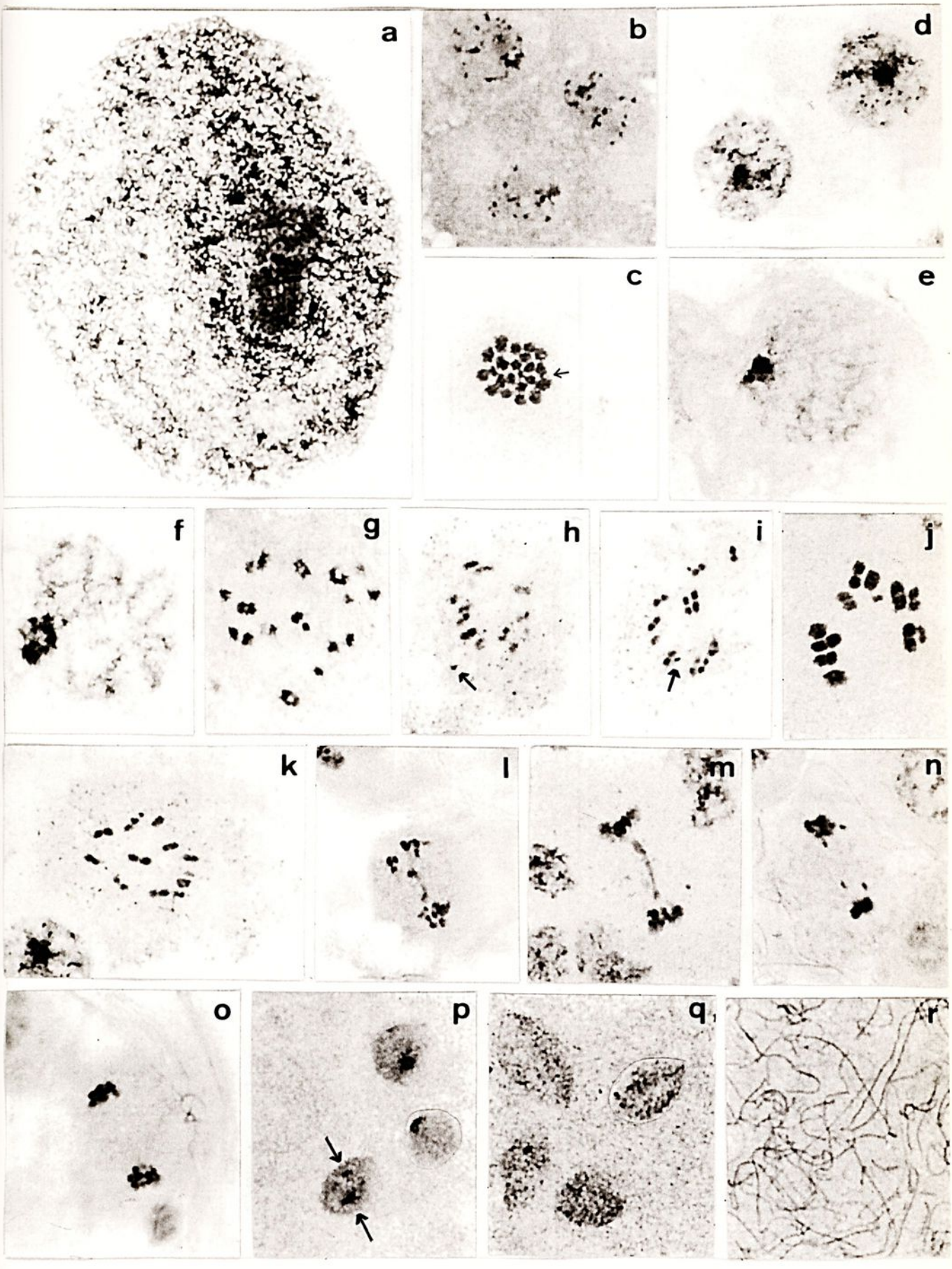

a
b
d
c
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r

Figura 23 a-q. Túbulos testiculares de *R. pallescens* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata. **(a)** Núcleo poliplóide das células da parede dos túbulos com a presença de um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. Notar a presença de vesículas no interior do corpúsculo e uma região clara próximo deste. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com corpúsculos nucleolares dispersos no interior dos núcleos impregnados pelos íons prata. **(c)** Metáfases espermatogoniais com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Notar alguns cromossomos impregnados pelos íons prata. **(d-e)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso"). Notar a presença de fragmentos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos (setas). **(f)** Núcleos da prófase I meiótica (paquíteno) com uma região nucleolar fortemente impregnada pelos íons prata. **(g-h)** Metáfases da primeira divisão meiótica. Observar a presença de corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. **(i-l)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Notar a impregnação dos cromossomos sexuais (setas) e dos corpúsculos e fragmentos nucleolares (setas maiores). **(m-n)** Anáfases meióticas com corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata (setas). **(o)** Espermátides no início da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. **(p)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. **(q)** Espermatozóides sem marcação. (1815x).



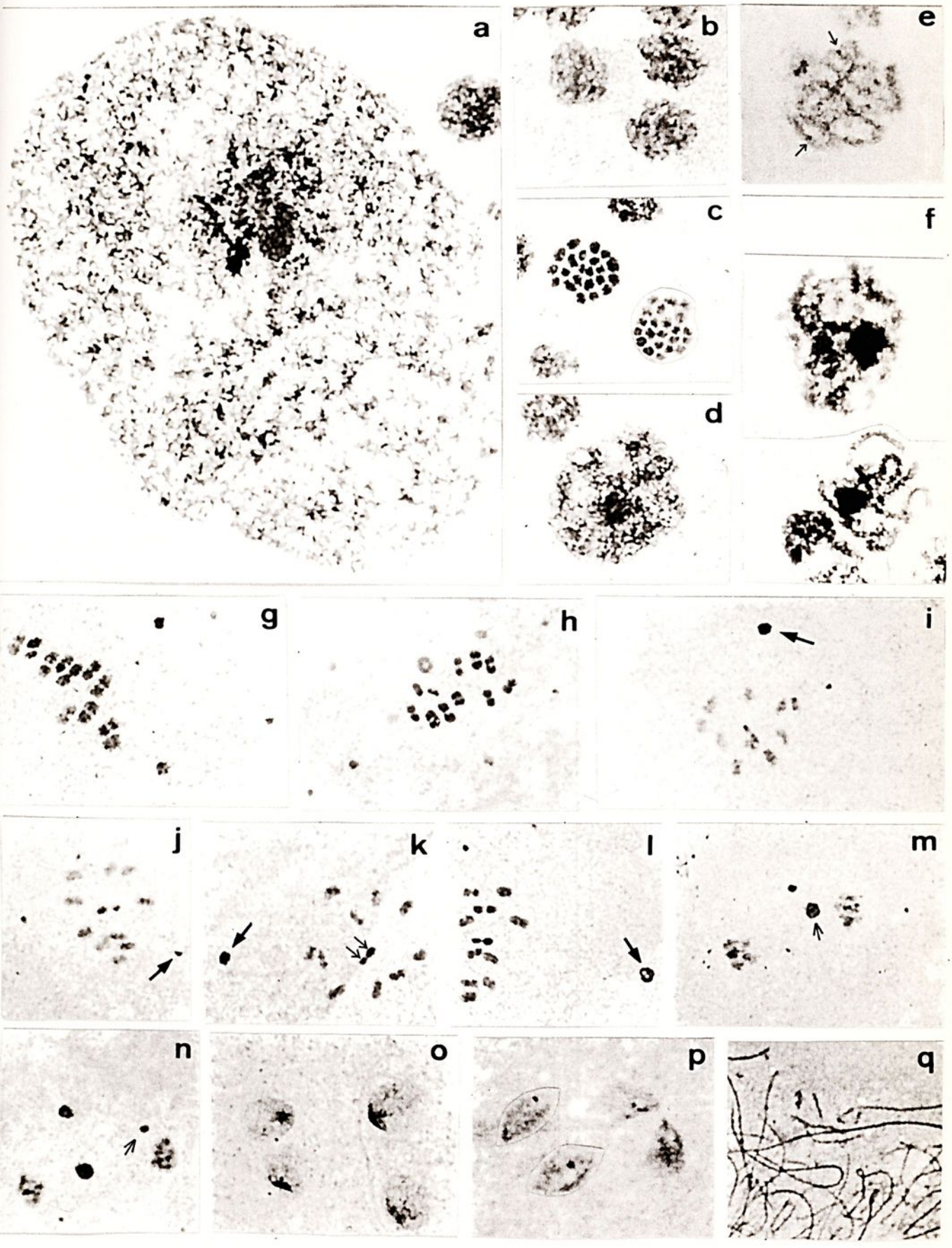

a
b
e
c
f
d
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q

Figura 24 a-t. Túbulos testiculares de *R. prolixus* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com um corpúsculo impregnado pelos íons prata. Notar a presença de cinco corpúsculos claros. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com vários corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Metáfases espermatogoniais com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos. Notar a presença de cromossomos impregnados pelos íons prata. **(d-e)** Núcleos no início da prófase I meiótica ("estádio confuso") com uma região nucleolar impregnada pelos íons prata. **(f-g)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese) apresentando três corpúsculos impregnados pelos íons prata em (f) e dois em (g). **(h-j)** Núcleos da prófase I meiótica (final de diacinese) apresentando os cromossomos sexuais impregnados pelos íons prata (setas). **(k)** Metáfases da primeira divisão meiótica. No detalhe a seta indica um corpúsculo impregnado pelos íons prata **(l-n)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Observar fragmentos impregnados pelos íons prata em (l) e em (m-n) um dos cromossomos sexuais apresenta-se menos condensado. **(o-q)** Anáfases meióticas com corpúsculos e fragmentos impregnados pelos íons prata. Notar em (o) a presença de um corpúsculo tenuemente marcado (seta). **(r)** Espermátides no início da espermiogênese com dois corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata. **(s)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com um corpúsculo impregnado pelos íons prata. **(t)** Espermatozóides sem marcação. (1815x).



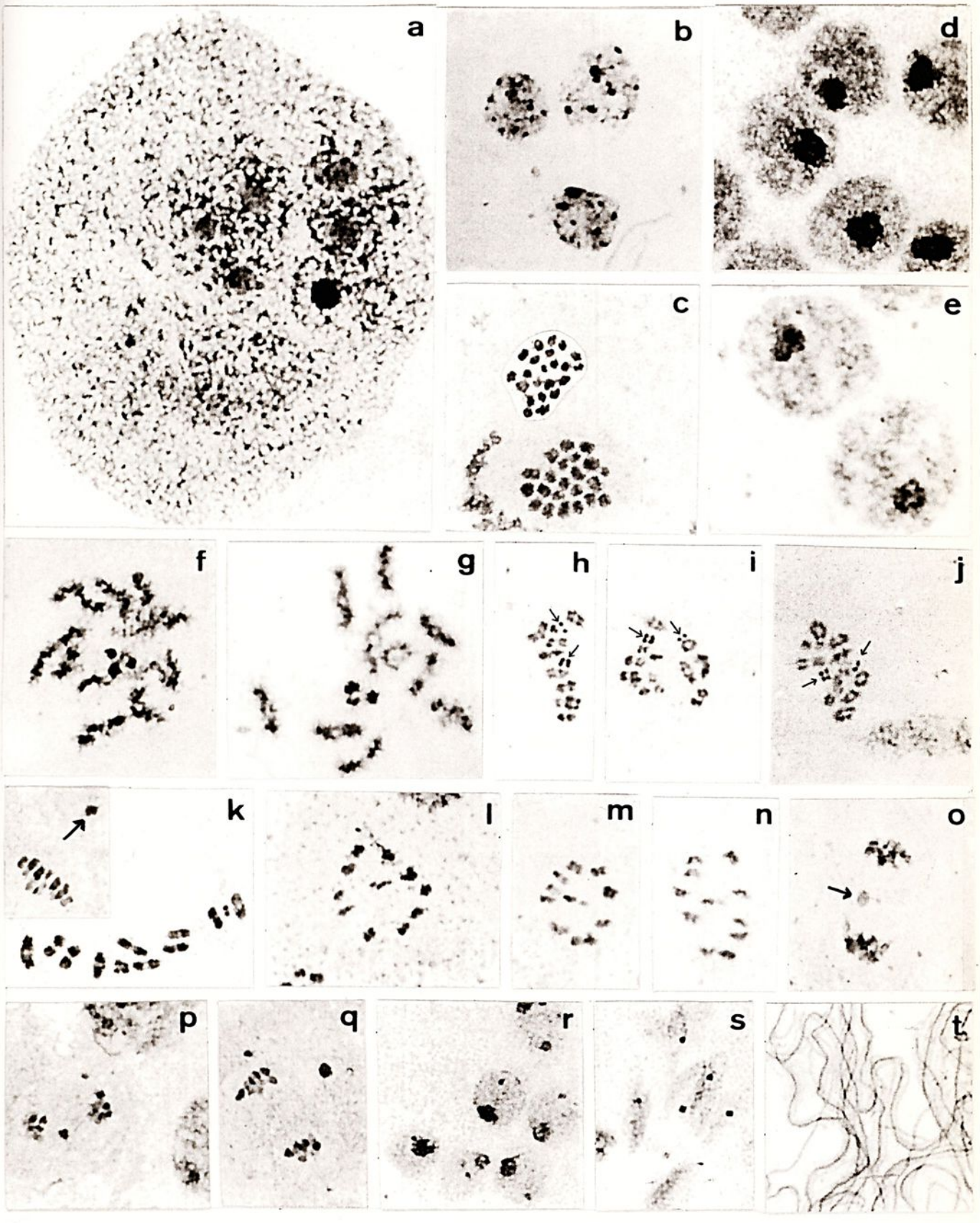
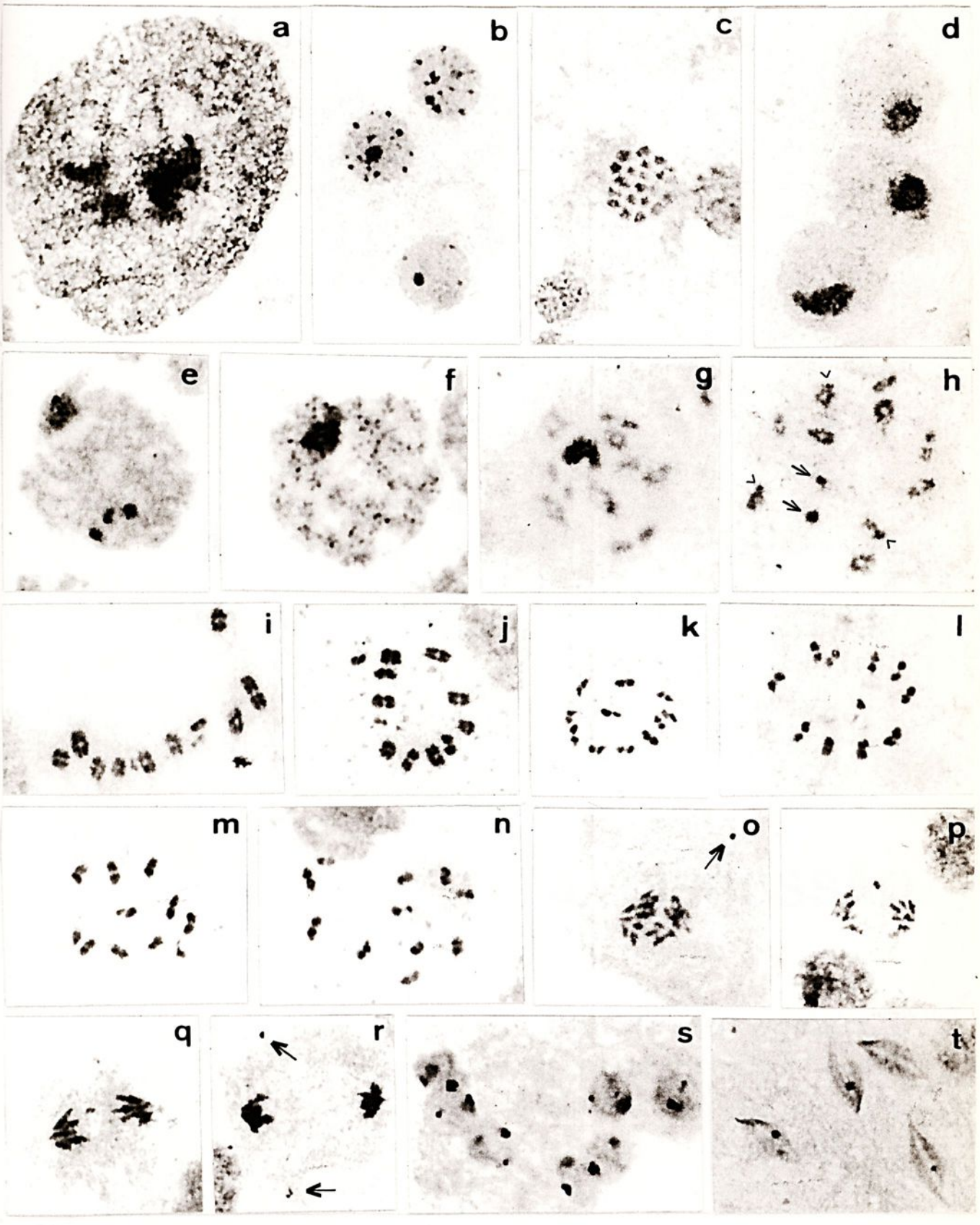

a
b
d
c
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t

Figura 25 a-t. Túbulos testiculares de *R. robustus* submetidos à técnica de impregnação pelos íons prata e contra coloração com Giemsa. **(a)** Núcleo poliplóide das células nutritivas da parede dos túbulos com a presença de uma região impregnada pelos íons prata. Notar um corpúsculo periférico a esta região. **(b)** Núcleos interfásicos das células espermatogoniais com vários corpúsculos nucleolares dispersos no interior dos núcleos. **(c)** Metáfase espermatogonial com filamentos cromatínicos unindo os cromossomos e alguns cromossomos impregnados pelos íons prata. **(d-f)** Núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") com uma região nucleolar impregnada pelos íons prata. Notar em (e), além da marcação de uma região nucleolar, a presença de mais três corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata. **(g-h)** Núcleos da prófase I meiótica (diplóteno-diacinese). Em (g) observar uma região nucleolar impregnada pelos íons prata e em (h) a impregnação dos sexuais (setas) e de alguns autossomos (pontas das setas). **(i-j)** Metáfases da primeira divisão meiótica com fragmentos impregnados pelos íons prata. **(k-n)** Metáfases da segunda divisão meiótica. Em (n) alguns autossomos apresentam-se impregnados pelos íons prata e em (l) um dos sexuais apresenta-se menos condensado. **(o-r)** Anáfases meióticas com presença de fragmentos impregnados pelos íons prata (seta) e cromossomos com migração tardia. **(s)** Espermátides no início da espermiogênese com três corpúsculos nucleolares impregnados pelos íons prata. **(t)** Espermátides em estádio mais adiantado da espermiogênese com um corpúsculo nucleolar impregnado pelos íons prata. (1815x).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18


a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados comparativamente, ao nível de microscopia de luz, aspectos da espermatogênese, comportamento nucleolar e distribuição das Regiões Organizadoras Nucleolares nos cromossomos dos triatomíneos do gênero *Rhodnius* das seguintes espécies: *R. domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus.*

4.1. Aspectos Gerais Relacionados aos Túbulos Testiculares

São inúmeros os trabalhos na Classe Insecta sobre a genitália interna, com abordagem anatômica. Alguns estudos recentes demonstraram que os resultados obtidos têm contribuído de forma significativa para a sistemática e filogenia. Na ordem Hemiptera alguns trabalhos concernentes aos túbulos testiculares tem discutido a sua aplicabilidade na sistemática e filogenia, enquanto outros limitam-se a descrições de aspectos morfológicos (GONÇALVES *et al.,* 1987).

Nos triatomíneos, o comprimento e a espessura dos túbulos testiculares variam consideravelmente entre gêneros e pouco entre espécies. SILVA & SCHREIBER, 1969 e GONÇALVES *et al.,* 1987 verificaram que em *Rhodnius* ssp existem dois túbulos longos e grossos e cinco curtos e finos; em *Triatoma* ssp existem dois longos e finos, dois médios e grossos e três curtos e finos e em *Panstrongylus* ssp existem sete aproximadamente iguais.

SILVA & SCHREIBER (1969) discutem que a diferença existente entre os tipos de túbulos pode ser uma característica de tribo ou gênero e que as diferenças de comprimento entre os túbulos parecem ser características de cada espécie.

GONÇALVES *et al.* (1987) detectaram diferença significativa no comprimento dos túbulos em espécies de mesmo gênero em 83,33% dos casos, quando as espécies foram comparadas simultaneamente e em 95,83% dos casos quando as espécies foram comparadas aos pares. Segundo os autores, os resultados obtidos são promissores à filogenia, desde que observado um número relativamente alto de espécies.

A variação observada em *Rhodnius neivai*, no presente trabalho, pode ser significativa e estar refletindo diferenças interespecíficas no gênero, uma vez que variação individual poderia ser inicialmente descartada, tendo em vista que todos os exemplares analisados (44) apresentaram o mesmo aspecto para os túbulos. Desta forma e concordando com GONÇALVES *et al.* (1987), possivelmente o estudo de um maior número de exemplares das espécies do gênero *Rhodnius* poderia ajudar a esclarecer a variação observada.

4.2. Coloração com Orceína Lacto-Acética

A taxonomia da subfamília Triatominae até recentemente, era realizada quase inteiramente sobre determinações morfológicas. Cruzamentos experimentais entre espécies foram usados para compreender seus parentescos filogenéticos (UESHIMA, 1966; USINGER *et al.,* 1966 *apud* PÉREZ *et al.,* 1992) ou para avaliar sua posição específica em casos duvidosos (CORRÊA & ESPÍNOLA, 1964 *apud* PÉREZ *et al.,* 1992). Análises usando isoenzimas foram aplicadas recentemente para a mesma abordagem (DUJARDIN *et al.,* 1988, 1991 *apud* PÉREZ *et al.,* 1992). A citogenética também provou ser uma potencial ferramenta na distinção de espécies (UESHIMA, 1966, 1979; SCHREIBER *et al.,* 1967; DE VAIO *et al.,* 1985; MELLO *et al.* 1986 *apud* PÉREZ *et al.,* 1992).

O estudo citogenético de triatomíneos atrai a atenção de pesquisadores por que estes apresentam características citogenéticas incomuns, como a presença de cromossomos holocêntricos e divisão pós-reducional dos cromossomos sexuais na meiose.

Espécies que possuem cromossomos holocêntricos são, freqüentemente, tratadas como casos citogeneticamente excepcionais. Este tipo de cromossomo está presente em protozoários, algas, em algumas ordens de insetos (Homoptera, Heteroptera e Lepidoptera) e em algumas famílias de plantas (Cyperacea e Juncacea) (GUERRA, 1988). Os cromossomos holocêntricos, no entanto, estão bem representados em insetos (JOHN & LEWIS 1966, PIMPINELLI & GODAY 1989, JOHN 1990 *apud* PÉREZ *et al.,* 1997), incluindo espécies heterópteras (UESHIMA, 1979).

Os cromossomos holocêntricos são aqueles nos quais os microtúbulos do fuso interagem com a maior parte do comprimento da cromátide, isto é, eles



apresentam um centrômero não-localizado (PÉREZ *et al.,* 1997). Como resultado, quando os cromossomos estão migrando para os pólos durante a anáfase ("movimento holocinético"), eles permanecem perpendiculares ao fuso não formando a tradicional figura em V dos cromossomos monocêntricos (GUERRA, 1988). Os cromossomos monocêntricos são aqueles nos quais os microtúbulos do fuso se fixam a um sítio específico do cromossomo. Uma vez que, durante a anáfase, a atividade cinética é restrita a esta região, eles apresentam um movimento "monocinético". Alguns autores denominam, sinonimamente os cromossomos holocêntricos de holocinéticos (LUCEÑO & GUERRA, 1996).

Os cromossomos holocêntricos apresentam algumas características comuns durante a mitose: (1) nenhuma constrição primária é detectada, no entanto estruturas cinetocóricas são observadas; (2) em metáfase, cada cromossomo é orientado com seu eixo longo paralelo à placa equatorial; (3) as fibras do fuso fixam-se em todo o comprimento da cromátide; (4) em anáfase, as cromátides movem-se aos pólos com seus eixos longos paralelos ao fuso da placa equatorial (JOHN, 1990 *apud* PÉREZ *et al.,* 1997).

A segunda característica marcante dos cromossomos das espécies heterópteras basea-se no modo diferente de segregação dos cromossomos sexuais. Na metáfase I, eles são individualizados e não formam um verdadeiro bivalente, já que não estão presentes quiasmas entre eles. Seu eixo longo parece perpendicular à placa equatorial. As cromátides, de cada cromossomo sexual, migram para pólos opostos na anáfase I, mostrando uma segregação equacional. As cromátides sexuais são observadas individualizadas na prometáfase II, entretanto apresentam uma associação "ponta-a-ponta" na metáfase II, com seus eixos longos perpendiculares à placa equatorial. Durante a anáfase II, as cromátides sexuais segregam para os pólos opostos (PÉREZ *et al.,* 1997).

No Brasil, as análises citogenéticas de triatomíneos, começaram quando SCHREIBER & PELLEGRINO (1948) estudaram o cariótipo das espécies *Triatoma infestans, T. sordida, T. maculata, T. vitticeps, T. brasiliensis, T. rubrovaria, T. dimidiata, T. pallidipennis, Panstrongylus megistus, Rhodnius prolixus* e *Psammolestes coreodes*.

Desde então, os estudos citogenéticos desses insetos foram centrados em técnicas de colorações convencionais dos cromossomos (SCHREIBER & PELLEGRINO, 1951; BARTH, 1956a; UESHIMA, 1966; SCHREIBER *et al.,* 1967;

TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1997a). Uma dessas técnicas convencionais é a coloração pela orceína lacto-acética. Esta cora as proteínas totais ligadas ao DNA, tornando possível o estudo da cromatina nos núcleos interfásicos e dos cromossomos durante a divisão celular.

Os resultados obtidos no presente trabalho, através da coloração dos túbulos testiculares pela orceína lacto-acética, mostraram que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos apresentavam regiões heteropicnóticas destacadas sob a forma de corpúsculos ovalados ou irregulares. Únicos, em *R. neglectus* e *R. prolixus*, duplos em *R. robustus* e diversos, de tamanhos e formas variadas, em *R. domesticus, R. neivai* e *R. pallescens.*

Nossos resultados demonstraram, também, que os núcleos interfásicos das células espermatogoniais apresentavam vários corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos, sendo que em *R. domesticus, R. prolixus* e *R. robustus* estes corpúsculos localizavam-se predominantemente na região central dos núcleos.

Uma outra observação do presente trabalho, está relacionada aos núcleos profásicos das células espermatogoniais que, em *R. neivai* e *R. prolixus,* apresentaram corpúsculos heteropicnóticos periféricos e, em *R. domesticus, R. neglectus, R. pallescens* e *R. robustus,* apresentaram corpúsculos heteropicnóticos periféricos e dispersos no interior dos núcleos.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) encontrou variações no número de cromocentros presentes nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma vitticeps, T. pallidipennis, T. infestans* e *T. maculata.* Os núcleos poliplóides em *T. vitticeps* apresentavam um único corpúsculo heteropicnótico ou vários corpúsculos menores sobre um halo claro; *T. pallidipennis* apresentava três ou quatro corpúsculos heteropicnóticos e *T. maculata* apresentava apenas um único corpúsculo heteropicnótico, sendo que foi observado um halo claro ao redor deste e estruturas semelhantes à vesículas em seu interior. O mesmo autor constatou, também, que os núcleos interfásicos das células espermatogoniais de *Triatoma vitticeps, T. infestans* e *T. maculata* apresentavam um único corpúsculo heteropicnótico e *T. pallidipennis* apresentava um ou dois corpúsculos heteropicnóticos.

DE VAIO *et al.* (1985) analisaram a meiose dos triatomíneos *Rhodnius prolixus, Triatoma infestans* e *T. rubrovaria* e, também, encontraram diferenças no

número de corpúsculos heteropicnóticos (cromocentros) dos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares dessas espécies. Observaram que *R. prolixus* apresentava um único cromocentro, compacto, posicionado dentro da cromatina desigualmente distribuída. Em *T. infestans* um número variável de cromocentros ou corpúsculos heteropicnóticos foi observado confirmando, segundo os autores, a presença de regiões heterocromáticas em alguns cromossomos dessa espécie. No caso de *T. rubrovaria,* foi observada cromatina igualmente distribuída e homogênea com dois corpúsculos heteropicnóticos.

TAVARES (1996) estudando cinco espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* verificou que em quatro delas (*T. brasiliensis, T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida*) os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentavam, predominantemente, um único corpúsculo heteropicnótico ovalado ou irregular. A outra espécie estudada, *T. delpontei* apresentava uma variação no número, forma e localização destes corpúsculos heteropicnóticos que, segundo o autor, pode estar associada aos diferentes padrões de heterocromatinização dos núcleos poliplódes desta espécie. O autor observou, ainda, que os núcleos espermatogoniais em intérfase de *Triatoma brasiliensis, T. delpontei* e *T. rubrovaria* apresentavam apenas um único corpúsculo heteropicnótico, sendo que este corpúsculo chamava a atenção em *T. delpontei* devido ao seu tamanho. Acredita-se que os núcleos com múltiplos cromocentros resultaram de núcleos que apresentavam um único cromocentro (MELLO, 1980).

TAVARES (1996) comenta que, de acordo com PANZERA *et al.* (1995b), em *T. delpontei*, este cromocentro é formado pela associação heteróloga das regiões heterocromáticas de todos os bivalentes autossômicos e dos cromossomos sexuais. Já em *T. sordida* e *T. lecticularia* os núcleos espermatogoniais, em intérfase, apresentavam um corpúsculo heterocromático maior e vários pontos pequenos destacados. Foi possível notar, ainda, que estes corpúsculos apresentavam-se com um aspecto vesiculoso, o mesmo acontecendo nos núcleos espermatogoniais em intérfase em *T. brasiliensis.*

TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999) estudando duas espécies do gênero *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreri*), observaram que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentavam somente um corpúsculo heteropicnótico, geralmente central.



Em *Gerris lateralis* e outros Heteroptera, de acordo com WHITE (1973), os núcleos poliplóides originam-se com a não elaboração do fuso e sem a citocinese ou interrupção da membrana nuclear.

Nos núcleos interfásicos das células espermatogoniais de *Panstrongylus* (*P. herreri* e *P. megistus*), TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999) identificaram a presença de corpúsculos heteropicnóticos dispersos no interior dos núcleos e também periféricos a estes.

No presente estudo foi possível observar nas metáfases espermatogoniais de *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. pallescens* e *R. prolixus,* cromossomos com regiões heteropicnóticas. No entanto, em *R. neivai* e *R. robustus* estas regiões cromossômicas heteropicnóticas não foram claramente evidenciadas.

As conexões intercromossomais aparecem na metáfase espermatogonial de algumas, mas não de todas as espécies de Heteroptera, aleatoriamente e são terminais ou laterais (MANNA, 1995).

As metáfases espermatogoniais de *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* apresentavam cromossomos dispostos por toda a placa equatorial e claramente unidos por filamentos cromatínicos. Estas características também foram observadas por outros autores (AZEREDO-OLIVEIRA, 1990; TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1997a; TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) que estudaram espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus.* Segundo a literatura os cromossomos das metáfases espermatogoniais são conectadas por finos "fios" intercromossomais (BANERJEE, 1959; MANNA, 1995).

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) assinala que, na fase espermatogonial, a cromatina começa a concentrar-se em pequenos corpúsculos que se juntam formando vinte corpos maiores. Cada um destes alonga-se e sofre divisão longitudinal por uma fenda que se abre na parte central, dando o aspecto de uma tétrade da diacinese. Esses vinte corpos correspondem aos autossomos em número diplóide. Começa então a ocorrer a individualização dos "cromossomos sexuais" no corpo compacto. Os autossomos continuam a condensação formando os cromossomos metafásicos da placa equatorial.

Uma característica marcante do processo meiótico dos triatomíneos, refere-se a prófase da primeira divisão, que nestes insetos não se apresenta com



as subfases iniciais características, leptóteno, zigóteno e paquíteno, estes estádios são denominados, conjuntamente, de "estádio confuso". A estrutura do núcleo parece ser interfásica, sendo visíveis apenas o nucléolo e os cromossomos sexuais heteropicnóticos. A distinção começa ocorrer à partir do diplóteno e da diacinese.

Muitos gêneros e espécies que têm sido investigados citologicamente mostram uma tendência dos cromossomos sexuais aparecerem juntos no "estádio confuso" e este estado parece persistir na diacinese, mas, no gênero *Rhodnius* e *Dipetalogaster,* nunca ocorre tal tendência, na prófase do espermatócito primário. A natureza dos cromossomos sexuais nestes dois gêneros difere do resto dos gêneros e espécies de triatomíneos e estas diferenças no comportamento podem indicar diferenças filogenéticas (UESHIMA, 1966).

Em um estudo realizado por PÉREZ *et al.* (1992), foi verificado que em *Triatoma pseudomaculata,* os cromossomos sexuais permanecem unidos durante o "estádio confuso" formando um cromocentro heteropicnótico. No entanto, em *T. matogrossensis* os cromossomos sexuais aparecem separados formando dois cromocentros heteropicnóticos durante a primeira prófase meiótica ("estádio confuso"), mas em diacinese os cromossomos sexuais ficam associados e mais condensados do que os bivalentes autossômicos. Os mesmos autores observaram que em *Rhodnius pictipes* durante a primeira prófase meiótica, os cromossomos sexuais são vistos associados ou separados e positivamente heteropicnóticos formando um ou dois conspícuos cromocentros. Em *R. nasutus,* os autores verificaram durante o "estádio confuso" a união dos cromossomos sexuais formando um único cromocentro heteropicnótico, ao passo que em *R. robustus* os cromossomos estavam separados e incluidos em uma região particular do núcleo.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) encontrou em *Triatoma vitticeps, T. pallidipennis, T. infestans* e *T. maculata* esta associação entre os cromossomos sexuais e, algumas vezes, entre sexuais e autossomos como observado em *T. infestans.* TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997a), também, observaram em *Triatoma brasiliensis, T. delpontei, T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida,* que os cromossomos sexuais uniam-se no "estádio confuso" formando um cromocentro, que caracteriza esta fase e que, muitas vezes, podia-se visualizar até mesmo a individualização dos cromossomos que compõem este cromocentro.

TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999) estudando as espécies de triatomíneos *Panstrongylus megistus* e *P. herreri* verificaram que os

cromossomos sexuais permaneciam unidos até a prometáfase, onde se tornariam entidades distintas, confirmando os achados de UESHIMA (1966).

Neste trabalho, verificou-se que, na primeira prófase meiótica, durante o "estádio confuso", os núcleos das espécies *Rhodnius domesticus* e *R. pallescens* apresentaram de um a dois corpúsculos heteropicnóticos, enquanto os núcleos das espécies *R. neglectus, R. prolixus* e *R. robustus* apresentaram de um a três corpúsculos heteropicnóticos.

Pôde ser observado que os núcleos, durante o "estádio confuso", das espécies *Rhodnius neglectus, R. prolixus* e *R. robustus* mostraram, no máximo, três corpúsculos heteropicnóticos. No entanto, todas as espécies estudadas, no presente trabalho, apresentaram mecanismo sexual XY. Desta maneira, pode ser inferida a idéia de que algum cromossomo autossômico esteja próximo aos cromossomos sexuais participando na formação dos cromocentros destes núcleos.

Das seis espécies, estudadas no presente trabalho, de acordo com levantamento bibliográfico, apenas *Rhodnius domesticus* não apresentava seu número cromossômico diplóide descrito na literatura. Mas, assim como *R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* esta espécie, também, apresentou o número cromossômico diplóide igual a 22 (20A+ XY).

Análises comparativas da metáfase I podem indicar que os cromossomos são pequenos no gênero *Rhodnius* em relação aos cromossomos do gênero *Triatoma*. No entanto, comparações intergêneros ou interespecíficas de tamanhos de cromossomos são dificultadas devido aos diferentes estágios de condensação cromossômica. Todavia, é bastante viável usar o tamanho relativo do cromossomo dentro das espécies como um caráter diferencial (PÉREZ *et al.*, 1992).

Os cromossomos autossomos mostram uma pequena variação, segundo SCHREIBER & PELLEGRINO (1950). Variações impressionantes foram relatadas para *Triatoma infestans* e *T. platensis,* que possuem três grandes pares de autossomos (SHREIBER & PELLEGRINO, 1950; UESHIMA, 1966). Observações indicaram que *T. pseudomaculata* tem um par de autossomos significativamente grande em relação ao resto do cariótipo. Em outras espécies, classes cromossômicas de tamanhos distintos não podem ser definidas (PÉREZ *et al.*, 1992).

KOSHY (1979a) através da medida do tamanho relativo dos cromossomos nomeou o cromossomo X da espécie *Rhodnius robustus* como sendo

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

maior que o cromossomo Y. No entanto, PÉREZ *et al.* (1992), estudando esta mesma espécie através do bandamento C, mostrou que o cromossomo Y é C-heterocromático e maior que X, ao passo que as outras espécies estudadas pelo autor, *R. pictipes* e *R. nasutus,* mostraram que o cromossomo X C-heterocromático é maior que Y.

UESHIMA (1966) estudando *Rhodnius prolixus e R. neglectus* verificou que, em ambas as espécies, os autossomos consistiam de três pares grandes, seis pares de tamanho intermediário e um par pequeno, sendo que o X apresentava tamanho similar aos intermediários e o Y era o menor de todos. Há, segundo UESHIMA, uma pequena diferença entre estas duas espécies em relação ao tamanho dos cromossomos. Os grandes pares de autossomos e o X em *R. prolixus* são levemente maiores do que em *R. neglectus.*

BARTH (1956b) apresenta um quadro comparativo dos cromossomos de *Triatoma maculata, T. vitticeps, T. infestans, T. sordida, Panstrongylus megistus, Rhodnius neglectus* e *R. prolixus,* de acordo com o tamanho relativo dos mesmos. Através desse quadro pode-se verificar que o Y é o maior cromossomo do par sexual em todas as espécies citadas.

KOSHY (1979a) estudando também as espécies *Rhodnius prolixus* e *R. neglectus,* através da medida do tamanho relativo dos cromossomos, verificou que o cromossomo X, em *R. prolixus,* era menor do que o de *R. neglectus.* No entanto, os grandes pares de autossomos eram maiores em *R. neglectus.*

No presente trabalho, baseando-se no aspecto visual das placas metafásicas, da primeira e segunda divisões meióticas, como fez UESHIMA (1966), foi observado que a espécie *R. neglectus* apresentava os grandes pares autossômicos maiores, assim como o cromossomo X, em relação à espécie *R. prolixus.* Esta diferença entre os nossos dados e os de UESHIMA (1966) e KOSHY (1979a) pode ser devida à condensação cromatínica que estes cromossomos apresentavam no momento da análise e, conseqüentemente, da fotomicrografia. Resultados mais precisos poderão ser obtidos, futuramente, utilizando-se medidas com análise de imagem a partir da coleta dos fenótipos cromossômicos por sistema de vídeo acoplado a microscópio e microcomputador.

A identificação dos cromossomos sexuais torna-se difícil porque eles são heteropicnóticos e indistinguíveis um do outro, através das colorações convencionais (PÉREZ *et al.,* 1992).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Outro enfoque, embora não diretamente relacionado com o tamanho do cromossomo, pode ser o de comparar o conteúdo de DNA entre espécies. SCHREIBER *et al.* (1972) mostraram de fato que espécies do gênero *Rhodnius* têm um baixo valor de DNA comparado com espécies dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*. É de grande interesse a determinação do conteúdo de DNA em espécies de triatomíneos, para a interpretação de suas relações evolutivas (PÉREZ *et al.,* 1992).

Em triatomíneos, na primeira metáfase meiótica, há dois tipos de comportamento dos cromossomos sexuais. O primeiro deles é caracterizado por um anel formado na periferia da placa metafásica pelos autossomos, sendo que os cromossomos sexuais ficam no centro deste anel, como ocorre em *Triatoma infestans* e *Dipetalogaster maximum*. No outro tipo de comportamento, os cromossomos ficam em uma posição periférica da região equatorial do fuso, como em *T. protracta* e *Rhodnius prolixus* (UESHIMA, 1966).

Segundo UESHIMA (1966), no gênero *Triatoma*, as espécies que possuem cromossomos sexuais múltiplos, estes se localizariam na periferia, enquanto naquelas que possuem o mecanismo XY, estes se apresentariam em uma posição central. Um caso excepcional, no entanto foi encontrado em *T. rubrovaria.* De acordo com o autor, estas diferenças no comportamento dos cromossomos sexuais podem indicar relações filogenéticas.

No entanto, DE VAIO *et al.* (1985) apresentaram a fotomicrografia de uma metáfase I de *T. rubrovaria*, onde pode-se verificar a presença de cromossomos sexuais no centro do anel formado pelos autossomos. Apesar destes autores não discutirem o fato, este serviu de suporte aos achados de TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997a), que também encontraram em *T. rubrovaria* os cromossomos sexuais no centro do anel formado pelos autossomos durante a metáfase I. Portanto, estes autores afirmaram que esta espécie deixaria de constituir uma exceção, quanto à disposição dos cromossomos sexuais na placa metafásica da primeira divisão meiótica, como era considerado até então.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) observou, em relação a orientação dos cromossomos sexuais na metáfase I, que não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais de *Triatoma vitticeps, T. pallidipennis, T. infestans* e *T. maculata*. Os cromossomos sexuais apareciam no centro ou na periferia do anel

formado pelos autossomos, mas, em *T. maculata*, eles apareciam predominantemente na periferia.

No presente trabalho, todas as espécies apresentaram o mecanismo sexual XY e, durante a primeira divisão meiótica os cromossomos sexuais apresentaram os dois tipos de comportamento. Em *R. domesticus*, estes cromossomos estavam na periferia junto ao anel formado pelos autossomos, e em *R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* estavam no centro da placa metafásica e/ou aleatoriamente distribuídos por ela.

Durante a metáfase da segunda divisão meiótica, os cromossomos sexuais mostraram-se sempre no centro do anel formado pelos autossomos, apresentando a mesma configuração típica de outros triatomíneos estudados por BARTH (1956b), UESHIMA (1966), AZEREDO-OLIVEIRA (1990), TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997a) e TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999).

As anáfases meióticas de todas as espécies do gênero *Rhodnius* estudadas neste trabalho, assim como as da espécie *Panstrongylus herreri* (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) e das espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* (*T. brasiliensis, T. delpontei, T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida*) (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1997a) apresentaram cromossomos de migração tardia ou cromossomos retardatários.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) também encontrou o fenômeno da "cromátide retardatária" nas espécies *Triatoma vitticeps e T. maculata,* durante a anáfase e a telófase. No presente trabalho encontramos cromossomos retardatários, também, durante a telófase, apenas na espécie *Rhodnius neglectus*.

"Cromátide retardatária" é um fenômeno freqüente em meiose e funciona como um mecanismo de eliminação cromossômica geneticamente determinado. Em muitos insetos, as células somáticas têm, caracteristicamente, um número cromossômico menor que o das células da linhagem germinativa. Por exemplo, KOSHY (1979c) estabeleceu o cariótipo de 20 A + XY para *Triatoma pallidipennis* estudando tecidos embrionários de machos (XY) e fêmeas (XX), portanto, metáfases mitóticas. Vários outros autores (SCHREIBER & PELLEGRINO, 1950; UESHIMA, 1966; AZEREDO-OLIVEIRA, 1990) estudando metáfases meióticas através do esmagamento dos testículos encontraram o cariótipo 20 A + X_1X_2Y nos machos. Nesse caso, a redução poderia ser devida ao retardo anafásico

que, provavelmente, levou à perda de um dos cromossomos X nas metáfases mitóticas (TAVARES, 1996).

A formação de espermatozóides no epitélio seminífero de mamíferos inclui três fases: multiplicação espermatogonial, meiose e espermiogênese. As células nestas fases são chamadas, respectivamente, de espermatogônias, espermatócitos e espermátides (PARVINEN *et al.,* 1986).

A espermiogênese é uma série de eventos sucessivos durante os quais as células haplóides sofrem transformação nuclear e condensação da cromatina, e desenvolvem estruturas especiais, tal como o acrossomo na porção anterior do núcleo e o flagelo na sua porção posterior (PARVINEN *et al.,* 1986).

As espermátides no início da espermiogênese apresentaram nas espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* regiões cromatínicas condensadas, sendo que estas regiões eram em *R. prolixus* muito pequenas. Na espécie *R. neglectus* foi possível evidenciar a presença de um halo claro ao redor das espermátides iniciais. Estas regiões cromatínicas condensadas permaneceram durante os estádios mais avançados da espermiogênese, onde as células tornam-se progressivamente alongadas. Nos espermatozóides das espécies *R. neivai, R. prolixus* e *R. robustus* pequenos pontos cromatínicos foram observados.

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) encontrou espermátides, no início da espermiogênese, com núcleos condensados e citoplasma abundante em *Triatoma pallidipennis.* Nas espécies *Panstrongylus megistus* e *P. herreri,* estudadas por TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA (1999), foram observados um corpúsculo condensado nas espermátides no início da espermiogênese. Através da análise das fotomicrografias originais das espécies estudadas por TAVARES (1996) pode ser verificado que as espécies *Triatoma brasiliensis, T. delpontei, T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida* apresentavam, nas espermátides no início da espermiogênese, regiões cromatínicas condensadas, que persistiam em estádios mais avançados da espermiogênese. Foi possível verificar, ainda, nesta fase mais adiantada, a presença de um corpúsculo condensado na espermátide da espécie *T. sordida.*

As características gerais da espermatogênese, isto é, cariótipo, comportamento holocinético dos cromossomos, fenótipo dos núcleos poliplóides, filamentos cromatínicos nas metáfases espermatogoniais, "estádio confuso" na

prófase I, disposição dos cromossomos na placa equatorial, cromátide retardatária na anáfase e a espermiogênese, observadas nas espécies do gênero *Rhodnius* estudadas no presente trabalho, corroboram o conhecimento desses aspectos nos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus.*

Essas observações indicam, portanto, que ocorre uma homogeneidade do comportamento morfológico e funcional da espermatogênese na subfamília Triatominae.

4.3. Impregnação por Íons Prata

A impregnação pelos íons prata é um dos métodos mais clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) nas células interfásicas e nos cromossomos metafásicos. As RONs são regiões cromossômicas com as quais os nucléolos se associam e que são responsáveis pela reorganização destes, no final da divisão celular.

Nas Regiões Organizadoras Nucleolares, principais sítios cromossômicos dos cístrons DNA ribossômicos (DNAr 18 S e 28 S) em eucariontes (RITOSSA & SPIEGELMAN 1965, WALLACE & BIRNSTIEL 1969 *apud* MORIELLE & VARELLA-GARCIA, 1988), são intensivamente estudados os fênomenos citológicos, pois servem de modelo para classificar as relações entre estrutura do cromossomo e estrutura do gene, regulação e atividade. Estes fenômenos também têm sido considerados importantes características em cariosistemática e representam significantes ferramentas para poder compreender os modelos de mudanças cromossômicas evolutivas (TAKAI & OJIMA 1982, BIRNSTIEL 1984, GOLD 1984, BICKHAM & ROGERS 1985, VOLLETH 1987 *apud* MORIELLE & VARELLA-GARCIA, 1988).

De acordo com GHOSH (1976 *apud* GALETTI *et al.,* 1985) a quantidade de nucléolos presentes no núcleo interfásico é relacionada ao número de RONs presentes no complemento cromossômico. Esta quantidade pode ser equivalente ao número máximo de RONs ou ser menor quando a inativação de algumas dessas regiões e/ou fusão entre estas ocorre durante a síntese nucleolar.

Variações no padrão de atividade transcricional, expressadas por diferenças no tamanho ou número de nucléolos, podem resultar de uma redução ou

ausência de DNAr, ou talvez de um processo de regulação do gene (RUIZ 1980, SCHMID 1982 *apud* GALETTI *et al.,* 1985).

Segundo GHOSH (1976 *apud* GALETTI *et al.,* 1985) as RONs do DNA são raramente transcritas totalmente. Ao contrário, essas regiões têm excesso de material genético, o qual só é inteiramente transcrito quando necessário. Um exemplo claro disto é observado em *Xenopus*, que possui 500 a 800 cístrons de DNAr repetidos em série por genoma (BIRNSTIEL *et al.* 1966, citado por GHOSH 1976 *apud* GALETTI *et al.,* 1985). Assim, considerando que a atividade nucleolar é relacionada com a atividade celular e que há um número, mais do que suficiente, de cístrons ribossômicos para uma função nucleolar normal, a atividade desses cístrons pode ser regulada.

É bem conhecido que o nucléolo é uma massa relativamente compacta na qual os componentes fibrilar e granular estão interligados. O fibrilar está associado com a cromatina intranucleolar (BUSCH & SMETANA 1970 *apud* ESPONDA *et al.*, 1985). Este é o padrão clássico de um nucléolo de mamífero que pode ser encontrado também em outros grupos tais como Fungi (WESTERGAARD & VON WETTSTEIN 1970 *apud* ESPONDA *et al.*, 1985) e plantas superiores (LAFONTAINE 1974 *apud* ESPONDA *et al.*, 1985; ESPONDA & GIMÉNEZ-MARTÍN, 1975).

Apesar da ausência de estudos comparativos sobre alguns aspectos da morfologia nucleolar, pode-se afirmar que espécies de gafanhoto (Orthoptera) possui um padrão comum com os insetos, ou seja, a espermatogônia pode ser claramente diferenciada dos espermatócitos por sua posição apical nos testículos, assim como, por seu pequeno tamanho e características nucleares. Na espermatogônia o nucléolo é composto de várias massas nucleolares. Usualmente, uma grande massa aparece envolvida por outras de tamanhos menores. Estes nucléolos são comumente compostos de fibrilas firmemente empacotadas de 60-nm (componente nucleolar fibrilar) e um componente escassamente granular (grânulos de 15-nm) (ESPONDA *et al.,* 1985).

Nos espermatócitos primários de gafanhotos o nucléolo mostra uma morfologia similar ao nucléolo da espermatogônia. No entanto, o número de massas nucleolares, bem como a quantidade de componente granular, aparece grandemente aumentado, as fibrilas e grânulos são claramente diferenciados em cada massa nucleolar. Por outro lado, um interessante aspecto desses nucléolos é

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

que as massas nucleolares são dispostas de um modo semelhante a paredes de um labirinto (ESPONDA *et al.*, 1985). Em Orthoptera, este tipo de múltiplos nucléolos tem sido observado freqüentemente (FONZO, 1975; ALLEN & CAVE 1972, FRIEDLANDER *et al.,* 1976 *apud* ESPONDA *et al.*, 1985). No entanto, nucléolos similares têm sido encontrados em Megaloptera (BÜNING 1979 *apud* ESPONDA *et al.*, 1985), Blatoidea (SCHMIDT, 1979 *apud* ESPONDA *et al.,* 1985), Coleoptera (BÜNING 1978, DAILEY & HAPP 1982 *apud* ESPONDA *et al.,* 1985) e Hemiptera (DOLDER & MELLO, 1979; UNNITHAN & NAIR 1977, NORRIS *et al.* 1983 *apud* ESPONDA *et al.,* 1985,).

Para o estudo de RONs em insetos são utilizados predominantemente *Drosophila.* No entanto, há também publicações sobre *Chironomus, Sciara, Rhynchosciara, Acheta* e *Bombyx*. Tais publicações descrevem a existência de vários processos os quais provêm os organismos com níveis de RNAr compatíveis com suas necessidades e que atuam diferentemente em vários organismos, tipos celulares e fases do desenvolvimento (TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA, 1997b).

No estudo realizado por TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997b), com ênfase ao comportamento nucleolar em cinco espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* (*T. brasiliensis, T. delpontei, T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida*), os núcleos poliplóides das células nutritivas dos túbulos testiculares, destas espécies, mostraram vários blocos nucleolares de tamanhos diferentes. No entanto, os núcleos espermatogoniais, em intérfase, mostraram um corpúsculo nucleolar individual em todas as espécies.

TARTAROTTI (1998) identificou também, em duas espécies de triatomíneos do gênero *Panstrongylus* (*P. megistus* e *P. herreri*), que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares, em ambas as espécies, apresentavam um corpúsculo nucleolar com vesículas e halo nucleolar ao redor deste, sendo que em *P. herreri* este halo estava presente também em certas partes da cromatina. Nos núcleos interfásicos das células espermatogoniais destas mesmas espécies, este mesmo autor identificou a presença de corpúsculos nucleolares centrais ou periféricos. Também foram observados corpúsculos nucleolares espalhados no interior dos núcleos em estádios mais iniciais.

No presente trabalho, através do estudo de seis espécies do gênero *Rhodnius* (*R. domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus*) observou-se que em *R. domesticus* e *R. neglectus* os núcleos poliplóides

das células nutritivas dos túbulos testiculares apresentavam um grande bloco nucleolar com vesículas no seu interior. Em *R. neivai* o núcleo poliplóide das células nutritivas dos túbulos testiculares apresentou vários corpúsculos nucleolares sobre uma região clara. O núcleo poliplóide das células nutritivas dos túbulos testiculares da espécie *R. pallescens* apresentou um único corpúsculo nucleolar com vesículas em seu interior. Em *R. prolixus,* o núcleo poliplóide das células nutritivas dos túbulos testiculares apresentou um corpúsculo nucleolar e várias regiões claras na sua proximidade. Em *R. robustus,* o núcleo poliplóide das células nutritivas dos túbulos testiculares mostrou uma região nucleolar impregnada e um ou dois corpúsculos sobre um halo mais claro. Esta região apresentou-se rodeada por regiões mais claras.

Os núcleos espermatogoniais, em intérfase, das espécies *R. domesticus* e *R. pallescens* apresentaram-se com pequenos corpúsculos nucleolares dispersos e nas espécies *R. neglectus, R. neivai, R. prolixus* e *R. robustus* apresentaram-se com vários corpúsculos nucleolares maiores e dispersos.

No trabalho de AZEREDO-OLIVEIRA (1990) foi observado um halo claro, ao redor da heterocromatina, nas células somáticas dos túbulos de Malpighi de *Triatoma vitticeps*, quando coradas com orceína lacto-acética, e essa mesma região foi fortemente marcada pela prata, indicando que esta estrutura era o nucléolo. Esta associação, citologicamente vista, entre nucléolo e heterocromatina, assume maior importância nas células germinativas, pois pode levar à ocorrência de falhas nas disjunções, translocações e heteromorfismos, envolvendo as regiões heterocromáticas e de DNAr e, portanto, atua como fator de evolução do cariótipo ao longo do processo de especiação (revisão em MORIELLE, 1987).

Em células somáticas dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans,* o nucléolo também acha-se intimamente associado ao corpo heterocromático, às vezes, formando um anel em torno dele (MELLO & DOLDER, 1978, 1980; VIDAL & MELLO, 1987).

Outros relatos da literatura têm demonstrado, também, que as técnicas de coloração pela prata revelam outras regiões em adição às RONs, tais como as regiões heterocromáticas e centroméricas (VENDRAME & CELLA, 1993).

No estudo realizado por TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997b), encontrou-se que as metáfases espermatogoniais não apresentavam blocos nucleolares definidos. No entanto, em prófase I, especialmente no "estádio confuso",



um bloco proeminente, com uma estrutura vesicular, foi observado em *T. brasiliensis, T. delpontei, T. lecticularia* e *T. rubrovaria.* Ao passo que, *T. sordida* mostrou um ou dois blocos impregnados pela prata no estágio confuso da prófase I meiótica. Esse trabalho mostra, portanto, uma clara associação entre blocos heterocromáticos de cromossomos sexuais e impregnação pela prata no estádio confuso da prófase I meiótica em triatomíneos.

As metáfases espermatogoniais das seis espécies do gênero *Rhodnius,* estudadas no presente trabalho, apresentaram algumas marcações, umas fracas, outras mais evidentes.

Em núcleos da prófase I meiótica, "estádio confuso" da espécie *P. megistus,* TARTAROTTI (1998) observou a presença de um corpúsculo nucleolar fortemente impregnado pela prata e cromossomos ligados à região nucleolar, sendo que na espécie *P. herreri* ocorreu a presença de vários pontos nucleolares no interior do núcleo e de um corpúsculo nucleolar fortemente impregnado. Em *P. herreri*, não se observou o formato característico do nucléolo, mas os cromossomos sexuais são fortemente impregnados pelos íons prata.

Esse mesmo autor observou, também, que os cromossomos sexuais de *Panstrongylus megistus* e *P. herreri* possuem atividade organizadora nucleolar apresentando-se fortemente impregnados durante os vários estádios da prófase I meiótica. Seus dados reforçaram que, nas espécies analisadas, ocorre fragmentação do nucléolo e, após esta fase, são notados corpúsculos e fragmentos nucleolares que se espalham no interior celular, indicando a ocorrência do fenômeno chamado de "persistência do material nucleolar" durante o ciclo celular. Nas duas espécies de triatomíneos estudadas, foi possível observar o nucléolo até o final da diacinese e, a partir desta fase, confirmar a presença dos corpúsculos ou fragmentos nucleolares, mesmo nos estádios mais avançados da divisão, como anáfase e telófase.

Segundo TARTAROTTI (1998), estes corpúsculos ou fragmentos podem ser restos nucleolares que permanecem durante todo ciclo da célula. Assim, pôde-se inferir a possibilidade do nucléolo não desaparecer totalmente em triatomíneos, permanecendo sob forma de pequenos corpúsculos pré-nucleolares que irão se reunir "de novo" para formar o próximo ciclo nucleolar que, no caso da meiose, só será completado se ocorrer fertilização e formação de um zigoto. Esse

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

pesquisador afirmou que, nestes Heteroptera, ocorre reativação de síntese de RNAr pós-meiótica, provavelmente relacionada à diferenciação celular.

Os núcleos da prófase I meiótica ("estádio confuso") de *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens* e *R. prolixus,* apresentaram, neste trabalho, blocos cromossômicos impregnados pelos íons prata. Em *R. robustus* estes núcleos apresentaram-se, no início da prófase, com apenas uma grande marcação e, num estádio mais avançado, apresentaram de três a quatro corpúsculos impregnados pelos íons prata.

Nos núcleos da prófase I meiótica, em diplóteno-diacinese, das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. prolixus* e *R. robustus* foi possível verificar que os blocos cromossômicos impregnados pelos íons prata sofreram fragmentação, originando dois ou mais corpúsculos nucleolares. Nas espécies *R. domesticus* e *R. prolixus* observou-se, no final de diacinese que os cromossomos sexuais apresentavam uma nítida impregnação pelos íons prata.

Nas metáfases de primeira divisão meiótica das seis espécies estudadas, observou-se corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersamente localizados e pequenas marcações nos autossomos das espécies *R. neglectus* e *R. neivai.* No entanto, não há total certeza que estas pequenas marcações nos autossomos sejam RONs. Nas metáfases da segunda divisão meiótica, dessas mesmas espécies verificou-se também corpúsculos e/ou fragmentos nucleolares nitidamente marcados. Estes achados evidenciam que nestas espécies, assim como nas espécies de triatomíneos do gênero *Panstrongylus* estudadas por TARTAROTTI (1998), ocorre o fenômeno de "persistência do material nucleolar".

AZEREDO-OLIVEIRA (1990) encontrou também, em *T. vitticeps, T.pallidipennis, T. infestans* e *T. maculata*, corpúsculos nucleolares deslocados em relação aos cromossomos principalmente nas placas metafásicas da primeira divisão e, algumas vezes, na anáfase.

O fenômeno denominado "persistência do material nucleolar", isto é, a presença do nucléolo através da divisão celular foi observado nos dinoflagelados e tem sido descrito em células malígnas de mamíferos. Em células embrionárias com carcinoma, o nucléolo está presente e transcricionalmente ativo em toda a mitose. Isto mostra que a mitose por si só não é um insuperável obstáculo para a transcrição de RNAr (WACHTLER & STAHL, 1993).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Foi constatado, ao nível de microscopia eletrônica, que durante a mitose, o nucléolo, geralmente, desaparece no final da prófase e reaparece na telófase. Este processo é acompanhado pela cessação da síntese de RNAr. O desaparecimento não é total, pois o material corado pela prata pode ser observado nas RONs cromossômicas no decorrer da mitose. Na telófase, o componente fibrilar denso reaparece, seguido mais tarde pelo material granular, corroborando a visão de que o componente granular corresponde a um passo mais tardio na biogênese dos ribossomos do que o componente fibrilar. O reaparecimento, relativamente rápido, do nucléolo, após a cariocinese, é muito provável não ser somente devido a síntese *"de novo"* do material nucleolar, mas também, devido a reconstrução do nucléolo a partir do material nucleolar que está disperso no núcleo e citoplasma durante a prófase. O aumento no material corado pela prata, observado após as mitoses, não é abolido por inibição da síntese protéica, indicando deste modo que a reconstrução do nucléolo não depende só do material sintetizado novamente (WACHTLER & STAHL, 1993).

Após a desorganização, o material nucleolar pode comportar-se de duas ou três maneiras. Parte dele dissolve-se na prófase, no nucleocitoplasma comum e retorna à reorganização do nucléolo na telófase; outra parte permanece associada com as RONs durante todo o estágio da mitose; uma terceira parte junta-se a bainha pericromossomal dos cromossomos condensados e move-se de volta para o núcleo com a descondensação dos cromossomos na telófase (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993; GONZÁLEZ-GARCÍA & RUFAS, 1995).

Durante a mitose, a síntese de RNAr é pouco regulada, proteínas que desempenham um papel central na transcrição dos genes DNAr, tais como RNA polimerase I e DNA topoimerase permanecem associadas com a RON cromossomal, a qual também ancora os genes para RNAr. O mecanismo que modula a atividade dos genes RNAr durante a mitose pode prover um interessante caso para analisar o controle da atividade gênica e estrutura. A reorganização pós-mitótica do nucléolo depende da interação de duas entidades separadas, a RON e os corpos pré-nucleolares. Os corpos pré-nucleolares aparecem na telófase e são completamente dispersos no início da reformação dos núcleos filhos quando eles progridem para a fase G1 (SCHEER & WEISENBERGER, 1994).

A desorganização do território nucleolar e a subseqüente dispersão das proteínas nucleolares estão entre os primeiros eventos da mitose. Esta dispersão

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

não é simplesmente devida ao desligamento da transcrição ribossomal, pois o ciclo celular é dependente de modificações das proteínas nucleolares que também têm lugar ao mesmo tempo (HERNÁNDEZ-VERDÚN, 1991).

A persistência de corpos semelhantes a nucléolos durante a mitose dá suporte a idéia que o material nucleolar não se rompe completamente durante a metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro. Pode ser hipotetizado que estes corpos carregam um primeiro ou novo material ou represente uma fonte de RNA nucleolar para as células filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (MELLO, 1995).

Em *Allium sativum* (SATO & KAWAMURA, 1981), foram estudados os "corpúsculos transportadores de RONs" durante o ciclo celular mitótico. Estes corpúsculos sofreram um processo de condensação e descondensação durante o ciclo, isto é, alguns deles eram deformados em configurações alongadas como filamentos, na anáfase; segmentados em pequenos grânulos C positivos dentro do núcleo da telófase até intérfase e novamente organizados em segmentos C positivos completamente condensados, na prófase. Entretanto, um dos "corpúsculos transportadores de RON" não sofreu modificações morfológicas, persistindo no estado condensado durante todo o ciclo mitótico.

A espécie *Acheta domesticus* (Orthoptera) possui dois pares principais de cromossomos com RONs. Nas oogônias e ovócitos desse inseto ocorre amplificação do DNAr localizado nos autossomos 6 e 11. O DNA amplificado forma um corpúsculo que se separa dos cromossomos meióticos e, posteriormente, se distribui em milhares de nucléolos envolvidos na síntese do RNAr. Corpúsculos de DNAr extra-cromossômicos foram, também, encontrados em células de linhagem germinativa de várias espécies de insetos como em *Dytiscidae* e *Chrysopa perla* (Neuroptera) (KATO 1968, GRUZOVA *et al.,* 1972 *apud* CZAKER, 1978) e em oócitos de alguns vertebrados (BROWN & DAWID 1968, GALL 1969 *apud* CZAKER, 1978).

MELLO (1995) encontrou corpos semelhantes a nucléolos associados aos cromossomos ou livres no citoplasma, durante a mitose, em células humanas MCF-10A, concordando, portanto, com outros autores que mostram a persistência do nucléolo durante a mitose em várias células de mamíferos cultivadas *in vitro*.

No presente estudo ainda, durante a metáfase da segunda divisão meiótica, observou-se uma nítida impregnação pelos íons prata dos cromossomos

sexuais das espécies *Rhodnius domesticus* e *R. pallescens.* Em *R. prolixus* e *R. robustus* verificou-se que um dos cromossomos sexuais apresentava-se menos condensado ou corado.

CZAKER (1978) assinala que a redução na coloração ou impregnação pela prata das RONs pode refletir uma variável atividade do material RON (nucleolar).

No trabalho de TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997b), foi verificado que a primeira metáfase meiótica revelou impregnação em alguns cromossomos de *T. brasiliensis* e *T. sordida*. Entretanto, na segunda metáfase meiótica nenhuma indicação de impregnação cromossômica pôde ser detectada em qualquer das espécies.

O estudo dos cromossomos metafásicos dos triatomíneos através da impregnação por íons prata foi dificultado porque os cromossomos apresentam tamanho pequeno e alto grau de compactação. Esses aspectos podem dificultar o acesso do corante aos componentes cromossômicos específicos.

Para obtenção de uma melhor localização das RONs, pode-se também empregar a técnica de hibridização *in situ* de sequências de nucleotídios. Esta vem sendo usada em estudos evolutivos de espécies de dípteros fornecendo importantes informações, incluindo conservação de genes em grupos de espécies próximas (WHITING & JEFFREY, 1987; WHITING *et al.,* 1989; SCHMIDT *et al.,* 1988). Pretende-se, futuramente, utilizar esta técnica nas espécies de triatomíneos estudadas neste trabalho e em outras, dos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus,* nas quais a impregnação por íons prata já foi evidenciada, para uma possível confirmação das localizações das RONs.

Nas anáfases meióticas das duas espécies estudadas por TARTAROTTI (1998), *Panstrongylus herreri* e *P. megistus,* ocorreu a presença de corpúsculos e fragmentos nucleolares em cada pólo da célula em divisão. Nas espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* as anáfases meióticas também apresentaram fragmentos e/ou corpúsculos nucleolares dispersos, ao passo que na espécie *R. domesticus,* observou-se corpúsculos impregnados pelos íons prata, durante a telófase II, em cada pólo da célula.

Além da presença destes fragmentos e/ou corpúsculos nucleolares, as anáfases meióticas da espécie *R. neivai* apresentaram pontes anáfasicas, que

podem aparecer espontâneamente, ou como uma conseqüência da irradiação ou tratamento químico, nos tecidos somáticos ou da linhagem germinativa. Essas pontes são especialmente interessantes porque possuem um significado evolutivo e sua origem pode ser diversa. Algumas vezes, aparecem como conseqüência de um *crossing-over* na alça de uma inversão paracêntrica. Outras vezes, resultam de um *crossing-over* invertido ou quebra cromossômica com união das cromátides irmãs ou por algum tipo de troca entre metades de cromátides (MESA & MESA, 1967).

As espermátides, no início de espermiogênese, apresentaram-se, em *Rhodnius neglectus* e *R. pallescens* com uma única marcação nucleolar, em *R. neivai* e *R. prolixus* com duas marcações nucleolares e em *R. domesticus* e *R. robustus,* com até três marcações nucleolares impregnadas pelos íons prata.

Fenômeno semelhante foi observado por TAVARES & AZEREDO-OLIVEIRA (1997b) em triatomíneos do gênero *Triatoma*. Nesses insetos, as espermátides, no início da espermiogênese, mostraram um grande bloco e outros menores dispersos no núcleo de *T. brasiliensis* e *T. rubrovaria*. A espécie *T. sordida* mostrou um ou dois blocos neste estágio, enquanto que *T. leticularia* e *T. delpontei* um, dois, três ou mais pequenos blocos puderam ser observados. No final da espermiogênese somente um único bloco foi visto nas espermátides de *T. brasiliensis, T. delpontei* e *T. sordida*.

As espermátides dos triatomíneos, *P. megistus* e *P. herreri,* mostraram um corpúsculo nucleolar, na periferia nuclear, e o subseqüente desaparecimento deste corpúsculo após diferenciação (TARTAROTTI, 1998).

Em estádios mais avançados da espermiogênese as seis espécies estudadas, no presente trabalho, apresentaram uma única marcação nucleolar.

Segundo TAVARES (1996) estas marcações, nas espermátides de triatomíneos são bastante semelhantes às encontradas em outros vertebrados, nas quais as RONs são detectadas durante toda a prófase meiótica, até o paquíteno, estando completamente ausentes nas metáfases I e II e reaparecendo nos núcleos das espermátides, quando a célula retorna momentaneamente a síntese proteica.

Durante o processo da espermiogênese, em vertebrados, as células de espermas maduros férteis progridem até certo ponto de maneira simples formando espermátides. Em mamíferos, o sistema de diferenciação celular representa a única fase do ciclo de vida na qual a questão da expressão dos genes haplóides pode ser investigada.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

HOFGÄRTNER *et al.* (1979) estudaram a espermatogênese de quatro espécies de mamíferos (*Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus* e *Cavia cobaya*), através da impregnação por íons prata, e encontraram que estas espécies mostravam um padrão muito similar de atividade das RONs durante os vários estágios da espermatogênese. Precipitados de prata foram detectados nas espermatogônias em crescimento e até o estágio de paquíteno da prófase meiótica. Foi observado que durante as metáfases meióticas I e II e durante a intercinese a coloração pela prata desaparece completamente. O ressurgimento da impregnação pela prata ocorre nas espermátides iniciais de forma arredondada indicando uma reativação pós-meiótica de RONs. Este processo não persiste além da fase de elongação.

Variações ultraestruturais e funcionais do nucléolo também foram observadas em espermátides, durante a espermiogênese do camundongo. As RONs reassumem sua atividade nessas células, logo após as duas divisões meióticas, durante a fase de diferenciação da espermátide e o nucléolo apresenta então uma estrutura específica contendo os componentes fibrilares de um nucléolo ativo. Esta atividade cai durante a fase de capuz, durante a qual o nucléolo sofre um processo de segregação de seus componentes. Nenhuma estrutura nucleolar é visível durante as fases acrossômica e de maturação da diferenciação da espermátide (MIRRE & KNIBIEHLER, 1985).

Os resultados obtidos, neste trabalho, com as espécies do gênero *Rhodnius* coincidiram com as características de "persistência do material nucleolar" e da "cromátide retardatária" encontradas nos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus*. Corroboram também com os achados, em vertebrados, sobre a atividade nucleolar e transcrição do RNAr, durante as fases da meiose. Portanto, pode-se sugerir que estas características sejam comuns também à maioria dos Heteroptera.

Em todas as espécies analisadas observou-se nos núcleos, em várias fases, associação entre nucléolo e regiões fortemente coradas pela orceína lacto-acética. Estas regiões, pelas características de coloração, podem ser consideradas como heterocromáticas. Muitas vezes, observa-se o nucléolo circundando a massa heteropicnótica, evidenciando a íntima relação funcional entre essas estruturas e reforçando, para estes organismos, a indicação de que as RONs estão localizadas nos cromossomos sexuais das espécies *Rhodnius domesticus, R. pallescens* e *R.*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

prolixus e no(s) autossomo(s) das espécies *R. neglectus* e *R. neivai* que são heterocromáticos.

As espécies analisadas, neste estudo, apresentaram algumas características, que permitiram sugerir a presença de variabilidades interespecíficas. Podem ser citados, como exemplos: a) presença de pontes cromatínicas anafásicas, visualizadas somente nas anáfases da espécie *Rhodnius neivai*, b) variação no número de marcações nucleolares nos núcleos da prófase I, por íons prata, c) impregnação dos cromossomos sexuais durante a diacinese, nas espécies *R. domesticus* e *R. prolixus* e, durante a metáfase, da segunda divisão meiótica, nas espécies *R. domesticus* e *R. pallescens.*

Todos estes aspectos podem representar, de maneira geral, aspectos intrínsecos que talvez interferiram em características adaptativas evolutivas desses insetos. Estas características podem refletir em aspectos fenotípicos e hábitos, como a presença de espécies do gênero *Rhodnius* em ambientes domiciliares (*R. neglectus, R. neivai, R. pallescens* e *R. prolixus*) ou estritamente silvestres (*R. domesticus* e *R. robustus*).

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O estudo citogenético das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus,* realizado no presente trabalho, através das técnicas citogenéticas de coloração com orceína lacto-acética e impregnação por íons prata, permitiram chegar às seguintes conclusões:

A. *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* apresentaram cariótipo 2n= 20 A + XY, o que está de acordo com o número modal sugerido para a família Triatominae.

B. Os cromossomos de *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* não apresentam constrições primárias, sugerindo serem holocinéticos, pois seus cromossomos possuem cinetócoros difusos, isto é, distribuídos ao longo do cromossomo e não localizado na região do centrômero. Corroborando, portanto, a hipótese de cromossomos holocêntricos em Heteroptera.

C. Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares, relacionados à nutrição dos espermatócitos, apresentaram regiões heteropicnóticas destacadas sob a forma de corpúsculos ovalados ou irregulares únicos, em *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus,* duplos em *R. robustus* e de diversos tamanhos e formas variadas em *R. domesticus, R. neivai* e *R. pallescens.* A variabilidade das regiões condensadas da cromatina, provavelmente heterocromáticas, relaciona-se às diferenças da atividade transcricional existentes entre essas espécies.

D. As metáfases espermatogoniais das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* apresentaram cromossomos dispostos por toda a placa equatorial e claramente unidos por filamentos cromatínicos que, segundo dados da literatura, representam "finos fios intercromossomais".

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

E. Na primeira prófase meiótica, durante o "estádio confuso", a variação do número de corpúsculos heteropicnóticos (um a três) sugere a participação de algum cromossomo autossomo, juntamente com os sexuais, na formação dos cromocentros dos espermatócitos. Estes mesmos corpúsculos foram também impregnados pelos íons prata e essa associação entre regiões tidas como heterocromáticas e nucleolares evidencia a íntima relação entre essas estruturas.

F. Nos núcleos em diplóteno-diacinese das espécies estudadas verificou-se que os blocos cromossômicos impregnados por íons prata fragmentaram-se, originando dois ou mais corpúsculos nucleolares. Nas metáfases da primeira e segunda divisão meiótica, verificou-se a presença desses corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersamente localizados na placa metafásica, permanecendo durante a anáfase e, algumas vezes, até a telófase. Estes achados evidenciam a ocorrência do fenômeno de "persistência do material nucleolar".

G. Os cromossomos sexuais apresentaram-se com duas disposições na placa equatorial da primeira divisão meiótica: na periferia junto ao anel formado pelos autossomos (*Rhodnius domesticus*); no centro da placa metafásica e/ou aleatoriamente distribuídos por ela, (*R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus*). Na metáfase da segunda divisão meiótica os cromossomos sexuais apresentaram-se sempre no centro do anel formado pelos autossomos, em todas as espécies analisadas. Este comportamento da distribuição dos cromossomos sexuais, preferencialmente, no centro da placa metafásica está de acordo com o número de cromossomos sexuais (XY) desses triatomíneos.

H. A impregnação pelos íons prata foi nítida nos cromossomos sexuais das espécies *Rhodnius domesticus, R. pallescens* e *R. prolixus,* sugerindo serem esses cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs). Nas espécies (*Rhodnius neglectus* e *R. robustus*) há evidências da participação de cromossomos autossomos na organização do nucléolo. A variabilidade da impregnação dos íons prata nos cromossomos sexuais reflete as alterações da atividade transcricional das RONs.

unesp

I. As anáfases meióticas de todas as espécies do gênero *Rhodnius* estudadas neste trabalho apresentaram cromossomos com migração tardia, observados também na telófase (*Rhodnius neglectus*) e em forma de pontes cromatínicas anafásicas (*R. neivai*). Sugere-se que estes cromossomos retardatários sejam sexuais, pois este fenômeno foi verificado anteriormente em algumas espécies vegetais e animais e esta característica é considerada como freqüente nesses cromossomos.

J. Nas espermátides em início da espermiogênese foram observados pequenos pontos cromatínicos condensados e até três nítidas marcações nucleolares com íons prata. Em estádios mais avançados da espermiogênese as seis espécies estudadas do gênero *Rhodnius* apresentaram nas espermátides uma única marcação nucleolar impregnada por íons prata. A presença dessas marcações nesses triatomíneos relaciona-se com a retomada da síntese protéica e, conseqüentemente, da reativação de síntese de RNAr pós-meiótica, necessária para a manutenção do fenômeno de diferenciação celular que ocorre nesta fase.

K. A variabilidade das características interespecíficas, tais como presença de pontes cromatínicas anafásicas, variação no número de marcações nucleolares nos núcleos da prófase I, impregnação dos cromossomos sexuais durante a diacinese e metáfase II, podem representar aspectos intrínsecos que tenham interferido na adaptação evolutiva, refletindo no fenótipo e nos hábitos domiciliares ou silvestres desses triatomíneos.

unesp

6. RESUMO

6. RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo entre seis espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (*R. domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus*), através da análise das diversas fases da espermatogênese, acompanhamento do ciclo nucleolar, localização das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), a fim de verificar a ocorrência de variabilidade interespecífica e ampliar o entendimento da evolução cromossômica entre estas espécies.

As preparações citológicas dos túbulos testiculares foram obtidas pelo método convencional de esmagamento celular e posterior aplicação das técnicas citogenéticas de coloração com orceína lacto-acética e impregnação por íons prata.

Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus e *R. robustus* apresentaram o cariótipo 2n= 20 A + XY, concordando com o número modal sugerido para a subfamília Triatominae. As seis espécies não apresentaram constrições primárias nos cromossomos caracterizando-se, portanto, como holocêntricos.

Em triatomíneos, durante a primeira divisão meiótica, os cromossomos sexuais apresentam-se dispostos de duas maneiras na placa equatorial. A primeira é caracterizada por um anel formado na periferia da placa metafásica pelos autossomos, sendo que os cromossomos sexuais ficam no centro deste anel. Na outra forma de disposição, os cromossomos ficam em uma posição periférica da região equatorial do fuso. No presente estudo, verifica-se as duas formas de disposição dos cromossomos sexuais. Nas metáfases II, os cromossomos sexuais encontram-se sempre no centro do anel de autossomos, reforçando assim o comportamento pós-reducional destes cromossomos.

A impregnação por íons prata foi nítida nos cromossomos sexuais das espécies *Rhodnius domesticus, R. pallescens* e *R. prolixus,* sugerindo, portanto, serem esses cromossomos portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares. Nas outras espécies (*R.neglectus* e *R. robustus*) há evidências da participação de cromossomos autossomos na organização dos nucléolos.

O fenômeno da "cromátide retardatária" é freqüente em meiose e funciona como um mecanismo de eliminação cromossômica geneticamente determinado. Este fenômeno ocorre na anáfase de todas as espécies do gênero



Rhodnius estudadas neste trabalho. Pontes cromatínicas anafásicas também estão presentes na espécie *R. neivai.* Estas pontes podem aparecer espontaneamente ou como uma conseqüência da irradiação ou tratamento químico, nos tecidos somáticos ou da linhagem germinativa. As pontes cromatínicas anafásicas são interessantes pois possuem um significado evolutivo e sua origem pode ser diversa.

Nas metáfases da primeira divisão meiótica, impregnadas por íons prata, das espécies *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* e *R. robustus* foi possível observar corpúsculos e fragmentos nucleolares dispersamente localizados. Na metáfase da segunda divisão meiótica estes fragmentos foram evidenciados somente nas espécies *R. neglectus, R. neivai, R. pallescens* e *R. prolixus.* Os fragmentos e/ou corpúsculos persistem durante a anáfase em todas as espécies e na telófase II da espécie *R. domesticus.*

Estes achados evidenciam a ocorrência do fenômeno de "persistência do material nucleolar", que seria devido a fragmentação do nucléolo durante a prófase I meiótica. Assim pode-se inferir a possibilidade do nucléolo não desaparecer totalmente em triatomíneos, permanecendo sob a forma de pequenos corpúsculos pré-nucleolares que irão se reunir *"de novo"* para formar o próximo ciclo nucleolar que, no caso da meiose, só será completado se ocorrer fertilização e formação de um zigoto. Nestes Heteroptera, portanto, ocorre a reativação da síntese de RNAr pós-meiótica, provavelmente relacionada à diferenciação celular.

unesp

7. ABSTRACT

7. ABSTRACT

The objective of this work was a comparative study on six species of triatomines which belong to the genus *Rhodnius* (*R. domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* and *R. robustus*), through the analysis of the different phases of spermatogenesis, the acompaniament of the nuclear cycle, the localization of nuclear organizing regions (NORs), with the aim of verifying the occurrence of interespecific variation and to increase the understanding of chromosome evolution in these species.

The cytological preparations of the testicular tubes were obtained by the conventional method of cell smears and posterior aplication the techniques of cytogenetic staining with lacto-acetic orcein and impregnation with silver ions.

Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus and *R. robustus* present the karyotype 2n= 20 A + XY, which agrees with the modal number suggested for the subfamily Triatominae. These six species do not show primary constrictions on the chromosomes, which characterizes them, therefore, as being holocentric.

In triatomines, during first meiotic division, the sex chromosomes present themselves arranged in two ways on the equatorial plate. The first is characterized by a ring formed on the perifery of the metaphase plate by the autosomes in the center of the ring. In the other arrangement, the chromosomes assume a periferal position on the spindle. In the present study both forms of arrangement of the sex chromosomes were verified. In metaphase II, the sex chromosomes are always found in the center of the ring of autosomes, which reinforces the post-reductional behavior of these chromosomes.

Silver impregnation was clear in the sex chromosomes of *Rhodnius domesticus, R. pallescens* and *R. prolixus* which therefore suggests them to be the carriers of the nuclear organizing regions. In the other species (*R. neglectus* and *R. robustus*) there are evidences for the participation of autosomes in the organization of the nucleolus.

The phenomenon of chromatid lagging is frequent in meiosis and functions as a genetically controlled mechanism of chromosome elimination. This phenomenon occurs at anaphase of all species of *Rhodnius* included in this study. Anaphase chromatin bridges are also present in *R. neivai.*These bridges can occur



spontaneously or as consequence of irradiation or chemical treatment, in somatic tissue or in germinative lines. The anaphase chromatin bridges are of interest since they have evolutionary significance and can have several origins.

At methafase of first meiotic division silver impregnation in the species *Rhodnius domesticus, R. neglectus, R. neivai, R. pallescens, R. prolixus* and *R. robustus* permitted the observation of locally dispersed nuclear bodies and fragments. At metaphase of second meiotic division these fragments were observed only in the species *R. neglectus, R. neivai, R. pallescens* and *R. prolixus.* The fragments and/or corpuscles persisted during anaphase in all the species and at telophase II of the species *R. domesticus.*

These discoveries reveal the occurrence of the phenomenon of persistence of nuclear material, which would be the result of the fragmentation of the nucleus during first meiotic prophase. Thus, it can be inferred that the nucleus possibly does not disappear entirely in triatomines, but remains in the form of small pre-nuclear corpuscles which will unite "*de novo*" to form the next nuclear cycle which, in the case of meiosis, will only be completed if fertilization occurs and a zygote is formed. In these Heteroptera, therefore, the reactivation of synthesis of rRNA is post-meiotic, probably related to cell differentiation.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. *Estudo citoenzimológico em túbulos de Malpighi de* Triatoma infestans *Klug*. Campinas, 1982. 175p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNICAMP.

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.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Zool. Ib. Anat.,* v.113, p.493-6, 1985.

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. 223-9, 1986a.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Detecção da atividade fosfatásica alcalina em túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans* Klug. *Ciência e Cultura,* v.38, n.11, p.1870-1974, 1986b.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Acid phosphatase activity in mapighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios,* v.92, p.23-8, 1997.

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

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Peroxidase activity in malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios,* v.93, p.83-92, 1998b.

BALCZON, R. D., BRINKLEY, B. R. The kinetochore and its roles during cell division. In:___ *Chromosomes*: *Eukaryotic, Prokaryotic and Viral.* Ed. Flórida, Boca Raton: CRC Press, 1990. Cap.6, p. 167-89.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), V parte: anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans. Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.54, n.1, p.135-84, 1956a.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), VI parte: estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.54, n.3, p.599-616, 1956b.

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

BICUDO, H. E. M. de C. *Organizadores de nucléolos em insetos.* Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos eucariotos. *Ciência e Cultura,* v.37, n.3, p.440-56, 1985.

BRAGA, M. V., MEIRELLES, M. N., BRAZIL, R. P. Massive experimental inoculation of *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae) and *Mus musculus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.93, n.4, p.555-7, 1998.

CABELLO, D. R., LIZANO, E., VALDERRAMA, A. Estadisticas vitales de *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones experimentales. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.82, n.4, p.511-24, 1987.

COLLI, W., ALVES, M. J. M. *Chagas.* Um repensar de abordagens experimentais. Médicos. p.74-7, set./out. 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

CZAKER, R. Silver staining in trans criptionally active NORs of meiotic and mitotic cells in *Acheta domesticus* (L.) (Orthoptera). *Chromosoma (Berl.),* v.68, p.187-93, 1978.

DE VAIO, E. S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A. M. *et al.* Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica,* v. 67, p. 185-91, 1985.

DOLDER, H., MELLO, M. L. S. Dados preliminares sobre partículas semelhantes a vírus em células de triatomíneos. *Rev. Saúde Publ.,* v.12, p.104-9, 1978a.

DOLDER, H., MELLO, M. L. S. Virus-like particle in the malpighian tubes of blood-sucking hemipterans. *Cell Mol. Biol.,* v.23, p.299-310, 1978b.

DOLDER, H., MELLO, M. L. S. Vesicular inclusions in the nuclei of epithelial cells of malpighian tubes of the hemipteran *Panstrongylus megistus. Experientia,* v.34, p.794-5, 1978c.

DOLDER, H., MELLO, M. L. S. Ultraestructura of the malpighian tubule cells of *Panstrongylus megistus* Burmeister. *J. Submicr. Cytol.,* v.11, n.3, p.385-94, 1979.

ELLIS, D. S., EVANS, D. A., STAMFORD, S. The penetration of salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli. Z. Parasitenkd,* v.62, p.63-74, 1980.

ESPONDA, P., GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Nucleolar organizer ultrastructure in *Allium cepa. Chromosoma,* v.52, p.73-87, 1975.

ESPONDA, P., RUFAS, J. S., FONZO, S. Ultraestructura and the relationships between the nucleolus and the nucleolar organizer region in Orthoptera male germ cells. *Can. J. Genet. Cytol.,* v.27, p.186-91, 1985.

FERNANDES, C. D., MURTA, S. M. F., CERÁVOLO, I. P. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines

and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.92, n.3, p.343-51, 1997.

FONZO, S. Nucleolar evolution in spermatids of *Oedipoda coerulescens C* (Orthoptera: Acrididae). *Caryologia,* v.28, p.125-31, 1975.

GALETTI JÚNIOR, P. M., SILVA, E. B., CERMINARO, R. T.. A multiple NOR system in the fish *Serrasalmus spilopleura* (Serrasalminae, Characidae). *Rev. Brasil. Genet.,* v.8, n.3, p.479-84, 1985.

GAZIN, P., MELO, G., ALBUQUERQUE, A. *et al. Atualidade da doença de Chagas numa área rural do Nordeste do Brasil.* França-Flash, n.20, p.1-2,4, jul./ago./set. 1999.

GONÇALVES, T. C. M., LENT, H., ALMEIDA, J. R. Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.82, n.4, p.543-50, 1987.

GONZÁLEZ GARCÍA, J. M., RUFAS, J. S. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens. Chromosoma,* v.104, p.287-97, 1995.

GUARNIERI, A. A., PINTO, C. J. C, SCHOFIELD, C. J. *et al.* Population biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.93, n.2, p. 273-6, 1998.

GUERRA, M. S. Cromossomos metafásicos e o ciclo mitótico. In:___ *Introdução à citogenética geral.* Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.1-12.

HERNÁNDEZ-VERDÚN, D. The nucleolus today. *Journal of Cell Science,* v.99, p.465-71, 1991.

HOFGÄRTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, W. *et al.* Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma (Berl.)* v.71, p.197-216, 1979.

Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA

HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia,* v.36, p.104-5, 1980.

HUGHES-SCHRADER, S., SCHRADER, F. The Kinetochore of the hemiptera. *Chromosoma (Berl.)*, v.12, p.327-50, 1961.

KOSHY, T. K. Chromosomes of Triatominae I: Haploid karyotypes of three species in genus *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Cient. Venezolana,* v.30, p.183-90, 1979a.

KOSHY, T. K. Chromosomes of Triatominae II: Karyotypes studies of five species in the genus *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Cient. Venezolana,* v.30, p.191-5, 1979b.

KOSHY, T. K. Chromosomes of Triatominae III: Karyotypes studies of *Triatoma pallidipennis* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Cient. Venezolana,* v.30, p.196-8, 1972c.

LENT, H., WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of 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.605-14, 1993.

LENT, H., JURBERG, J., GALVÃO, C. *et al. Triatoma melanosoma,* novo status para *Triatoma infestans melanosoma.* Matínez, Olmeda & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,* v.89, p.353-8, 1994.

LENT, H., JURBERG, J., GALVÃO, C. *et al. Belminus laportei* sp. n. da região Amazônica (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.90, p. 33-9, 1995.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

LUCEÑO, M., GUERRA, M. Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia,* v.49, n.3-4, p.301-9, 1996.

MANNA, G. K. Chromosomes in evolution in Heteroptera. In:___ *Chromosomes in evolution in eukaryotic groups*. Ed. Flórida: Boca Raton, 1995. Cap.8, p. 189-225.

MARTÍNEZ, A., CARCAVALLO, R. U., JURBERG, J. *Triatoma gomeznunezia* new species of Triatomini from Mexico (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores 1,* p.15-9, 1994.

MELLO, M. L. S. Nuclear behavious in the malpighian tubes of *Triatoma infestans* (Reduv., Hemiptera). *Cytologia,* v.36, n.1, p.42-9, 1971.

MELLO, M. L. S. Dados citoquímicos sobre as histonas de heterocromatinas e eucromatinas do *Triatoma infestans* Klug. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.,* v.10, n.5, p. 305-9, 1977.

MELLO, M. L. S. Mechanism of poliploidization in the malpighian tubes of blood-sucking reduviid hemipterans. *Rev. Brasil. Genet.,* v.1, n.2, p.97-102, 1978a.

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

MELLO, M. L. S. A eficácia de um método citofotométrico de múltiplos "plugs" na caracterização de valores Feulgen-DNA *in situ. Rev. Brasil. Biol.,* v.38, n.3, p. 625-31, 1978c.

MELLO, M. L. S. Computer assessment of chromatin patterns on some germ line cells of the hemipteran *Triatoma infestans* Klug. *Acta histochem,* Bd, v.62, p.254-62, 1978d.

MELLO, M. L. S. Patterns of lability towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cell Mol. Biol.,* v.24, p.1-16, 1979.

MELLO, M. L. S. Toluidine blue binding capacity of heterocromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. *Histochemistry,* v.69, p.181-7, 1980.

MELLO, M. L. S. Cytochemical properties of euchromatin and heterocromatin. *Histochem. J.,* v.15, p. 739-51, 1983.

MELLO, M. L. S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem.,* v.28, n.2, p. 149-54, 1995.

MELLO, M. L. S., DOLDER, H. Fine structure of the malpighian tubes in the blood-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. *Protoplasma,* v. 93, p. 275-88, 1977.

MELLO, M. L. S., DOLDER, H. Localization of nucleolus in the epithelial cells of the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug. In: COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, VI, 1978, São Paulo. *Anais do Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica* (São Paulo), s. n. 1978. P.62-3.

MELLO, M. L. S., DOLDER, H. Aspectos ultra-estruturais de tubos de Malpighi de ninfas jovens de *Triatoma infestans* Klug. *Ciência e Cultura,* v.32, n.7, p.903-7, 1980.

MELLO, M. L. S., RAYMUNDO, H. H. Change with age of Feulgen DNA values in the blood-sucking insect, *Triatoma infestans* Klug. *Hystochemistry,* v.54, p.219-23, 1979.

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.175-84, 1987.

MELLO, M. L. S., VIANA, A. M. Investigação citoquímica de proteínas estruturais, glicosaminoglicanas neutras e ácidas, RNA e cálcio nos tubos de malpighi de *Panstrongylus megistus* (Burmeister). *Rev. Brasil. Biol.,* v.37, n.4, p. 713-6, 1977a.

MELLO, M. L. S., VIANA, A. M. Some cytochemical characteristics of the Malpighian tube cells in the blood-sucking bug, *Triatoma infestans* Klug. *Cell Mol. Biol.,* v.22, p.367-72, 1977b.

MELLO, M. L. S., PETRI, M. C., ZANARDI, V. A. The connective tissue layer of Malpighian tubes of some blood-sucking bugs: Basophilia and histophysical aspects. *Studia Ent.,* v.16, n.1-4, p.511-22, 1973.

MESA, A., MESA, R. S. Complex Sex-determining mechanisms in three species of South American grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea). *Chromosoma* (Berl), v.21, p.163-80, 1967.

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

MORIELLE, E. *Variabilidade na localização e na atividade das regiões organizadoras de nucléolos em morcegos da família Phyllostoidae (Mammalia, Chiroptera).* São José do Rio Preto, 1987. 153p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

MORIELLE, E., VARELLA-GARCIA, M. Variability of nucleolus organizer regions in Phyllostomid bats. *Rev. Brasil. Genet.,* v.11, n.4, p.853-71, 1988.

PANZERA, F., ALVAREZ, F., SANCHES-RUFAS, J. *et al.* C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Genome,* v.35, p.1068-74, 1992.

PANZERA, F., PÉREZ, R., HORNOS, S. *et al. Aportes de la citogenetica al control de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas*, Projeto de Pesquisa-Justificativa, p.1-2, [1995a?].

PANZERA, 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. 515-8, 1996.

PANZERA, F., PÉREZ, R., PANZERA, Y. *et al.* Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Research,* v.3, p. 143-50, 1995b.

PARVINEN, M., VIHKO, K. K., TOPPARI, J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. *International Review of Cytologi. A survey of Cell Biology,* v.104, p.115-51, 1986.

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

PÉREZ, R., PANZERA, Y., SCAFIEZZO, S. *et al.* Cytogenetics as a tool triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.87, n.3, 1992.

PESSÔA, S. B., MARTINS, A. V. Gênero *Trypanosoma,* doença de Chagas; *Trypanosoma rangeli* - Tripanossomose rangeli. In:___ *Parasitologia Médica:* Segunda parte protozoologia; Quarta parte entomologia. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. Cap.12 -15, p. 125-82; cap.64, p.661-89.

SATO, S., KAWAMURA, S. Cytological studies on the nucleolus and the NOR-carrying segments of *Allium sativum. Cytologia,* v.46, p.781-90, 1981.

SCHERR, U., WEISENBERGER, D. The nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology,* v.6, p.354-9, 1994.

SCHMIDT, E. R. KEYL, H. G., HANKELN, T. *In situ* localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus. Chromosoma,* v.96, p.353-9, 1988.

SCHRADER, F. The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. *Evolution,* p.134-42, 1947.

SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Cytogenetical studies on brazilian Hemiptera. In: VIIIth International Congress of Genetics-Stockolm, 1948, Stockolm. *Hereditas,* 1949, p.656.

SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi coma possilbile mecanismo di speciazione. *Scientia Genetica,* v.3, p.215-26, 1950.

SCHREIBER, G., PELLEGRINO, J. Análise citológica e cariométrica de ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.45, p.513-42, 1951.

SCHREIBER, G., BOGLIOLO, A. R., PINHO, A. C. Cytogenetics of triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Rev. Brasil. Biol.,* v.32, n.2, p.255-63, 1972.

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 hibridização interespecífica ou por efeito de radiação em Triatominae. *Ciência e Cultura,* v.10, p.1140-1, 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.139-45, 1977.

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

SILVA, F. P., SCHREIBER, G. Morphology of spermatogenetic tubes as taxonomic character in Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). *Rev. Brasil. Biol.,* v.9, n.1, p.97-102, 1969.

TARTAROTTI, E. *Estudo citogenético em triatomíneos do gênero* Panstrongylus *(Triatominae, Heteroptera).* São José do Rio Preto, 1998. 189 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis patterns of holocentric chromosomes in triatomines genus *Panstrongylus. Cytologia,* v.64, p.235-40, 1999.

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

TAVARES, M. G., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Aspectos biológicos e médico sanitário dos triatomíneos. Artigo de revisão. *HB Científica,* v.3, n.2, p. 137-44, 1996.

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

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

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

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

VENDRAME, M. R., CELLA, D. M.. C-bands and nucleolar organizer regions (NORs) in *Peruvia nigromarginata* (Orthoptera, Acrididae, Gomphocerinae). *Naturalia,* v.18, p.207-19, 1993.

VIDAL, B. C., MELLO, M. L. S. Biologia Celular. São Paulo. Livraria Atheneu, 317 p., 1987.

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. In: Animal cytology and evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1973. Cap. 3, p.75-86.

WHITING JÚNIOR, J. H., JEFFREY, D. E. Improved *in situ* hybridization and detection of biotin-labelled *Drosophila melanogaster* DNA probes hybridized to *Drosophila virilis* salivary gland chromosomes. *Dros. Info. Serv.,* v.66, p.170-1, 1987.

WHITING JÚNIOR, J. H., PLILEY, M. D., JARMER, J. L. *et al. In situ* hybridization analysis of chromosomal homologies in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis. Genetics,* v.122, p.99-109, 1989.

