



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

---

Adauto de Oliveira Borgueti

**Estudo citogenético e imunocitoquímico em Triatomíneos  
(Heteroptera, Reduviidae)**

**Dissertação apresentada para  
obtenção do Título de Mestre  
em Genética**

---

São José do Rio Preto – SP

2013

**Adauto de Oliveira Borgueti**

**Estudo citogenético e imunocitoquímico em Triatomíneos  
(Heteroptera, Reduviidae)**

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

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

São José do Rio Preto – SP  
2013

Borgueti, Aduino de Oliveira.  
Estudo citogenético e imunocitoquímico em triatomíneos  
(Heteroptera, Reduviidae) - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.  
79 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Triatominae. 2. Espermatogênese. 3. Corpo cromatoide. I.  
Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 575

**ADAUTO DE OLIVEIRA BORGUETI**

**Estudo citogenético e imunocitoquímico em Triatomíneos  
(Heteroptera, Reduviidae)**

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

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo  
Oliveira  
Professora Titular  
UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto  
Orientador

Profa. Dra. Grasiela de Campos Dias Severi Aguiar  
Professora Adjunta  
Centro Universitário Hermínio Ometto -  
UNIARARAS.

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior  
Assistente Doutora  
UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de Fevereiro de 2013

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE - UNESP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos financiada pela CAPES.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Jair Borgueti e Salete de Oliveira Borgueti, os meus exemplos de vida. Agradeço pela melhor herança que um pai pode deixar ao filho, a educação, a firmeza em aspirar triunfos e a capacidade de assimilar derrotas. Agradeço, ainda, pelo apoio, dedicação e amor incondicionais que me foram cedidos durante todas as etapas da minha vida.

*"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino".  
Paulo Freire*

## **Agradecimentos**

Aos responsáveis pela minha existência, meus pais, Jair Borgueti e Salete de Oliveira Borgueti, que de forma simples e singular me mostraram de forma exemplar os verdadeiros valores do ser humano. A minha irmã, Regiane Borgueti, pela maneira única de fazer parte da minha vida. A minha pequenininha, Rafaela, que recém chegada já é vital para nossa felicidade. São cativantes doçura e amor sem igual.

Aos meus avós, Efa Rissoto e Salvador Borgueti, *in memoriam*, por todo carinho a mim dedicado e por tornar minha infância alegre. Aos meus avós maternos, Antônia Neves de Oliveira e Ovani de Oliveira, pela alegria contagiante e marcante dos meus dias.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pela amizade, confiança e companheirismo. Agradeço pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos, pela força, sensibilidade e compreensão. Obrigado por ter me recebido de braços abertos e mostrar que pesquisa pode ser feita com competência e doçura.

A professora Dra. Rosana Silistino Souza, pelo imenso apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho. Obrigado pelos ensinamentos valiosos, pelos conselhos, palavras de otimismo e pelo profissionalismo exemplar.

Ao amigo, Amauri Teodosio da Silva, do qual quero que novas décadas de amizade se repitam. Agradeço todo o apoio e a torcida pelas minhas vitórias. A caminhada com amigos se torna mais leve e agradável, você fez a minha assim. E mesmo que afastados geograficamente, tenho a certeza de ter alguém torcendo pela minha felicidade sempre e a recíproca é inteiramente verdadeira.

Ao meu filhote, José Guilherme Datorre (Zeh) pela amizade única, sem igual. Obrigado pelos momentos inesquecíveis de república, pelas conversas fora de hora, pelas baladas que não foram poucas, pelos papos de biólogos e acima de tudo, pela forma contagiante de viver a vida.

A minha família, tios, tias, primos e primas, em especial, Leidiane Borgueti e Flávio Neves de Oliveira, pelas horas de conversas e momentos eternos de felicidades.

As amigas conquistadas durante a graduação e que terei um carinho eterno, Gabriela B. Gelaleti, Ariane Zanchetta, Ana Beatriz M. Tenália (Bia), Francieli Brumate e Elizabeth Favero.

Aos amigos do laboratório, Priscila, Larissa, Nayara, Nathalia e Ana Letícia pela amizade e momentos de descontração, em especial, Kaio, por tornar as horas de bancada mais agradáveis e o laboratório bem mais barulhento.

Aos amigos, de ontem e sempre, Juliana Teixeira (Juju), Reginaldo Caldeira, Camila Genova, Rafaela Moizés, Luiz Henrique Herreira, Natanael Miranda e Elenilson Paulino.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lílian Castiglioni pelo carinho durante as disciplinas e a disponibilidade constante em ajudar. Obrigado pelas críticas durante a minha qualificação.

A Prof. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e a Prof. Dra. Grasiela de Campos Dias Severi Aguiar pelas valiosas sugestões durante a apresentação da dissertação. Agradeço a Prof. Dra. Rita Luiza Peruquetti pela disponibilidade e contribuição na correção do trabalho, foram valiosas.

Ao Prof Dr. João Aristeu da Rosa por disponibilizar os insetos para a realização do trabalho e ao Jader Oliveira, pela manutenção e disponibilidade dos animais.

Aos colegas de jornada, os professores admirados, Diego Bittencourt, Elaine Cristina Poi, Fernando de Oliveira, Paulo Sérgio Prado (Paulão), Jéssica Marchetti, Stephanie, Isabel Boada, Natalia Moterani, Nathalia Esteves, Bruno Vasques Lopes, Priscila P. Gon, Vitor Sacramento e, em especial, a professora Maria de Lourdes Abrahao que me mostrou a diferença entre o professor e o educador.

Aos meus alunos, pela paciência, incentivo, carinho e por acreditar que eu pudesse contribuir com sua formação por meio da educação cuidadosamente trabalhada com profissionalismo e amor.

Aos alunos e professores da Pós-Graduação em Genética, pelos bons momentos compartilhados nas disciplinas.

Ao IBILCE, pela infraestrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

A Deus pela proteção perpétua e por permitir ser o que sou. Ao irmão maior, Jesus, por iluminar e conduzir os meus passos.

Obrigado!

## Resumo

Os triatomíneos, insetos hematófagos estritos em todas as fases da vida, conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupanças”, pertencem à subfamília Triatominae (Heteroptera – Reduviidae) e são importantes vetores da doença de Chagas. Os interesses nos estudos desses insetos não se limitam apenas a questão médico-sanitária, pois em termos citogenéticos, também são de grande importância. Além disso, a sistemática e relações filogenéticas dos triatomíneos têm sido pautadas em análises morfológicas formando um quadro de conflitos taxonômicos. Assim, por meio da descrição cariotípica de *T. baratai* sugerimos que dados citogenéticos sejam incorporados aos sistemas de classificação dos triatomíneos. Também foi analisada a diversidade de bandas produzidas com o uso de enzimas de restrição AluI (AG ↓ CT) e Hae III (GG ↓ CC) nas espécies de *T. tibiamaculata*, *T. protacta* e *T. platensis*, alojadas em três diferentes complexos. Os dados obtidos mostraram padrões semelhantes em cromossomos autossômicos e sexuais e comportamentos ora distintos ora semelhantes em núcleos interfásicos. O estudo da proteína nucleolar fibrilarina, por meio de técnicas de imunofluorescência, foi realizada para verificar sua presença no corpo cromatoide, estrutura citoplasmática próximo do envoltório nuclear, de *T. platensis* e *T. rubrovaria*. Os dados obtidos no presente estudos aliados com outras técnicas auxiliarão na compreensão da biologia desses vetores da doença de Chagas.

**Palavras-chaves:** triatomíneos, doença de Chagas, espermatogênese, enzimas de restrição, fibrilarina

## Abstract

The triatomine hematophagous insects strict at all stages of life, popularly known as "kissing bugs" or "chupanças" belong to the subfamily Triatominae (Heteroptera - Reduviidae) and are important vectors of Chagas disease. The interests in the studies of these insects are not limited to medical and health issue, because in terms cytogenetic, are also of great importance. Moreover, the systematic and phylogenetic relationships of the insects have been guided by morphological analyzes forming a taxonomic framework of conflict. Thus, by describing karyotype of *T. baratai* suggest that cytogenetic data are incorporated into the rating systems of the insects. Also analyzed the diversity of bands produced with the use of restriction enzymes AluI (AG ↓ CT) and Hae III (GG ↓ CC) on the species *T. tibiamaculata*, *T. protacta* and *T. platensis*, housed in three different complexes. The information obtained showed similar patterns in autosomal chromosomes and sexual behavior and sometimes different now similar in interphase nuclei. The study of nucleolar protein fibrillarin, by means of immunofluorescence was performed to verify its presence in chromatoid body, cytoplasmic structure near the nuclear envelope, *T. platensis* and *T. rubrovaria*. The information obtained in this study combined with other techniques will help understand the biology of these vectors of Chagas disease.

**Keywords:** triatomine Chagas disease, spermatogenesis, restriction enzymes, fibrillarin.

## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micromol
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>A</b>	Adenina
<b>bp</b>	do inglês <i>base pare</i>
<b>B36</b>	Fibrilarina
<b>BSA</b>	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CB</b>	do inglês <i>chromatoid body</i>
<b>CFD</b>	Corpo fibrilar denso
<b>CMA<sub>3</sub></b>	Cromomicina A3
<b>CTA</b>	Centro de Triatomíneos de Araraquara
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DAPI</b>	do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenilindole</i>
<b>EDTA</b>	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>Ers</b>	Endonucleases de restrição
<b>FISH</b>	do inglês <i>fluorescent in situ hidridization</i>
<b>g</b>	Grama
<b>G</b>	Guanina
<b>G2</b>	do inglês <i>gap 2</i>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Fórmula química da água
<b>HCl</b>	Fórmula química ácido clorídrico
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>milliQ</b>	Água deionizada pelo sistema Milipore
<b>M</b>	Molar
<b>N</b>	Normal
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NOLS</b>	Sinal de localização nuclear

<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAHO</b>	do inglês <i>Pan American Health Organization</i>
<b>PBS</b>	do inglês <i>phosphate buffer solution</i>
<b>PCR</b>	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>RNA<sub>r</sub></b>	RNA ribossomal
<b>RNA<sub>t</sub></b>	RNA transportador
<b>RONs</b>	Regiões Organizadoras de Nucléolo
<b>snoRNA</b>	do inglês <i>small nucleolar RNA</i>
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>T</b>	Timina
<b>TRIS</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>U</b>	Unidade

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	03
1.1 Aspectos epidemiológicos e médico-sanitário dos triatomíneos.....	04
1.2 Sistemática e Filogenética dos triatomíneos.....	07
1.3 Aspectos Citogenéticos dos triatomíneos.....	11
1.4 Corpo cromatoide.....	14
1.5 Considerações sobre a importância do presente estudo.....	15
1.6 Referências bibliográficas.....	17
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Insetos.....	26
3.2 Órgãos e estádios estudados.....	26
3.3 Dissecção dos insetos.....	26
3.4 Técnicas citogenéticas convencionais.....	27
3.4.1 Fixação dos túbulos seminíferos .....	27
3.4.2 Confeção das lâminas .....	27
3.4.3 Coloração Orceína lacto-acética.....	27
3.4.4 Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas citogenéticas convencionais.....	28
3.5 Técnicas citogenéticas moleculares.....	28
3.5.1 Bandamento enzimático.....	28
3.5.2 Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas citogenéticas moleculares.....	28
3.6 Técnicas de Biologia estrutural e ultraestrutural.....	29
3.6.1 Fixação, processamento e inclusão para microscopia de luz e eletrônica de transmissão.....	29

3.6.2	Coloração com azul de toluidina.....	30
3.6.3	Reação de imunofluorescência.....	30
3.6.4	Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas de biologia estrutural e ultraestrutural.....	30
<b>IV. RESULTADOS</b>	.....	<b>32</b>
4.1	Artigo 01. Homogeneidade cariotípica entre os triatomíneos que compõem o subcomplexo Matogrossensis.....	33
4.2	Artigo 02. Determinação de sequências (AG ↓ CT) e (GG ↓ CC) em triatomíneos com uso de endonucleases de restrição (AluI e HaeIII).....	43
4.3	Localização da proteína fibrilarina em corpos cromatoides durante a diferenciação de células espermatogênicas em Triatomíneos (Hemiptera, Triatominae).....	57
<b>V. CONCLUSÕES</b>	.....	<b>77</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos epidemiológicos e médico-sanitário dos triatomíneos

Os triatomíneos, insetos hematófagos estritos em todas as fases da vida, conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupanças”, pertencem à subfamília Triatominae (Heteroptera – Reduviidae). Trata-se de vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, que infecta uma grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos e ocasionam em humanos a tripanossomíase americana conhecida como doença de Chagas.

A doença de Chagas é considerada um dos mais importantes problemas de saúde na América Latina, com cerca de 9 a 14 milhões de indivíduos chagásicos, 60 milhões vivendo em risco e cerca de 20.000 casos/ano em 18 países da América do Sul e Central (MARCILLA et al., 2002; CERETTI JR., et al., 2008; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; COSTA; LORENZO, 2009; MENDONÇA et al., 2009; BÉRENGER et al., 2009).

Devido a seu comportamento e fisiologia semelhantes, todas as espécies de triatomíneos podem ser consideradas como vetores em potencial. As espécies de grande significado epidemiológico estão agrupadas em três gêneros, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, pois estão adaptadas a viver em próxima associação com humanos.

Em 2006, a *Pan American Health Organization* (PAHO) declarou o Brasil livre da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*, espécie considerada vetor primário (vetor doméstico) no país, e responsável por cerca de 80% da transmissão durante a década de 80. Entretanto, estudos recentes (SILISTINO-SOUZA et al., 2012) demonstrou que a doença de Chagas é ainda uma cardiopatia preocupante, uma vez que espécies predominantemente silvestres tem surgido como vetores em potencial em várias regiões do Brasil, pois após *T. infestans* ter sido considerada erradicada, o nicho ficou disponível para que outras espécies estritamente silvestres se adaptassem e passassem a ocupar o ambiente domiciliar em busca de habitats e alimento.

Por exemplo, no Rio Grande do Sul, dados do Programa de Controle da doença de Chagas mostraram um aumento da invasão domiciliar e peridomiciliar de *T. rubrovaria*, utilizada no presente estudo, que a princípio foi considerada exclusivamente silvestre (MENDONÇA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2009).

Outras espécies do gênero *Triatoma* (*T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*) apresentam papel epidemiológico importante no Brasil, sendo que a espécie *T. brasiliensis* é considerada um importante vetor da doença de Chagas no nordeste brasileiro. A espécie *Triatoma sherlocki*, considerada originalmente silvestre, também tem gerado preocupação, pois foram encontrados espécimes silvestres e domiciliares no município de Gentio do Ouro, Bahia, onde garimpos informais estão em amplo crescimento. Essa espécie foi descrita inicialmente como uma subespécie de *T. brasiliensis*, e posteriormente, foi considerada relacionada à espécie *T. lenti*, no entanto *T. sherlocki* necessita de mais estudos (PANZERA et al., 1996; MENDONÇA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2009; ALEVI et al., 2012).

Ainda no Brasil a possibilidade de emergência da doença de Chagas no território da Amazônia tem chamado atenção, pois alguns fatores são considerados como importantes desencadeadores de uma alteração do quadro atual da doença, que é considerada uma enzoontia silvestre na região amazônica. Entre esses fatores podem ser citados as migrações humanas e o crescente desmatamento da região. Até o momento foram encontradas 18 espécies de triatomíneos na região da Amazônia brasileira: *Alberprosenia malheroi*, *Belminus laportei*, *Cavernícola lenti*, *C. pilosa*, *Eratyrus mucronatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. liglignarius*, *P. megistus*, *P. rufotuberculatus*, *R. amazonicus*, *R. brethesi*, *R. paraensis*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *R. robustus*, *T. maculata* e *T. rubrofasciata* (ROCHA et al., 2009).

Fé e colaboradores (2009) relataram que várias espécies de triatomíneos coletadas em uma ampla variedade de ecótopos naturais na Amazônia brasileira encontram-se com altas

taxas de infecção pelo *T. cruzi*. Esses autores fizeram coletas de ninfas e adultos, nos ambientes domiciliar, peridomiciliar e no ambiente silvestre (palmeiras). Da espécie *R. pictipes* foram coletados 22 espécimes, sendo 12 no ambiente domiciliar e 10 silvestres, e da espécie *R. robustus* foram coletados 25 espécimes, duas no ambiente domiciliar e 23 silvestres. A presença do protozoário foi observada em todos os insetos adultos coletados.

No outro extremo do país, duas espécies tem chamado atenção, *T. rubrovaria* e *T. platensis*, utilizadas no atual estudo, cuja área de distribuição abrange o sul do Brasil (LENT; WYGODZINSKY. 1979), em específico, Rio Grande do Sul (ALMEIDA, et al., 2002), pois são espécies potenciais na transmissão do *T. cruzi* e que apresentam altas taxas de invasão intradomiciliar e peridomicilar com hábitos generalistas (MARTINS et al., 2008). O aumento da invasão intradomiciliar e peridomiciliar está diretamente ligado ao sucesso reprodutivo dessas espécies.

O gênero *Panstrongylus* compreende 14 espécies, sendo quatro capazes de desenvolver colônias domésticas em algumas áreas geográficas: *P. megistus* com grande importância epidemiológica, é encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai e, recentemente, no sudeste da Bolívia; *P. rufotuberculatus* é amplamente distribuída na América do Sul, América Central e México; *P. chinai* e *P. herreri*, ambas conhecidas no Peru e Equador, muitas vezes estas espécies apresentam-se infectadas pelo *T. cruzi* (MARCILLA et al., 2002).

Várias espécies silvestres ocasionalmente são registradas no ambiente doméstico: *P. geniculatus* que é amplamente distribuída pela América do Sul, América Central e México e coloniza chiqueiros no Brasil; *P. lutzii* é limitado ao Brasil; *P. howardi* ocorre somente no Equador; *P. guentheri* é encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e sul da Bolívia; *P. humeralis* é encontrada somente no Panamá; e *P. diasi* é amplamente distribuída no Brasil e

há relatos na Bolívia. Todas essas espécies, com exceção de *P. lutzi* e *P. diasi*, têm sido encontradas infectadas pelo *T. cruzi* (MARCILLA et al., 2002).

Finalmente, duas espécies parecem ser exclusivamente silvestres, e naturalmente infectadas pelo *T. cruzi*: *P. lignarius*, encontrada no Brasil, Guiana, Suriname e Venezuela e *P. tupynambai*, que é encontrada embaixo de pedras no Brasil e Uruguai (MARCILLA et al., 2002). Assim, com base na grande diversidade de triatomíneos e no aumento nas taxas de contaminação e adoção de novas rotas, intradomiciliares e peridomiciliares, são necessários novos estudos a fim de compreender a biologia desses insetos.

## 1.2 Sistemática e Filogenética dos triatomíneos

Até o momento, 143 espécies de triatomíneos foram descritas e reconhecidas como táxons válidos. No entanto, esses números estão em contínuas mudanças devido a revisões taxonômicas e descobertas de novas espécies. Desse total de espécies, 61 estão presentes no Brasil, onde é encontrada a mais diversa fauna de triatomíneos (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; COSTA; LORENZO, 2009; MENDONÇA, et al., 2009; BÉRENGER et al., 2009; PANZERA et al., 2010).

Os Triatominae são classificados como uma subfamília dos Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera) definidos por sua habilidade em sugar o sangue dos hospedeiros e por possuírem adaptações morfológicas associadas com o hábito da alimentação (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PANZERA et al., 2010).

Embora os Reduviidae sejam amplamente distribuídos pelo mundo, de 55° N a 55° S, os Triatominae foram encontrados primariamente nas Américas, de 46 ° N a 46 ° S. Uma única espécie, *T. rubrofasciata*, é relatada em áreas portuárias através dos trópicos e subtropicais, e um pequeno grupo de sete espécies relacionadas de *Triatoma* são encontradas no leste da Ásia (da China ao norte da Austrália). O atípico gênero *Linshcosteus* com seis

espécies descritas é encontrado somente no subcontinente Indiano. No entanto, com exceção de alguns imigrantes infectados da América Latina, o agente causal da doença de Chagas não é encontrado naturalmente no Velho Mundo (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

Evidências atuais sugerem que os Triatominae representem um grupo polifilético, com diferentes tribos e grupos de espécies derivadas de diferentes linhagens dentro dos Reduviidae, definido com base em seus caracteres apomórficos convergentes relacionados a hematofagia (TARTAROTTI, et al., 2006; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

De acordo com Schofield e Galvão (2009), os Triatominae são classificados em cinco tribos e 15 gêneros da seguinte maneira: Tribo Alberproseniini, gênero *Alberprosenia* (2 espécies); Tribo Bolboderini, gêneros: *Belminus* (8 espécies); *Bolbodera* (1 espécie); *Microtriatoma* (2 espécies); *Parabelminus* (2 espécies); Tribo Cavernicolini, gênero *Cavernicola* (2 espécies); Tribo Rhodniini, gêneros *Psammolestes* (3 espécies); *Rhodnius* (16 espécies); Tribo Triatomini, gêneros *Dipetalogaster* (1 espécie), *Eratyrus* (2 espécies), *Hermanlenticia* (1 espécie), *Linshcosteus* (6 espécies), *Panstrongylus* (13 espécies), *Paratriatoma* (1 espécie), *Triatoma* (80 espécies).

No grupo dos triatomíneos, as tribos Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Alberproseniini e Linshcosteini constituem grupos monofiléticos, onde cada tribo possui um ancestral em comum, enquanto a tribo Triatomini é considerada como sendo um grupo polifilético, com vários ancestrais originando a tribo (LENT, WYGODZINSKY, 1979). Por exemplo, as espécies do gênero *Panstrongylus* estão incluídas na tribo Triatomini. Análises filogenéticas revelaram que os gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* são mais proximamente relacionados entre si quando comparado com o gênero *Rhodnius* (STOTHARD et al., 1998).

Como, a maioria das classificações, tem sido baseada em características morfológicas, as comparações de caracteres citogenéticos e sequências de DNA genômicas têm, algumas vezes, mudado essas associações (Schofield e Galvão, 2009).

A origem monofilética é bem caracterizada no gênero *Rhodnius* quando são considerados caracteres morfológicos. As espécies desse grupo possuem características similares e podem ter se originado de uma espécie ancestral comum. É postulado que o gênero *Rhodnius* apareceu na região Amazônica durante o período Quaternário. Provavelmente, a espécie próxima dos ancestrais Reduviidae seja *R. pictipes*, que habita as bromeliáceas e uma variedade de palmeiras. Outras espécies são mais especializadas e podem ser consideradas derivadas de *R. pictipes*. A similaridade entre espécies do gênero *Rhodnius* é grande, sendo que, algumas vezes, uma espécie é interpretada por outra, devido as suas similaridades morfológicas (SCHOFIELD; DUJARDIN, 1999).

Embora critérios morfológicos auxiliem na identificação de espécimes em nível genérico, a identificação em nível de espécie de *Rhodnius* é considerada uma das mais difíceis entre os Triatominae. Espécies do grupo prolixus (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) são particularmente difíceis de distinguir, fato que tem levado a uma identificação errônea em várias ocasiões (MONTEIRO et al., 2001).

Um estudo filogenético realizado por Monteiro e col. (2001), com 11 espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* e uma do gênero *Psammolestes* utilizando análises de seqüências de DNA (*cyt b* e RNA mitocondrial) e RNA (28S) revelou dois clados dentro da tribo Rhodniini; um incluindo espécies do grupo prolixus (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) junto com *R. domesticus* e *R. neivai*. O segundo clado inclui grupos formados por *R. pictipes* mais *R. brethesi* e por *R. ecuadoriensis* mais *R. pallescens*. *Psammolestes tertius* aparece mais proximamente relacionado ao grupo prolixus. Este estudo indicou a natureza parafilética do gênero *Rhodnius* suportando a monofilia da tribo Rhodniini.

Nesse mesmo estudo realizado por Monteiro e col. (2001), as análises realizadas deram suporte à ideia de que a espécie *R. robustus* representa uma entidade silvestre enquanto *R. prolixus* é uma espécie mais adaptada ao ambiente doméstico.

Um outro estudo, realizado por Ceretti Jr. et al, (2008), no qual foram obtidas sequências de nucleotídeos de fragmentos do gene 16S de DNA mitocondrial foi possível corroborar dados de estudos anteriores verificando-se que *R. prolixus* e *R. robustus* tratam-se de linhagens distintas de espécie única adaptadas a ecótopos diferentes.

Divergências entre abordagens morfológicas e genéticas também têm sido registradas para outros táxons de triatomíneos, tais como o grupo parafilético do gênero *Triatoma*, que inclui algumas espécies do gênero *Panstrongylus*, e a discussão a cerca do gênero *Psammolestes*, como sendo proximamente relacionado com o gênero *Rhodnius*, apesar de serem muito diferentes morfológicamente (MENDONÇA et al., 2009).

Mendonça e col. (2009), analisando a espécie *Triatoma sherlocki*, pelo sequenciamento de dois genes mitocondriais (*cyt B* e 16S), sugeriram uma relação de proximidade com as espécies do complexo *Triatoma brasiliensis*, especialmente *T. melanica*, suportando a hipótese de que *T. sherlocki* pode ser classificada como uma espécie do complexo *T. brasiliensis* e indicando uma possível filogeografia de um ancestral comum. Alevi et al, (2012), por meio de bandamento-C corroborou a classificação de *T. sherlocki* no complexo.

Ao longo dos estudos sobre a origem e evolução dos triatomíneos ainda existem inúmeras lacunas. É de suma importância que novos dados sobre essas espécies sejam fornecidos para corroborar ou não com as classificações atuais que estão embasadas em características morfológicas.

### 1.3 Aspectos Citogenéticos dos triatomíneos

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

Dentre as peculiaridades citológicas desses animais, destaca-se também a prófase da primeira divisão meiótica, que não apresenta as subfases características distintas. Esses estádios são denominados conjuntamente de “estádio difuso” 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 número diploide em triatomíneos é muito homogêneo, variando de 21 a 25 cromossomos nos machos e 22 a 26 nas fêmeas. O número de autossomos (20A) permanece constante nas espécies já analisadas em vários estudos, com exceções de duas espécies de *Triatoma* (18A e 22A) e uma espécie de *Panstrongylus* (18A). As principais diferenças estão no número de cromossomos sexuais devido à existência de três sistemas sexuais nos machos: XY; X1X2Y e X1X2X3Y. Geralmente, as espécies de um gênero apresentam o mesmo mecanismo sexual, no entanto, o gênero *Triatoma* exhibe os três mecanismos. Curiosamente, todas as espécies do gênero *Triatoma* da América do Norte apresentam múltiplos cromossomos sexuais (exceto *T. lecticularia*) enquanto a maioria das espécies de *Triatoma* da América do Sul apresenta sistema XY (PANZERA et al., 2010).

Os principais mecanismos que levam a alterações no número de cromossomos em Heteroptera são fusões ou fragmentações dos autossomos, e fragmentação dos cromossomos

sexuais originando múltiplos sistemas de cromossomos sexuais. Sugere-se que o mecanismo sexual XY seja o sistema ancestral dentro dos Triatominae.

As primeiras evidências dos processos cromossômicos que aconteceram durante a evolução dos triatomíneos foram obtidas, com base na investigação cromossômica comparativa, por meio de colorações convencionais, em espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; MORIELLE, 2004; SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2006; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2008; BARDELLA et al., 2008; COSTA et al., 2009), do gênero *Panstrongylus* (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; MORIELLE, 2004; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2008) e do gênero *Rhodnius* (MORIELLE, 2000; MORIELLE, 2004; MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004).

Dos inúmeros estudos realizados até o presente momento sob a óptica da citogenética, foram obtidos dados sobre a espermatogênese de espécies pertencentes aos três gêneros com informações sobre as características cromossômicas, como o número e tamanho cromossômico, posicionamento dos cromossomos na placa metafásica, presença de cromossomos retardatários e pontes cromatínicas durante a anáfase, localização das regiões organizadoras nucleolares (RONs), presença de corpúsculos pré-nucleolares, discriminação do DNA e RNA nos cromossomos e localização das regiões heterocromáticas dos cromossomos desses hemípteros.

Sabe-se que na maioria dos eucariotos, geralmente, os cromossomos apresentam alguma heterocromatina, mas sua propriedade de coloração e a natureza do DNA que contem, variam extensivamente dentro e entre espécies e, em geral, blocos de heterocromatina são heteromórficos para tamanho, e, algumas vezes, para propriedades de coloração (SUMNER, 1982).

Os estudos que analisam longitudinalmente os cromossomos são eficazes para fornecer informações que auxiliam em estudos de diferentes ordens. A homogeneidade do número de cromossomos dos Triatominae pode ser diferencialmente analisados com aplicações de técnicas de bandamento C, análises com endonucleases de restrição e marcação por reações de imunofluorescência.

Diversos estudos realizados com triatomíneos indicam que a heterocromatina dos autossomos é caracterizada pela alta variabilidade interespecífica, incluindo mudanças em sua quantidade, tamanho, localização e comportamento durante a meiose. A quantidade de heterocromatina pode variar entre 0 a 45% do complemento autossômico total (PANZERA et al., 1995).

O tamanho dos blocos heterocromáticos é também altamente variável. Em várias espécies de *Rhodnius*, as bandas-C são pequenas, no entanto, em *Triatoma nítida* os blocos-C representam 80% do cromossomo. A heterocromatina pode ser encontrada em um ou mais, ou em todos os pares de autossomos. Localiza-se geralmente nos telômeros, ou uma ou ambas as extremidades cromossômicas. Excepcionalmente são observadas também bandas intersticiais. Esses tipos de diferenças da heterocromatina entre as espécies de triatomíneos tem sido utilizadas para inferir a existência de várias espécies crípticas dentro do gênero *Triatoma* (PAPESCHI, 1995; PANZERA et al., 2010, 2012).

Este marcador cromossômico também têm sido uma eficaz ferramenta para a detecção de variação intraespecífica ou polimorfismos em diversas espécies dos gêneros *Triatoma* (PANZERA et al., 2010), *Panstrongylus* (PÉREZ et al., 2002) e *Rhodnius* (GÓMEZ-PALACIO et al., 2008).

São conhecidas inúmeras técnicas que diferenciam regiões heterocromáticas em cromossomos metafásicos. A mais simples é a técnica de obtenção de bandas C, descrita por Sumner (1982), a qual detecta somente heterocromatina constitutiva. No entanto existem

outras técnicas para se obter bandas diferenciais em cromossomos metafásicos e, atualmente, as análises citogenéticas em insetos foram aprimoradas com o emprego de técnicas de citogenética molecular com a utilização de fluorocromos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) proporcionando, dessa forma, que uma série de estudos fossem realizados nesses hemípteros. Podem ser citados como exemplo os trabalhos realizados por MORIELLE, 2004; SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; BARDELLA, et al., 2010). Nesses trabalhos os autores utilizaram os fluorocromos Acridina Orange para a discriminação do DNA e RNA na placa metafásica, Cromomicina A3 (CMA<sub>3</sub>) e DAPI, caracterizando regiões ricas em CG e AT, respectivamente, além da técnica de FISH com sonda de DNAr (12 kb - pDm 238 – *Drosophila melanogaster*) que permitiu a visualização das RONS cromossômicas.

Os resultados obtidos com a utilização de técnicas de citogenética molecular e de FISH, juntamente com técnicas convencionais, permitiram que o nosso grupo de pesquisa ampliasse os conhecimentos sobre a estrutura e natureza dos cromossomos holocêntricos, possibilitou também detectar diferenças interespecíficas dentro dos gêneros da subfamília Triatominae, mostrando que a citogenética se torna uma importante ferramenta para a caracterização taxonômica e filogenética desses insetos hematófagos.

#### **1.4 Corpo cromatoide**

O corpo cromatoide, estrutura citoplasmática, localizado estrategicamente em território próximo ao envoltório nuclear, participa do estoque de RNA e é dotado de proteínas específicas que atuam na diferenciação dos espermatozoides. Tal estrutura, de natureza macromolecular, participa ainda de inúmeras funções, tais como, controle pós transcricional em células germinativas haploides, destino de RNAm, direcionamento de mitocôndrias nas

espermátides, auxílio na formação do acrossomo, da bainha mitocondrial e do flagelo do espermatozoide (PERUQUETI et al., 2008, 2012).

A biogênese do corpo cromatoide é ainda um processo não totalmente conhecido. Acredita-se que a desfragmentação do nucléolo possa estar relacionada com a formação do corpo cromatoide, contudo, suas funções e composição proteica tem sido largamente analisadas em diferentes grupos de seres vivos (PERUQUETI et al., 2008, 2012; SILISTINO-SOUZA et al., 2012).

Estudos indicam que ocorra a fragmentação do material nucleolar e possível migração de parte desse material para o citoplasma dos espermátocitos primários e uma diminuição do volume nucleolar que se reorganiza nas espermátides, sugerindo uma relação com a formação do corpo cromatoide (PERUQUETTI et al., 2008).

Inúmeras proteínas fazem parte do corpo cromatoide, indicando sua multifuncionalidade. Entre as proteínas que já foram identificadas como fazendo parte da composição molecular do corpo cromatoide, podemos destacar a proteína nucleolar fibrilarina. Segundo Barigyna (2010) a fibrilarina é uma proteína evolutivamente conservada e obrigatória em nucléolos de células eucarióticas, participando de diferentes processos biológicos.

Pouco ainda é conhecido sobre o comportamento nucleolar e a localização dos componentes nucleolares, incluindo proteínas, durante o processo de nucleologênese meiótica dos triatomíneos (SILISTINO-SOUZA, 2012) sendo necessário, então, o investimento em novos estudos.

### **1.5 Considerações sobre a importância do presente estudo**

Os triatomíneos, dentro da ordem Heteroptera, representam um grupo de grande interesse no meio científico, pois, além de serem os vetores do protozoário *T. cruzi*, agente

causal da doença de Chagas, apresentam cromossomos holocêntricos e uma distribuição não usual na meiose, onde a divisão dos cromossomos sexuais é pós-reducional. Em sistemas holocêntricos a subfamília Triatominae é um dos grupos de insetos com grande variabilidade e diversificação cromossômica. Ainda são poucos os conhecimentos sobre os mecanismos de evolução cromossômica nesse tipo específico de cromossomo.

As análises da variabilidade de heterocromatina, por técnicas de bandamento enzimático, com enzimas AluI e HaeIII, podem fornecer novos elementos para o entendimento da diversificação que ocorre neste grupo. O uso de técnicas imunocitoquímicas poderá fornecer novos elementos para o entendimento das mudanças genômicas presentes nos cromossomos desses insetos.

Vários estudos citogenéticos, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, indicaram que muitas marcações são espécie-específicas e, à semelhança de outros grupos de animais, são importantes marcadores cromossômicos que possibilitam estudos comparativos visando um melhor entendimento dos mecanismos evolutivos que atuam nesses importantes insetos hematófagos.

Portanto, as técnicas de citogenética clássica, juntamente com as técnicas de citogenética molecular e de imunocitoquímica, irão fornecer dados importantes e consistentes que auxiliarão a compreender as mudanças que ocorreram nos cromossomos durante a especiação dos triatomíneos.

Vale ressaltar que o entendimento das inter-relações evolutivas entre espécies e gêneros, obtido por meio de dados citogenéticos, pode otimizar o controle desses insetos vetores, uma vez que 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.

## 1.6 Referências Bibliográficas

ALEVI, K.C.C., MENDONÇA, P.P., PEREIRA, N.P., ROSA, J.A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652-1653, 2012.

ALMEIDA, C.E., PACHECO R.S., NOIREAU, F., COSTA, J. 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: Isoenzymatic and Chromatic Patterns of Five Populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

BARDELLA, V.B., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., TARTAROTTI, E. Cytogenetic analysis in the spermatogenesis of *Triatoma melanosoma* (Reduviidae; Heteroptera). **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 326-335, 2008.

BARDELLA, V.B. **Análise citogenética molecular em túbulos seminíferos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera)**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto. 2010.

BARYGINA, V.V., VEIKO, V.P., ZATSEPINA, O.V. Analysis of nucleolar protein fibrillarin mobility and functional state in living HeLa cells. **Biochemistry**, v. 75, p. 979-988, 2010.

BÉRENGER, J.M. et al. The Triatominae species of French Guiana (Heteroptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.8, p.1111-1116, 2009.

CERETTI-JR, W., VENDRAMI, D.P., GIL, J.M. et al. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de sequências do 16S rDNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n3, p. 455-462, 2008.

COSTA, J., LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines – Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n.1, p. 46-51, 2009.

DE VAIO, E.S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A.M., et al. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera, Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.

DUJARDIN, J.P., PANZERA, F., SCHOFIELD, C.J. Los vectores de la enfermedad de Chagas. **Académie Royale des Sciences d’Outre-Mer, Brussels**, p.1989, 2002.

GÓMEZ-PALACIO, A., JARAMILLO-OCAMPO, N., TRIANA-CHÁVEZ, O., SALDAÑA, A., CALZADA, J., PÉREZ, R., PANZERA, F. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, 2008.

HUGHES-SCHRADER, S. SCHRADER, F. The kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 329-350, 1961.

LENT, H., WYGODZINSKY, P., Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p.123-520, 1979.

MARCILLA, A., BARGUES, M.D., ABAD-FRANCH, F., et al. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, p. 225-235, 2002.

MARTINS, L.P., MARCILI, A., CASTANHO, R.E., THEREZO, A.L., OLIVEIRA, J.C., SUZUKI, R.B., TEIXEIRA, M.M., ROSA, J.A., SPERANÇA, M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.9, p.427-34, 2008.

MENDONÇA, V.J., SILVA, M.T.A., ARAÚJO, R.F. et al. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.

MONTEIRO, F.A., ESCALANTE, A.A., BEARD, C.B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **TRENDS in parasitology**, v.7, p.344-347, 2001.

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

MORIELLE, A; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Micron**, v. 39, p. 1020–1026, 2008.

PANZERA, F., PÉREZ, R., HORNOS, S., PANZERA, Y., CESTAU, R., DELGADO, V., NICOLINI, P. Chromosome numbers in Triatominae (Hemíptera-Reduviidae): A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 515-518, 1996.

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

PANZERA, F., PEREZ, R., PANZERA, Y., FERRANDIS, I., FERREIRO, M.J., CALLEROS, L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 128, p. 77-87, 2010.

PANZERA, Y., PITA, S., FERREIRO, M.J., FERRANDIS, I., LAGES, C., PÉREZ, R., SILVA, A.E., GUERRA, M., PANZERA, F. High dynamics of rDNA cluster location 56 in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). **Cytogenetics Genome Research**, v.138, p. 56-67, 2012.

PERUQUETI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T,V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid bodies formation during the rat (*Ratus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v.39, p. 419-425, 2008.

PERUQUETTI, R.L., de MATEO, S., SASSONE-CORSI, P. 2012. *Circadian Proteins CLOCK and BMAL1 in the Chromatoid Body, a RNA Processing Granule of Male Germ Cells*. PLoS ONE 7(8): e42695. doi:10.1371/journal.pone.0042695. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042695>. Acessado em: setembro/2012.

ROCHA, D.S., JURBERG, J., da ROSA, J.A., SCHAEFER, C.W. Description of eggs and nymphal instars of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 based on optical and scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v.104, p.1-20, 2009.

SEVERI-AGUIAR, G.D.C.; LOURENÇO, LB; BICUDO, H.E.M.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). **Genetica**, v. 126, n. 1, p. 141-151, 2006.

SCHOFIELD, C.J., GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropical**, v. 110, p. 88-100, 2009.

SILISTINO-SOUZA. R.R., PERUQUETTI, R.L., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). **Micron**, v. 43, p.954-60, 2012.

SUMNER, A.T. The nature of mechanisms of chromosome banding. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v. 6, p. 59-87, 1982.

STOTHARD, J.R., YAMAMOTO, Y., CHERCHI, A., GARCIA, A.L., VALENTE, S.A.S., SCHOFIELD, C.J., MILES, M.A. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidea) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSPC) analysis and direct sequencing. **Bulletin Entomological**, v.88, p. 553-560, 1998.

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

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., CERON, C.R. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Brazilian Journal of Biology**. v.66, p. 703-708, 2006.

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

## II. OBJETIVOS

Este estudo multidisciplinar teve por objetivo avaliar, por meio de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares e de biologia estrutural, exemplares machos adultos de triatomíneos a fim de analisar as características da espermatogênese.

A busca pelo objetivo geral foi propiciada pelos seguintes objetivos específicos:

- Incorporar dados citogenéticos aos atuais sistemas de classificação dos triatomíneos, propondo a homogeneidade cariotípica no complexo matogrossensis descrevendo o cariótipo da espécie *T. baratai*.
- Analisar a diversidade de bandas produzidas com o uso de enzimas de restrição (ERs), Alu I e Hae III;
- Analisar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina no corpo cromatóide de células espermatogênicas dos folículos testiculares de triatomíneos, por meio da técnica de imunofluorescência.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Insetos**

O presente trabalho analisou espécies hematófagas de triatomíneos do gênero *Triatoma*, a saber, *T. baratai*, *T. platensis*, *T. protacta*, *T. rubrovaria* e *T. tibiamaculata*. Os exemplares das espécies foram cordialmente cedidos pelo insetário do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP/Araraquara – SP, sob a coordenação do Prof. Dr. João Aristeu da Rosa.

#### **3.2 Órgãos estudados**

A execução das técnicas utilizou testículos provenientes de insetos jovens adultos, cujos túbulos seminíferos foram previamente separados e fixados para serem submetidos às diferentes técnicas propostas.

#### **3.3 Dissecção dos insetos**

Inicialmente os insetos foram eterizados e fixados com alfinetes pela região posterior do cefalotórax (escutelo), em placa de Petri contendo parafina sólida. Para facilitar o acesso aos testículos, as asas e membros locomotores foram retirados com o auxílio de uma pinça. Sob o microscópio estereoscópico, as laterais do abdome e os conexivos foram cortados com uma tesoura pontiaguda. A região antero-dorsal no exoesqueleto abdominal foi parcialmente retirada expondo o interior da região abdominal. A fim de prosseguir com a retirada testicular, foi gotejada solução fisiológica (Demerec) sobre o abdome exposto e retirados os testículos localizados na porção anterior do hemocelo. Os testículos foram transportados para uma lâmina contendo uma gota de solução fisiológica para a limpeza e isolamento dos túbulos seminíferos.

### **3.4 Técnicas citogenéticas convencionais**

#### **3.4.1 Fixação dos túbulos seminíferos**

Após a individualização dos túbulos seminíferos estes foram adicionados em uma solução fixadora de metanol-ácido acético (3:1) e armazenados no freezer à -20°C até o momento de confecção das lâminas.

#### **3.4.2 Confecção das lâminas**

Para a confecção das lâminas, cada túbulo seminífero passou por dois banhos de água destilada de cinco minutos cada. Em seguida, foi acrescentada uma gota de ácido acético 45%, durante 10 minutos. Sob lupa, o túbulo seminífero foi dilacerado, em porções reduzidas, com o auxílio de estiletos e colocado em uma lamínula para a realização do esmagamento celular. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e, então, secas naturalmente ao ar.

#### **3.4.3 Coloração Orceína lacto-acética (DE VAIO *et al.*, 1985, com modificações)**

A técnica tem por finalidade diferenciar em cromossomos em divisão a eucromatina da heterocromatina. Para tal, foi adicionada uma gota de orceína lacto-acética sobre a lâmina anteriormente fixada com o túbulo seminífero e coberta com uma lamínula por aproximadamente 5 minutos. Decorrido esse tempo, o conjunto lâmina-lamínula foi lavado em água destilada até que a lamínula se desprendesse totalmente. O material foi seco ao ar e montado com bálsamo do Canadá para observação ao microscópio.

### **3.4.4 Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas citogenéticas convencionais.**

O material submetido às técnicas citogenéticas convencionais foi analisado por meio de observação das lâminas ao microscópio de luz (*Olympus BX40*), com sistema analisador de imagem AxioVision LE 4.8 (Copyright © 2006-2009 *Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH*).

## **3.5 Técnicas citogenéticas moleculares**

### **3.5.1 Bandamento enzimático**

O bandamento enzimático utilizou endonucleases de restrição (ERs) para acessar sequências específicas de DNA fornecendo bandas características. Tais informações são importantes, pois fornecem dados não obtidos com as técnicas de coloração convencional. No presente estudos foram utilizadas as endonucleases AluI (AG ↓ CT) e Hae III (GG ↓ CC) *Promega Corporation*®. Para a composição da solução enzimática, foram adicionadas 1 µl da enzima de restrição em 9 µl de solução tampão e diluídos em 80 µl de água mili-Q. Dessa solução, foram aplicados 33 µl sobre a lâmina previamente tratada e incubada por 16 horas em câmara úmida por 37°C. O conjunto lâmina-lamínula foi separado em água destilada e corada com Giemsa a 4%, e montado com bálsamo do Canadá para a observação em microscópio de luz.

### **3.5.2 Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas citogenéticas moleculares.**

O material submetido às técnicas citogenéticas moleculares foi analisado por meio da observação das lâminas ao microscópio de luz (*Olympus BX40*), com sistema

analisador de imagem AxioVision LE 4.8 (Copyright © 2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH).

### **3.6 Técnicas de Biologia estrutural e ultraestrutural**

#### **3.6.1. Fixação, processamento e inclusão para microscopia de luz e eletrônica de transmissão**

Os túbulos seminíferos dissecados foram fixados em glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2%, tampão fosfato a 0,1M, pH 7.4, por 24 horas, a 4°C. Para inclusão em resina Araldite, foram lavados no mesmo tampão, fixados em tetróxido de ósmio a 2% por 1 hora, lavados em água destilada, desidratados em uma série crescente de acetona (Merck-Germany) e pré-incluídos em uma mistura de acetona a 100% e resina araldite (*London Resin Co. Reading, Berkshire, UK*), em partes iguais, *overnight*. Após esse tempo, foram pré-infiltrados em resina araldite pura, mantidos em estufa a 37°C, por 2 horas, e, em seguida, incluídos na resina araldite pura, por 72 horas, a 60°C. Para inclusão em LRGold (Sigma) os fragmentos após fixação foram lavados em tampão fosfato a 0,1 M pH7,4, por 30 minutos, na temperatura de 4°C, em seguida, desidratados em metanol em uma série crescente, a temperatura de -20°C. Após foram pré-infiltrados em resina e metanol por 24 horas, e, depois, imersos em resina pura, por 24 horas, e incluídos em LRGold, por 24 horas, a -20°C, sob luz ultra-violeta.

Para a pré-seleção do material a ser submetido às técnicas de ultramicrotomia, foram realizados cortes de 0,5 µm no ultramicrótomato (RM 2265 *Reichert Ultracut*; Leica, Áustria) e, posteriormente, corados em azul de toluidina a 1%, em solução de bórax a 1% (TAAB Laboratories, UK).

### **3.6.2. Coloração com azul de toluidina**

As lâminas contendo os cortes histológicos foram gotejadas Azul de Toluidina a 1%, em solução de bórax a 1% (TAAB Laboratories, UK).

### **3.6.3 Reação de imunofluorescência**

A reação de imunofluorescência foi utilizada para detectar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina nas células espermatogênicas dos túbulos seminíferos de triatomíneos durante o processo de espermatogênese. Cortes de 1  $\mu\text{m}$  foram incubados com albumina sérica bovina a 0,1% em PBS com soro normal a 3% por 1 hora, para bloqueio de ligações não específicas de IgG. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo antifibrilarina *overnight*; após três lavagens em PBS, por 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas em anticorpos secundários marcados com DAPI e ALEXA FLUOR, em câmara escura por 1 hora. As lâminas foram, então, lavadas três vezes em PBS e montadas com solução de glicerol em PBS a 90%. Após a reação, as lâminas foram estocadas a 4°C, em câmara escura, e analisadas ao microscópio de fluorescência, no Centro de Microscopia e Microanálise (UNESP/IBILCE, Câmpus de São José do Rio Preto, SP).

### **3.6.4. Fotodocumentação dos resultados obtidos pelas técnicas de biologia estrutural e ultraestrutural**

As imagens do material obtidas ao microscópio Olympus BX40, com sistema analisador de imagem Axiovision LE, versão 6.1 para Windows, do Laboratório de Biologia Celular (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP). Para a microscopia eletrônica de transmissão, cortes de aproximadamente 50 nm serão obtidos no ultramicrotomo (*Reichert Ultracut*; Leica, Áustria), coletados em telas de cobre e

contra-corados com acetato de uranila e citrato de chumbo para posteriores análises ao microscópio eletrônico Leo-Zeiss, do Centro de Microscopia e Microanálise (UNESP/IBILCE, Câmpus de São José do Rio Preto).

## 4.1 - Artigo 01

(*Short Communication*)

### Homogeneidade cariotípica entre os triatomíneos que compõem o subcomplexo Matogrossensis

ADAUTO DE OLIVEIRA BORGUETI<sup>1</sup>, KAIO CESAR CHABOLI ALEVI<sup>1</sup>, MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA<sup>1</sup>

1. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Departamento de Biologia, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

#### RESUMO

O subcomplexo Matogrossensis é uma nova designação para o complexo *Triatoma oliveirai*. *T. baratai* é uma espécie rara e de habitats selvagens. Assim, o presente estudo visou descrever o cariótipo de *T. baratai* e compará-lo com os de organismos que compõem o subcomplexo. Todas as espécies do subcomplexo matogrossensis, exceto *T. deaneorum*, que não apresenta o cariótipo descrito, tem o conjunto cromossômico diploide de  $2n = 22$  (20A + XY). Propomos por este artigo que, em conjunto com as características iniciais que um triatomíneo deve ter para fazer parte de subcomplexo, deve ser adicionado como requisito inicial de que as espécies apresentem 22 cromossomos.

**Palavras-chave:** citogenética, taxonomia, Triatominae

## **ABSTRACT**

The Matogrossensis subcomplex is a new designation for the *Triatoma oliveirai* complex. *T. baratai* is a rare species and of wild habitats. Thus, we describe the karyotype of *T. baratai* and compared with the organisms that compose the subcomplex. All species of Matogrossensis subcomplex, except *T. deaneorum* that does not present the karyotype described, have the diploid chromosome complement of  $2n = 22$  (20A + XY). We propose through this article that together with the initial characteristics that one triatomine must have to form part of subcomplex, must be added as initial requirement that species presenting 22 chromosomes.

**Keywords:** cytogenetics, taxonomy, Triatominae

## Short communication

Os Triatomíneos são insetos taxonomicamente incluídos na ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Esses organismos são de grande importância médica, pois os estádios ninfais (N1, N2, N3, N4 e N5) e a fase adulta de todas as espécies triatomíneas são hematófagas e suscetíveis à infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) e, com isso, potenciais vetores da doença de Chagas (NOIREAU et al., 2009).

A subfamília atualmente compreende 143 espécies reconhecidas (BELLINI et al., 2012) classificados em 18 gêneros (TARTAROTTI et al., 2006; ROCHA et al., 2009). De acordo com esta proposta de classificação, a espécie pode ser organizada em grupos, complexos e subcomplexo de espécies de acordo com a similaridade fenotípica, capacidade de hibridização, aspectos comportamentais e ecológicos. No entanto, estudos filogenéticos ainda são necessários para corroborar ou não os agrupamentos (OBARA et al., 2012). O subcomplexo matogrossensis foi proposto por Schofield e Galvão (2009) como uma nova designação para o complexo *Triatoma oliveirai*, previamente estabelecido por Carcavallo e colaboradores (2000) (OBARA et al., 2012). A nova composição exclui do grupo as duas espécies que ocorrem no Rio Grande do Sul: *Triatoma oliveirai* Neiva et al. (1939) e *Triatoma klugi* Carcavallo et al. (2001), e inclui *Triatoma costalimai* (Verano & Galvão, 1959). Assim, o novo subcomplexo é composto apenas por espécies que ocorrem na região Centro-Oeste do Brasil (OBARA et al., 2012) conforme representado na tabela 1.

Os estudos citogenéticos tem sido uma ferramenta importante para o estudo de complexos e subcomplexos. Com base em dados citogenéticos tem sido proposta uma revisão na classificação atual, na qual é indicada a exclusão do *T. melanocephala*, *T.*

*tibiamaculata* e *T. vitticeps* do subcomplexo Brasiliensis por se aproximarem das espécies de triatomíneos da América do Norte (ALEVI et al., 2012),.

*T. baratai* é uma espécie rara e de habitats selvagens. Tal fato tem dificultado os estudos que envolvem amostras desses triatomíneos (GARDIM, 2010). Gardim (2010), por meio de análise molecular (DNA mitocondrial), avaliou as espécies do subcomplexo matogrossensis dividindo-o em dois grupos: o primeiro consiste nas espécies *T. jurbergi matogrossensis* e *T. vanda*, e o segundo em *T. baratai*, *T. williamsi* e *T. guazu*.

Recentemente, ovos, ninfas e fêmeas dessas espécies foram descritas por microscopia de luz e eletrônica de varredura, o que nos permite distinguir esta, com auxílio de chaves dicotômicas, para algumas outras espécies do Brasil Central (ROCHA et al., 2009; OBARA, et al., 2012). Além disso, foi registrada a ocorrência de *T. baratai* em domicílios e ambiente peridomiciliar (OBARA et al., 2012).

Assim, o presente estudo teve por objetivo descrever o cariótipo de *T. baratai* e o compará-lo com os de outros organismos que compõem o subcomplexo matogrossensis a fim de avaliar a classificação inicial proposta por Schofield e Galvão (2009), por meio de ferramentas citotaxonômicas.

Para tal, os túbulos seminíferos de cinco machos adultos de *T. baratai* foram retirados e fixados em metanol:ácido acético (3:1), em seguida, foram dilacerados e esmagados. O conjunto lâmina-lamínula contendo o material biológico foi separado em nitrogênio líquido. Em seguida, foram corados com a técnica citogenética de orceína lacto-acética (DE VAIO et al., 1985), com modificações para o material biológico e a duração da exposição dos túbulos seminíferos em ácido acético durante dez minutos. Com base na análise da metafase I, observou-se que os machos de *T. baratai* têm o cariótipo  $2n = 22 (20A + XY)$  (Figura 1).

Por meio da análise da tabela 1 pode-se observar que todas as espécies do subcomplexo Matogrossensis, exceto *T. deaneorum*, que não apresentam o cariótipo descrito, têm o complemento diplóide de  $2n = 22$ .

Obara et al., (2012) propõem uma chave dicotômica para as espécies do subcomplexo matogrossensis. Propomos por meio deste artigo que, em conjunto com as características iniciais que um triatomíneo deve possuir para fazer parte de um subcomplexo, a saber, pronoto marrom ou com marcação ou pronoto inteiramente preto, deve ser adicionado como requisito inicial que as espécies apresentem 22 cromossomos (20 autossomos + XY), uma vez que na literatura existem espécies com 18 autossomos, 22 autossomos,  $X_1X_2Y$  e  $X_1X_2X_3Y$ . A presente análise auxiliará em estudos taxonômicos e permitirá que as classificações sejam feitas com mais subsídios. A correta classificação dos triatomíneos auxilia os estudos taxonômicos, evolutivos e permite a distinção das principais espécies vetoras permitindo que os programas de controles de vetores foquem principalmente no combate dessas espécies.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Padrões éticos**

Os experimentos estão em conformidade com as leis vigentes do país em que foram realizados.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## **Referências Bibliográficas**

ALEVI, K.C.C., MENDONÇA, P.P., PEREIRA, N.P., ROSA, J.A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652-1653, 2012.

BELLINI, M.F., SILISTINO-SOUZA, R., VARELA-GARCIA, M., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., SILVA, A.E. Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.1-11, 2012.

CARCAVALLO, R.U., JURBERG, J., LENT, H., NOIREAU, F., GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomologia y Vectores**, v. 7, p. 1–99, 2000.

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

DUJARDIN, J.P., PANZERA, F., SCHOFIELD, C.J. Los vectores de la enfermedad de Chagas. **Académie Royale des Sciences d’Outre-Mer, Brussels**, p.1989, 2002.

GARDIM, S. **Relação filogenética entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais**. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, Brasil.

LENT, H., WYGODZINSKY, P., Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p.123-520, 1979.

NOIREAU, F., DIOSQUE, P., JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, p. 26, 2009.

OBARA, M.T., BARATA, J.M.S., ROSA, J.A., CERETTI-JUNIOR, W., ALMEIDA, P.S., GONÇALVES, G.A., DALE, C., GURGEL-GONÇALVES, R. Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. **Zootaxa** v. 3151, p. 63–68, 2012.

PANZERA, F., PEREZ, R., PANZERA, Y., FERRANDIS, I., FERREIRO, M.J., CALLEROS, L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 128, p. 77-87, 2010.

PEREZ, R., HERNÁNDEZ, M., CARACCIO, M., ROSE, V., VALENTE, A., MORENO, J., ÂNGULO, V., SANDOVAL, M., ROLDÁN, J., VARGAS, F., WOLFF, M., PANZERA, F. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, p. 47-56, 2002.

ROCHA, D.S., JURBERG, J., da ROSA, J.A., SCHAEFER, C.W. Description of eggs and nymphal instars of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 based on optical and scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**, v. 2064, p.1-20, 2009.

SCHOFIELD, C.J., GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropical**, v. 110, p. 88-100, 2009.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., CERON, C.R. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Brazilian Journal of Biology**. v.66, p. 703-708, 2006.

Tabela 1: As espécies de triatomíneos que compõem o subcomplexo matogrossensis e seu respectivo cariótipo.

<b>SUBCOMPLEXO MATOGROSSENSIS</b>	<b>ESPÉCIES DESCRITAS POR:</b>	<b>CARIÓTIPO</b>	<b>DESCRITO POR:</b>
<i>Triatoma baratai</i>	Carcavallo & Jurberg, 2000	2n= 22 (20 A + XY)	Este artigo.
<i>Triatoma costalimai</i>	Verano & Galvão, 1959	2n= 22 (20 A + XY)	Dujardin et al., 2002
<i>Triatoma deaneorum</i>	Galvão et al. 1967	Não descrito.	
<i>Triatoma guazu</i>	Lent & Wygodzinsky, 1979	2n= 22 (20 A + XY)	Dujardin et al., 2002
<i>Triatoma jurbergi</i>	Carcavallo et al., 1998	2n= 22 (20 A + XY)	Dujardin et al., 2002
<i>Triatoma matogrossensis</i>	Leite & Barbosa, 1953	2n= 22 (20 A + XY)	Pérez et al., 2002
<i>Triatoma vanda</i>	Carcavallo et al., 2002	2n= 22 (20 A + XY)	Panzera et al., 2010
<i>Triatoma williami</i>	Galvão et al., 1965	2n= 22 (20 A + XY)	Dujardin et al., 2002

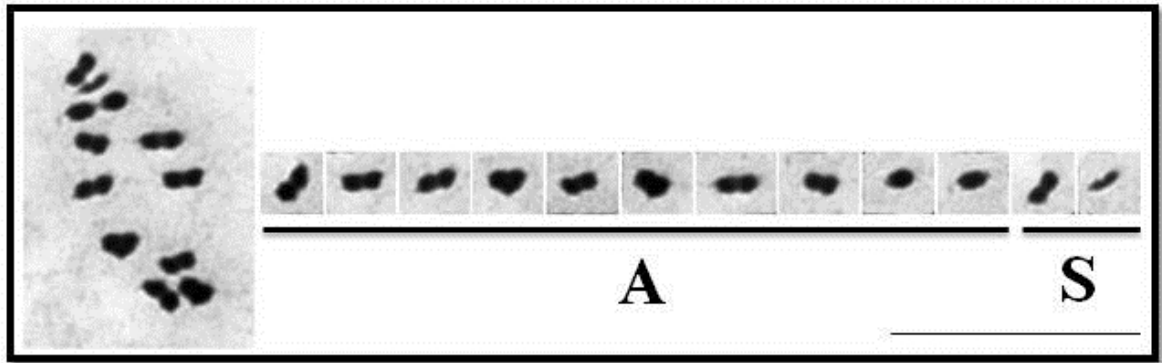


Figura 1: Metáfases meióticas de *Triatoma baratai* submetidas à técnica de orceína-lacto acética. Observe a metáfase I com 10 autossomos bivalentes (A) e dois cromossomos sexuais (S). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 - Artigo 02

### **Determinação de sequências (AG ↓ CT) e (GG ↓ CC) em triatomíneos com uso de endonucleases de restrição (AluI e HaeIII).**

ADAUTO DE OLIVEIRA BORGUETI<sup>1</sup>, KAIO CESAR CHABOLI ALEVI<sup>1</sup>, MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA<sup>1</sup>

1. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Departamento de Biologia, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

#### **RESUMO**

Os sistemas de classificação dos triatomíneos têm sido pautados em análises morfológicas, formando, dessa forma, um quadro de conflitos taxonômicos. Com o avanço das técnicas citogenéticas, em especial, as técnicas de bandamento cromossômico, tem sido possível caracterizar longitudinalmente os cromossomos dessas espécies, auxiliando na resolução desses conflitos. Dessa forma, o presente estudo analisou, por meio das endonucleases de restrição AluI (AG ↓ CT) e Hae III (GG ↓ CC), as espécies *Triatoma platensis*, *T. protacta* e *T. tibiamaculata*. A análise do material sugeriu um padrão de bandas de diferenciação da heterocromatina nos cromossomos autossomos e sexuais nas diferentes espécies analisadas com poucas particularidades. *T. protacta* e *T. platensis* exibiram um padrão semelhante de digestão enzimática nas extremidades teloméricas e intersticiais dos cromossomos autossomos e ausência da atividade enzimática nos cromossomos sexuais. *T. tibiamaculata* exibiu marcações intersticiais e teloméricas nos autossomos e, em alguns casos, demonstrou sinais de digestão nos cromossomos sexuais.

**Palavras-chave:** *T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata*, enzimas de restrição

## ABSTRACT

Classification systems of the insects have been discussed in the morphological analysis, forming thus a framework for taxonomic conflicts. With advances in cytogenetic techniques, in particular chromosomal banding techniques, it has been possible to characterize these species along the chromosomes, assisting in conflict resolution. Thus, the present study analyzed by means of restriction endonucleases AluI (AG ↓ CT) and Hae III (GG ↓ CC), species *Triatoma platensis*, *T. protacta* *T.tibiamaculata* providing new and cytogenetic data. The material analysis suggested a banding pattern of differentiation of heterochromatin in the chromosomes and autosomes in different sexual species analyzed with few specifics. *T. protacta* and *T. platensis* exhibited a similar pattern of enzymatic digestion and interstitial telomeric ends of chromosomes and autosomes no activity in the sex chromosomes. *T. tibiamaculata* and telomeric interstitial markings exhibited in autosomes and in some cases showed signs of digestion in sex chromosomes.

**Keywords:** *T. protacta*, *T. platensis*, *T. tibiamaculata*, restriction enzymes

## 1 Introdução

Os triatomíneos pertencem à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Esses insetos, conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupanças”, realizam hematofagia em todas as fases do ciclo de vida (estádios ninfais e adulto) e, com isso, são considerados os principais vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da tripanossomíase americana conhecida como doença de Chagas.

Esses insetos são valiosos para estudos celulares, pois apresentam cromossomos holocêntricos, caracterizados pela presença de um cinetócoro difuso e uma formação não usual de meiose, onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997; SEREVI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004).

A maioria dos resultados citogenéticos sobre triatomíneos foram obtidos com base na investigação cromossômica comparativa, por meio de colorações convencionais dos cromossomos, como orceína lacto-acética. Nesses trabalhos, os critérios de comparação foram basicamente o número e a morfologia dos cromossomos, bem como a disposição desses na placa metafásica. Os dados obtidos, com base nessas investigações, deram as primeiras indicações dos processos que aconteceram durante a evolução cromossômica desses insetos (PÉREZ et al., 1992; PANZERA et al., 1996; TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997).

O avanço nas técnicas de estudo e nos equipamentos utilizados tem possibilitado a realização de novas abordagens. As técnicas citogenéticas moleculares, como a hibridização *in situ* (FISH) e o bandamento com endonucleases de restrição proporcionaram conhecimentos mais aprofundados sobre a biologia e sistemática desses vetores (BARDELLA et al., 2010).

As endonucleases de restrição são capazes de reconhecer sequências específicas de DNA e clivar a dupla hélice, formando, assim, um padrão específico de bandas que pode auxiliar na resolução de conflitos sistemáticos e filogenéticos (GOSÁLVEZ, 1997).

Dessa forma, o presente estudo analisou, por meio das endonucleases de restrição AluI (AG ↓ CT) e Hae III (GG ↓ CC), as espécies *Triatoma platensis* Neiva, 1913, *T. protacta* Ueshima, 1966 e *T. tibiamaculata* Shreiber e Pellegrino, 1950 a fim de fornecer novos dados citogenéticos, para que possam ser incorporados aos sistemas de classificação, com base no padrão de bandas produzidas pelas enzimas.

## **2 Material e métodos**

Dez exemplares machos de cada espécie foram obtidos pelo “Insetário de Triatominae”, instalado no Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Câmpus de Araraquara. Após a retirada dos testículos, os túbulos seminíferos foram separados e o material biológico foi fixado na lâmina, por meio da técnica de esmagamento celular. Para a realização da técnica de bandamento enzimático foram utilizadas as endonucleases de restrição (ERs) AluI (AG ↓ CT) e Hae III (GG ↓ CC) para acessar sequências específicas de DNA fornecendo bandas características. A quantidade de 1 µl da enzima de restrição foi adicionada a 9 µl de solução tampão e diluídos em 80 µl de água mili-Q. Dessa solução, foram aplicados 33 µl sobre a lâmina previamente tratada e incubada, por 12 horas, em câmara úmida à 37° C. O conjunto lâmina-lamínula foi montado com bálsamo do Canadá para a observação em microscópio de luz Jenaval (Zeiss), acoplado à câmera digital e ao sistema analisador de imagens *Axio Vision LE 4.8* (Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H), com aumento de 1000 vezes.

### **3 Resultados**

#### **3.1 *T. protacta***

##### **3.1.1 Alu I**

Foi possível observar no núcleo poliploide um único corpúsculo heteropicnótico (Figura 1A). Tanto a prófase I final (Figura 1B), quanto na metáfase I (Figura 1C) apresentaram sinais de digestão nos autossomos com a formação de bandas intersticiais e teloméricas (Figura 1C) . Os cromossomos sexuais não apresentaram sinais da digestão (seta, Figura 1C). A análise da metáfase (Figura 1B) também permitiu confirmar o cariótipo da espécie, a saber,  $2n = 23 (20A + X1X2Y)$ .

##### **3.1.2 Hae III**

O núcleo poliploide apresentou um único corpúsculo heteropicnótico (Figura 1D). A cromatina ao redor do corpúsculo foi digerida pela enzima (seta). O núcleo em prófase I (Figura 1E) apresentou um cromocentro (estrela) e regiões na cromatina digeridas pela enzima (setas). Os cromossomos sexuais, exibidos no núcleo em metáfase I, não apresentaram sinais de digestão enzimática (seta, figura 1F). Os cromossomos autossomos exibiam sinais da ação enzimática em regiões intersticiais, principalmente (ponta de seta, figura 1F)

#### **3.2 *T. platensis***

##### **3.2.1 Alu I**

No núcleo poliploide, foi possível observar um grande corpúsculo heteropicnótico e muitos corpúsculos menores (Figura 2A). Nos núcleos em metáfase I (Figura 2B), metáfase lateral (Figura 2C) e metáfase II (Figura 2D) foi possível observar sinais de digestão pela enzima indicada pelas pontas de setas. Além disso, foi

possível confirmar o cariótipo da espécie, a saber,  $2n = 20A + XY$  e demonstrar que o cromossomo Y é maior e mais heteropicnótico em relação ao X (setas) não apresentando sinais de ação enzimática.

### **3.2.2 Hae III**

No núcleo poliploide, foi possível observar um grande corpúsculo heteropicnótico e muitos corpúsculos menores (Figura 2E). Os núcleos em prófase I inicial (Figura F e G) apresentaram um grande cromocentro representado pelos cromossomos sexuais (estrelas). Além disso, foi possível observar áreas da cromatina digeridas pela enzima (setas, F-I). No núcleo em final de prófase I (diplóteno/diacinese) (Figura 2H) foi possível observar um grande cromocentro (estrela) e sinais de digestão intersticiais e terminais nos autossomos (setas). O núcleo metafásico apresentou os 2 cromossomos sexuais heteropicnóticos (Figura 2I, estrela) e autossomos digeridos, principalmente na região terminal (setas).

## **3.3 *T. tibiamaculata***

### **3.3.1 Alu I**

O núcleo poliploide foi visualizado em diferentes tamanhos (Figura 3A, B). Ambos apresentaram um único corpúsculo heteropicnótico, contudo, em núcleos menores a região de cromatina ao redor do corpúsculo foi digerida. Por meio da análise da metáfase I, foi possível confirmar o cariótipo da espécie,  $2n = 23 (20A + X1X2Y)$ . A digestão enzimática foi evidenciada em regiões intersticiais e teloméricas (setas, figura 3C) e nos sexuais (ponta de seta, figura 3C).

### 3.3.2 Hae III

O núcleo poliploide apresentou um único corpúsculo heteropicnótico (Figura 3D). Além disso, ao redor do corpúsculo foi possível observar uma região da cromatina digerida pela enzima. O núcleo em prófase inicial apresentou um cromocentro heteropicnótico (Figura 3E, estrela) e regiões da cromatina digeridas (setas). Durante a metáfase, os cromossomos sexuais apresentaram sinais fracos de digestão (Figura 3F).

## 4. Discussão

Análises citogenéticas clássicas têm contribuído na classificação dos triatomíneos (ALEVI et al., 2012). Contudo, novas abordagens comparativas são necessárias, uma vez que esses organismos são agrupados, principalmente, por dados morfológicos.

As endonucleases de restrição permitem um conhecimento mais detalhado da heterogeneidade da cromatina, uma vez que digerem regiões específicas do material genético (GONSALVEZ et al., 1987).

As espécies *T. protacta*, *T. platensis* e *T. tibiamaculata* foram analisadas pelas duas endonucleases Alu I e Hae III. Os núcleos poliploides de *T. protacta* e *T. tibiamaculata* apresentaram uma região da cromatina digerida pela enzima Hae III. Essa característica também foi observada por Tartarotti e Azeredo-Oliveira (2000), utilizando a mesma enzima na espécie *P. megistus*.

A análise da prófase em todas as espécies permitiu observar que a cromatina foi digerida pela enzima Hae III. Além disso, todas apresentaram um cromocentro representando os cromossomos sexuais que se mostrou altamente heteropicnótico. *P.*

*megistus* também apresentou regiões da cromatina digerida quando tratada com Alu I (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 2000).

Na espécie *T. protacta* foram observados blocos heterocromáticos em ambas as extremidades de todos os autossomos e nos cromossomos sexuais (PANZERA et al., 2012). Essa característica nunca tinha sido observada em triatomíneos, pois em ambas as espécies analisadas, por meio de endonucleases de restrição, não ocorreu digestão dos cromossomos sexuais.

A espécie *T. platensis* apresentou blocos heterocromáticos em uma ou ambas as extremidades dos três maiores pares de autossomos e os cromossomos sexuais mostraram-se totalmente heterocromáticos (PANZERA et al., 2012). Contudo, é possível diferenciar os cromossomos sexuais, pois o cromossomo Y é maior que o X. Já, a espécie *T. tibiamaculata* apresenta heterocromatina constitutiva na região terminal de alguns autossomos (PANZERA et al., 2012). Por meio do tratamento com as enzimas Alu I e Hae III, ocorreu digestão nos cromossomos com formação de bandas tênues intersticiais e telométicas.

A disposição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos é considerada uma forma de proteção para o material genético. Em *P. megistus* e *P. herreri*, Tartarotti e Azeredo-Oliveira (2000) propõem que a disposição dos blocos heterocromáticos nos cromossomos, em conjunto com a compactação do material genético na fase da meiose, impede a ação das endonucleases. *T. protacta* e *T. tibiamaculata* corroboram essa hipótese, pois seus autossomos mostraram-se altamente compactados e a enzima digeriu regiões desses cromossomos de forma tênue. Entretanto, *T. platensis*, quando tratado com Hae III apresentou de forma nítida cromossomos digeridos nas regiões terminais e intersticiais.

As espécies analisadas são classificadas em três complexos diferentes, ou seja, *T. protacta* no complexo Protracta (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), *T. platensis* no subcomplexo Infestans (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), e *T. tibiamaculata*, *a priori*, classificado no subcomplexo Brasiliensis (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), entretanto Alevi et al. (2012) forneceram novos dados referentes a classificação e, atualmente, o organismo apresenta a classificação indefinida.

Assim, o presente trabalho descreveu o padrão de digestão das enzimas Alu I e Hae III e, com isso, permitiu ampliar o conhecimento da estrutura cromossômica da subfamília Triatominae. Embora novas espécies devam ser analisadas com essa técnica citogenética, esses dados mostraram-se importantes, uma vez que as três espécies analisadas são classificadas em complexos/subcomplexos diferentes e apresentaram diferentes padrões de digestão das endonucleases. Além disso, foram fornecidos novos dados sobre a espécie *T. tibiamaculata* que apresenta sua classificação indefinida.

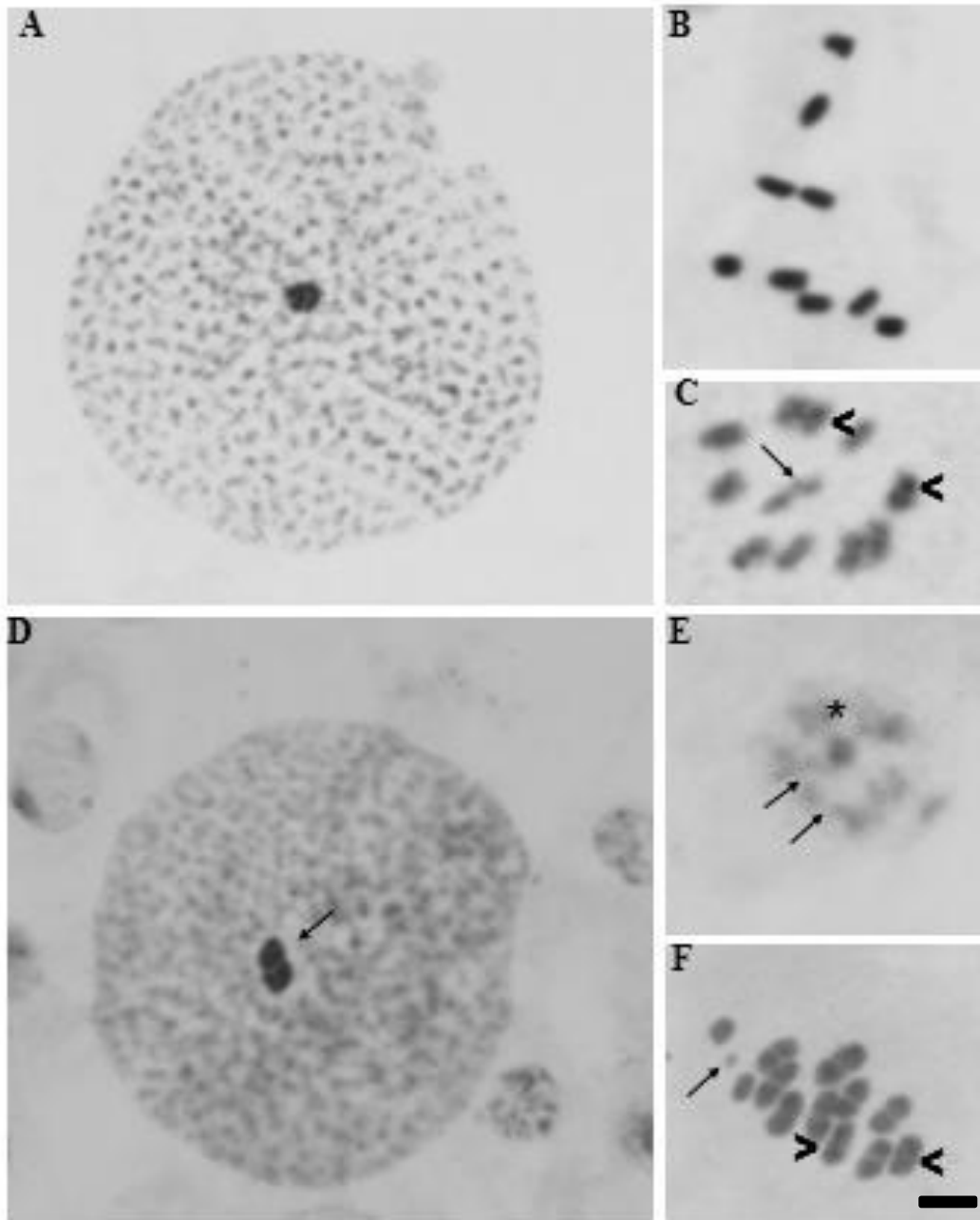


Figura 01: *Triatoma protacta*. A-C (Alu I). Núcleo poliploide com um único corpúsculo heteropicnótico. A metáfase I apresentou sinais de digestão nos autossomos (ponta de seta, B) e não digestão nos sexuais (seta, C). D-E (Hae III). Núcleo poliploide com um único corpúsculo heteropicnótico (seta, D). Cromocentro (estrela, E) e regiões menos digeridas da cromatina foram encontradas em núcleos em prófase I (setas, E). Ausência de digestão nos cromossomos sexuais (seta, F) e digestão nos autossomos (ponta de seta, F). Barra: 10 $\mu$ m.

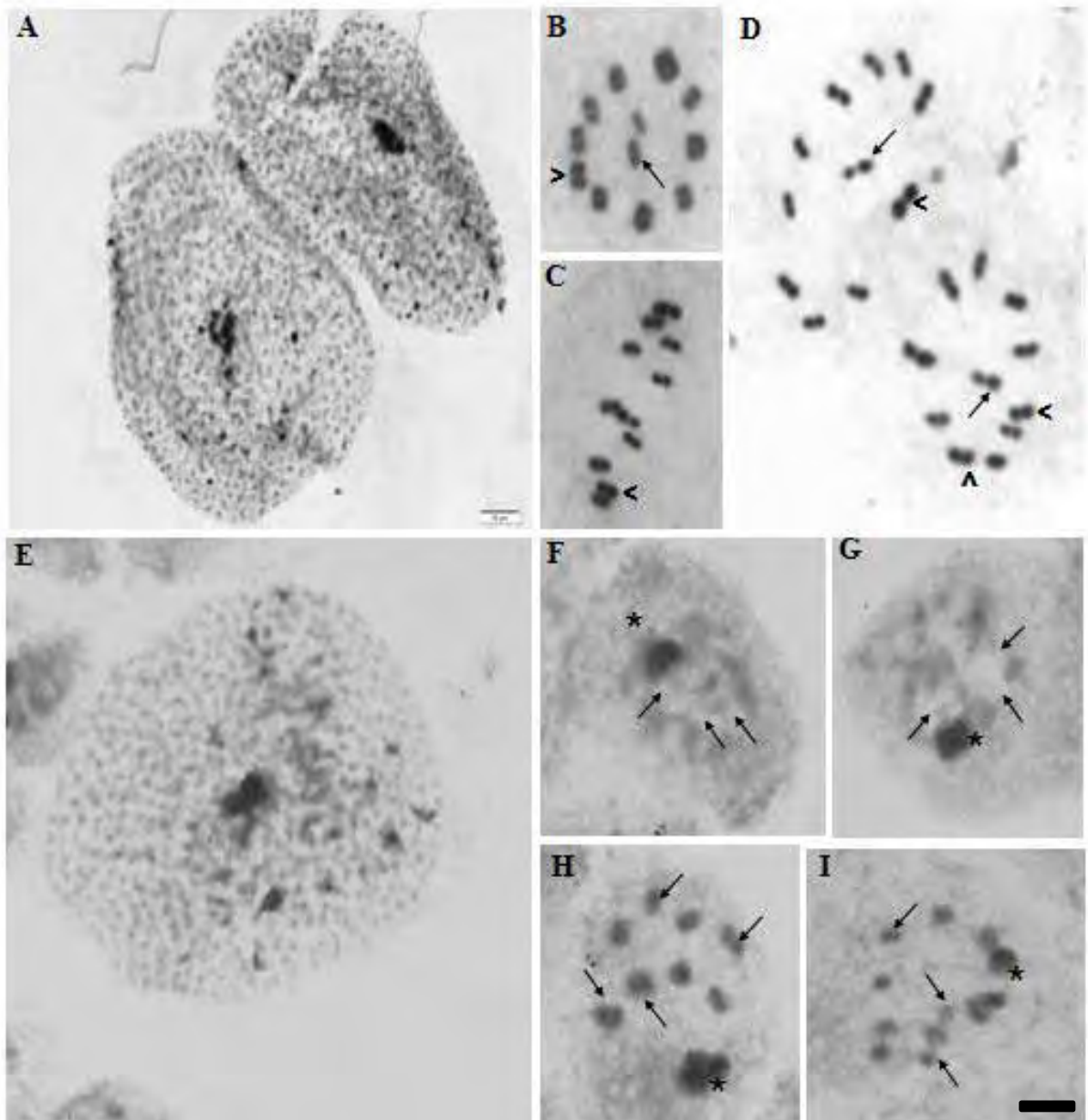


Figura 02: *Triatoma platensis*. A-D (Alu I). A digestão em núcleos interfásicos evidenciou um grande corpúsculo heteropiconótico e outros menores (A). Em metáfases I e II é evidenciada a ação da endonuclease (ponta de seta, B-D). Nos sexuais é visível maior nível de heteropiconose nos cromossomo Y (setas, B e D). E-F (Hae III). Núcleo poliploide com grande corpúsculo heteropiconótico e outros menores (E). Regiões cromocêntricas (estrelas, F-I). Barra: 10µm.

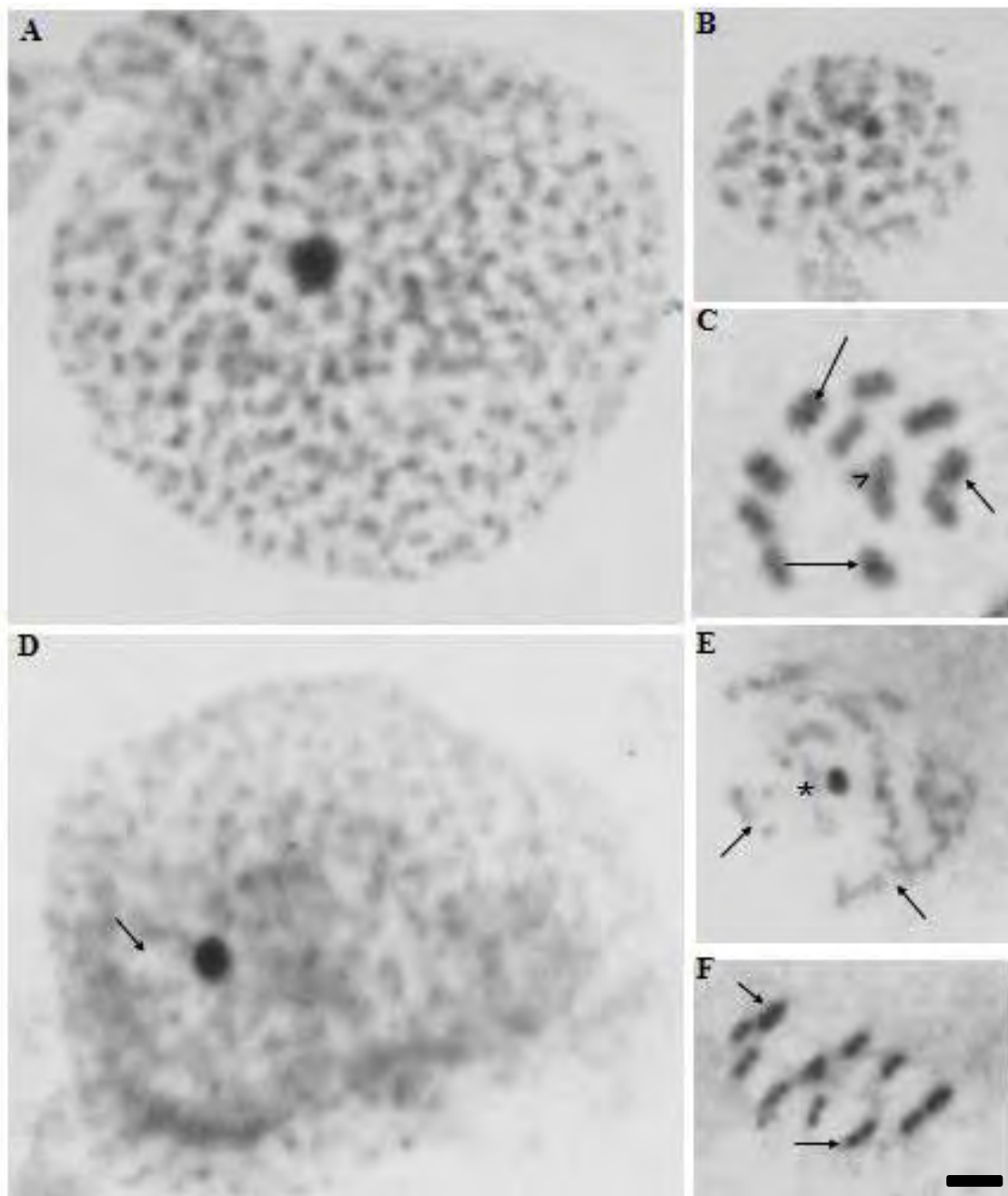


Figura 03: *Triatoma tibiamaculata*. A-C (Alu I). D-F ( Hae III). Os núcleos poliploides apresentaram um único corpúsculo heteropicnótico tanto no tratamento com Alu I (A) e Hae III (D). Em cromossomos metafásicos é possível verificar a digestão enzimática em regiões intersticiais (seta, C). O núcleo em prófase inicial quando tratado com a enzima HaeI II apresentou um cromocentro heteropicnótico (estrela, E) e regiões da cromatina digeridas (setas, E). Barra: 10 $\mu$ m.

## **Referências bibliográficas**

ALEVI, K.C.C., MENDONÇA, P.P., PEREIRA, N.P., ROSA, J.A., AZEREDO-OLIVEIRA, 2012a. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652-1653, 2012.

BARDELLA, V., GAETA, M., VANZELA, A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). **Comparative Cytogenetics**, V.4, p. 141-149, 2010.

GOSÁLVEZ, J., LÓPEZ-FERNANDEZ, C., GOYANES, V. MEZZANOTTE, R. Chromosome differentiation using nucleases: an overview. **Chromosomes Today**, v. 12, p. 23-49, 1997.

LENT, H., WYGODZINSKY, P., Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p.123-520, 1979.

PANZERA, F., PÉREZ, R., HORNOS, S., PANZERA, Y., CESTAU, R., DELGADO, V., NICOLINI, P. Chromosome numbers in Triatominae (Hemíptera-Reduviidae): A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p.515-518, 1996.

PANZERA, Y., PITA, S., FERREIRO, M.J., FERRANDIS, I., LAGES, C., PÉREZ, R., SILVA, A.E., GUERRA, M., PANZERA, F. High dynamics of rDNA cluster location

in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). **Cytogenetics Genome Research**, v.138, p. 56-67, 2012.

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

SEVERI-AGUIAR, G.D.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cytogenetic Study of Holocentric Chromosomes in Three Species of Triatomines (Heteroptera, Reduviidae). **Cytologia**, v. 69, n. 1, p. 53-57, 2004.

SCHOFIELD, C.J., GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica**, v. 110, p. 88-100, 2009.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Restriction endonuclease banding and digestion resistant heterochromatin in triatomines, genus *Panstrongylus*, **Caryologia**, v. 53, p. 235-243, 2000.

TAVARES, M.G., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Pattern of nucleolar activity during spermiogenesis in triatomines. **Cytobios**, v. 89, p. 93-103, 1997.

### 4.3 - Artigo 03

## Identificação da proteína nucleolar fibrilarina na composição de corpos cromatoides durante a diferenciação de células espermatogênicas em Triatomíneos (Hemiptera, Triatominae)

ADAUTO DE OLIVEIRA BORGUETI<sup>1</sup>, ROSANA SILISTINO-SOUZA<sup>1</sup> E MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO-OLIVEIRA<sup>1</sup>.

1. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. Departamento de Biologia, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

### RESUMO

Os triatomíneos, insetos estritamente hematófagos, atuam como vetores da doença de Chagas. Tal afecção tem preocupado as autoridades de saúde pública, uma vez que esses insetos tem apresentado crescente capacidade de adaptação intradomiciliar aliado ao sucesso reprodutivo do grupo. Portanto, estudos que visem ampliar o entendimento sobre a biologia reprodutiva deste grupo de insetos são extremamente relevantes. Inúmeras proteínas têm sido investigadas por atuarem na biologia de reprodução desses insetos. A proteína nucleolar fibrilarina é responsável por inúmeras funções, dentre elas, atuar no metabolismo de pré-rRNA e, assim, participar do processo de diferenciação das células germinativas. Foi objetivo no presente estudo localizar a proteína fibrilarina em corpos cromatoides, estrutura citoplasmática dotada de inúmeras proteínas, dos túbulos seminíferos de *Triatoma platensis* e *T. rubrovaria*, por meio de técnicas de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão. A análise do material histológico sugeriu a presença de corpos cromatoides em espermátides e espermatogônias das espécies analisadas com imunoreatividade para a proteína fibrilarina em ambas as espécies.

**Palavras-chave:** *Triatoma platensis*, *T. rubrovaria*, corpo cromatoide, fibrilarina, espermatogênese

## **ABSTRACT**

The triatomine insects strictly hematophagous, act as vectors of Chagas disease, this disease has worried public health officials, since these insects have shown increased adaptability household ally reproductive success of the group. Numerous proteins have been investigated for acting on reproductive biology of these insects. The nucleolar protein fibrillarín is responsible for many functions, among them, act on germ cell differentiation. Objective of this study was to locate the protein in fribilarina cromatoides bodies, cytoplasmic structure endowed with numerous proteins, seminiferous tubules of *Triatoma platensis* and *T. rubrovaria* through immunofluorescence and transmission electron microscopy. The analysis of histological material suggested the presence of bodies cromatoides in spermatids and spermatogonia of the analyzed species with immunoreactivity for protein fibrillarín in both species.

**Keywords:** *Triatoma platensis*, *T. rubrovaria*, chromatoid body, fibrillarín, spermatogenesis

## 1. Introdução

Os triatomíneos, insetos hematófagos estritos em todas as fases da vida, pertencem à subfamília Triatominae (Hemiptera – Reduviidae). São importantes vetores do protozoário *Trypanosoma cruzi* que, na espécie humana, ocasiona a tripanossomíase americana conhecida como doença de Chagas. Entretanto, sua importância não se limita aos aspectos médicos sanitários, sendo importante para estudos de outras ordens (BELLINI, 2012).

A espécie *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843, cuja área de distribuição abrange a Argentina, Uruguai e sul do Brasil (LENT; WYGODZINSKY. 1979), em específico, Rio Grande do Sul (ALMEIDA, et al., 2002), é um transmissor potencial do *T. cruzi*. Trata-se de uma espécie com hábitos generalistas, alimentando-se de vários vertebrados, incluindo o homem (MARTINS et al., 2008). Estudos revelam que a grande variabilidade intraespecífica detectada tornou-o um invasor potencial intradomiciliar e, conseqüentemente, um vetor apropriado para a transmissão da doença de Chagas (PACHECO et al., 2008).

A espécie *Triatoma platensis* Neiva 1913, também utilizada no presente estudo, com área de distribuição conhecida na Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai foi notificada em um primeiro registro para o Brasil na cidade de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (SALVATELLA, 1991). O aumento da invasão intradomiciliar e peridomiciliar está diretamente ligado ao sucesso reprodutivo dessas espécies. Assim, estudos que investiguem mecanismos reprodutivos, em especial, as linhagens reprodutivas, são importantes meios para ampliar o conhecimento já existente e subsidiar novas análises.

Estudos voltados para os aspectos reprodutivos em triatomíneos têm sido desenvolvidos e, em particular, pode-se destacar pesquisas que procuram detectar a expressão e função de determinadas proteínas que estão relacionadas, direta ou

indiretamente, com a progressão das células germinativas através da meiose, o que culminaria com a diferenciação de células germinativas. Estudos deste tipo têm sido empregados tanto durante a espermatogênese quanto durante a oogênese, sendo que um enfoque especial tem sido dado às demais estruturas relacionadas a biologia da reprodução, como o corpo cromatoide.

O corpo cromatoide, estrutura citoplasmática, localizado estrategicamente em território próximo ao envoltório nuclear, participa do estoque de RNAs que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas específicas que atuam na diferenciação dos espermatozoides. Tal estrutura, de natureza macromolecular, participa, ainda de inúmeras funções, tais como, controle pós transcricional em células germinativas haploides, destino de RNAm (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007), direcionamento de mitocôndrias nas espermátides, auxílio na formação do acrossomo, da bainha mitocondrial e do flagelo do espermatozoide (PERUQUETI et al., 2008, 2012).

A biogênese do corpo cromatoide é ainda um processo não totalmente conhecido. Acredita-se que a desfragmentação do nucléolo possa estar relacionada com a formação do corpo cromatoide, contudo, suas funções e composição proteica têm sido largamente analisadas em diferentes grupos de seres vivos (PERUQUETI et al., 2008, 2012b; SILISTINO-SOUZA et al., 2012). Inúmeras proteínas fazem parte do corpo cromatoide, indicando sua multifuncionalidade. Entre as proteínas que já foram identificadas como fazendo parte da composição molecular do corpo cromatoide, podemos destacar a proteína nucleolar fibrilarina.

Segundo Barigyna (2010), a fibrilarina é uma proteína evolutivamente conservada e obrigatória em nucléolos de células eucarióticas. É um dos principais componentes que constituem o nucléolo. Sobre a descoberta, composição e os seres onde são encontradas, Maden e Hughes (1997), relatam que se trata de uma proteína

ácida com peso molecular de 34,000-38,000 e inicialmente identificada como B36 em *Physarum polycephalum* (CHRISTENSEN et al., 1977). Desde então, ela foi detectada em vários tipos celulares, em plantas (MAKIMOTO et al., 2006), ratos (NEWTON et al., 2003; PERUQUETI et al., 2008), insetos (SILISTINO-SOUZA et al., 2012) e também em vírus (MELÉN et al., 2012).

A fibrilarina é especificamente localizada no componente fibrilar denso (CFD) do nucléolo e associada a pequenos RNAs nucleolares (snoRNA). A metilação dos precursores de rRNA tem sido sugerida para explicar o importante papel da fibrilarina na maturação de ribossomos em vertebrados (MADEN; HUGHES, 1997).

Assim, diversas técnicas têm sido propostas para a análise *in vivo* de proteínas, incluindo a fibrilarina, em diferentes organismos vivos. O foco, nos diferentes estudos, varia desde a expressão de genes ou a localização dos mesmos - por meio de marcadores fluorescentes - análises com uso de microscopia de varredura a até microscopia confocal a *laser* com interesse em células vivas (ROYEN et al, 2009).

O objetivo do presente estudo foi identificar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina no corpo cromatoide de células espermatogênicas dos folículos testiculares de triatomíneos, por meio da técnica de imunofluorescência indireta e de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esse foco de estudo será importante para ampliar os conhecimentos da biologia da reprodução desses insetos hematófagos, que recentemente apresentam uma crescente capacidade de adaptação intradomiciliar, propiciando, assim, a propagação da doença de Chagas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Insetos**

No presente estudo foram utilizadas duas espécies de triatomíneos, *Triatoma rubrovaria* (Figura 1B) e *Triatoma platensis* (Figura 1A), que taxonomicamente incluem a ordem Hemiptera e subordem Heteroptera, dentro da família Reduviidae e subfamília Triatominae (QUARESMA; WYGODZINSKY, 1979). Dez exemplares machos de cada espécie, não infectados pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, foram obtidos do insetário do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP/Araraquara – SP, Brasil.

### **2.2 Dissecção dos insetos**

Inicialmente os insetos foram eterizados e fixados com alfinetes pela região posterior do cefalotórax (escutelo), em placa de Petri contendo parafina sólida. Para facilitar o acesso aos testículos, as asas e os membros locomotores foram retirados com o auxílio de uma pinça. Sob o microscópio estereoscópico, as laterais do abdome e os tecidos conexivos foram cortados com uma tesoura pontiaguda. A região antero-dorsal no exoesqueleto abdominal foi parcialmente retirada expondo o interior da região abdominal. A fim de prosseguir com a retirada testicular, foi gotejada solução fisiológica (Demerec) sobre o abdome exposto e foram retirados os testículos localizados na porção anterior do hemocelo. Os testículos foram transportados para uma lâmina contendo uma gota de solução fisiológica para a limpeza e isolamento dos túbulos seminíferos.

### **2.3 Processamento das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Os folículos testiculares de triatomíneos adultos foram colocados em glutaraldeído 3% e solução de ácido tânico 0,25% em tampão *Milloning*, pH 7,3, durante 3 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os folículos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. O material foi desidratado em série de acetonas ascendentes (30-100%) e incluídos em Araldite.

Para a análise, por meio de MET, foram realizados cortes de 0,5 $\mu$ m obtidos no ultramicrótomo (RM 2265 ReichertUltracut; Leica, Áustria) e corados em Azul de Toluidina a 1%, em solução de bórax a 1% (TAAB Laboratories, UK). Em seguida, cortes de 50nm foram realizados e coletados em *grids* e, posteriormente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os resultados das análises de MET foram fotodocumentados em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906 do Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP).

### **2.4 Processamento das amostras para imunofluorescência**

Os túbulos seminíferos dissecados foram fixados em glutaraldeído a 2% e em paraformaldeído a 2%, diluídos em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4, por 24 horas, a 4°C. Para inclusão em LRGold (Sigma) os fragmentos após fixação foram lavados em tampão fosfato a 0,1 M pH7,4, por 30 minutos, na temperatura de 4°C, em seguida, desidratados em metanol em uma série crescente, a temperatura de -20°C. Após, foram pré-infiltrados em resina e metanol por 24 horas, e, depois, imersos em resina pura, por 24 horas, e incluídos em LRGold, por 24 horas, a -20°C, sob luz ultravioleta.

Para a análise histológica ao microscópio de fluorescência, cortes de 0,5  $\mu\text{m}$  foram obtidos no ultramicrótomo (RM 2265 ReichertUltracut; Leica, Áustria) e, posteriormente, corados em Azul de Toluidina a 1%, em solução de bórax a 1% (TAAB Laboratories, UK). Em seguida, cortes de 1 $\mu\text{m}$  foram obtidos, com auxílio do mesmo equipamento, para a reação de imunofluorescência e, posterior, detecção da fibrilarina.

## **2.5 Reação de imunofluorescência**

A reação de imunofluorescência foi utilizada para detectar a expressão da proteína nucleolar fibrilarina nas células espermatogênicas dos túbulos seminíferos de triatomíneos durante o processo de espermatogênese. Cortes de 1  $\mu\text{m}$  foram incubados com albumina sérica bovina a 0,1% em PBS com soro normal a 3% por 1 hora, para bloqueio de ligações não específicas de IgG. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo antifibrilarina *overnight*; após três lavagens em PBS, por 5 minutos cada, as lâminas foram incubadas em anticorpos secundários marcados com DAPI e ALEXA FLUOR, em câmara escura por 1 hora. As lâminas foram, então, lavadas três vezes em PBS e montadas com solução de glicerol em PBS a 90%. Após a reação, as lâminas foram estocadas a 4°C, em câmara escura, e analisadas ao microscópio de fluorescência, no Centro de Microscopia e Microanálise (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, SP).

## **3 Resultados**

### **3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A análise do material submetido à microscopia eletrônica de transmissão sugeriu a presença de corpos cromatóides (Figura 3B e 3D) em células dos túbulos seminíferos das espécies analisadas, sugerindo sua origem a partir da fragmentação nucleolar

(Figura 2A e 2C) e migração de material do núcleo para citoplasma (Figura 3A e 3B), mostrando que o transito desse material ocorre através do prolongamento do envoltório nuclear durante a passagem do corpo cromatoide (setas, Figura 3A e 3B).

### **3.2 Localização da proteína nucleolar fibrilarina em células espermatogênicas**

A proteína nucleolar fibrilarina (B36) foi detectada em espermatogônias (Figura 4A e 4C) e em espermátides (Figuras 5A e 6A), de folículos testiculares das espécies *T. rubrovaria* e *T. platensis*, por meio da reação de imunofluorescência. As células espermatogênicas apresentaram uma evidente imunorreatividade para fibrilarina no núcleo em regiões nucleolares, no citoplasma e próximo ao envoltório nuclear, provavelmente, em corpos cromatoides. (Figuras 4-6).

## **4 Discussão**

A imunodeteção da proteína nucleolar fibrilarina no citoplasma de células espermatogênicas, durante a espermatogênese de *T. rubrovaria* e *T. platensis*, especificamente, sugere sua participação na composição molecular de corpos cromatoides, uma estrutura citoplasmática que desempenha papéis relevantes durante a espermatogênese e que, provavelmente, é derivada da fragmentação nucleolar. O conhecimento dos constituintes moleculares do corpo cromatoide pode auxiliar na compreensão do papel fisiológico desta organela em células espermatogênicas de triatomíneos. Segundo Silistino-Souza et al. (2012) outras importantes proteínas fazem parte da composição do corpo cromatoide.

É a primeira vez que essa proteína nucleolar foi detectada em corpos cromatoides das espécies *T. platensis* e *T. rubrovaria*. A detecção de fibrilarina no citoplasma de células espermatogênicas nesses insetos hematófagos é de grande importância, pois amplia os conhecimentos sobre o papel da fibrilarina e a função do

corpo cromatoide, além de contribuir para a caracterização da biologia reprodutiva destas espécies. Newton (2003) induziu mutações em genes de ratos que envolviam a expressão de fibrilarina. Os animais homozigóticos para a mutação eram inviáveis, e a apoptose em massa ocorria em embriões -/-, mostrando que fibrilarina é essencial para o desenvolvimento. Korcekova (2012) em análise de proteínas nucleolares também relacionou a fibrilarina como proteína responsável pela ação formativa de células embrionárias, espermatogênicas e oogênicas, em nematoides.

A compreensão dos mecanismos de maturação de linhagens germinativas e de proteínas nucleolares tem levado ao desenvolvimento de vários estudos, incluindo diversas proteínas nucleares em diferentes organismos (SASANO et al., 2008). Assim, a fibrilarina não é uma exclusividade de linhagens germinativas dos metazoários. Makimoto et al., (2006) realizaram estudos em linhagens celulares de tabaco (BY -2 cells). Cerdido e Medina (1995) detectaram a fibrilarina nucleolar em células de cebola. Nesses estudos, a fibrilarina estava relacionada com a reorganização nucleolar durante a telófase.

Estudos revelam que fibrilarina não é uniformemente distribuída, isto é, aumenta sua expressão quando aumenta a atividade nucleolar em G2, e, provavelmente, diminui quando a atividade nucleolar é reduzida durante a diferenciação (CERDIDO; MEDINA, 1995).

Melén et al., (2012) em análise *in vitro* do vírus humano influenza A, vírus humano, *in vitro*, analisou o papel da fibrilarina e da nucleolina no trânsito de proteínas virais, como o fator de virulência NS1, que é orientado para o núcleo da célula, citoplasma, e nucléolo. O fator de virulência NS1 é uma proteína multifuncional que inibe a transformação de células hospedeiras de pré-mRNA e neutraliza as respostas das células hospedeiras antivirais. Assim, verificou-se que as proteínas nucleolina e

fibrilarina servem como um sinal de localização nuclear (NOLS) interagindo com as proteínas virais e atuando, assim, como fontes de localização da expressão viral.

Diversos estudos de natureza não epidemiológica podem contribuir para a diminuição em números de casos de doenças infectocontagiosas (PACHECO et al., 2008) fornecendo dados, como os focos de localização e dinâmica reprodutiva desses insetos, aos programas de combate à essas moléstias. Desse modo, o presente estudo contribuiu com informações sobre a proteína fibrilarina no corpo cromatoide dos túbulos seminíferos de espécies triatomíneas, vetores da doença de Chagas, fornecendo informações sobre a localização e função dessa proteína, acrescentando novos dados sobre a biologia da reprodução desses insetos.



Figura 01. *Triatoma platensis* (A) e *Triatoma rubrovaria* (B).

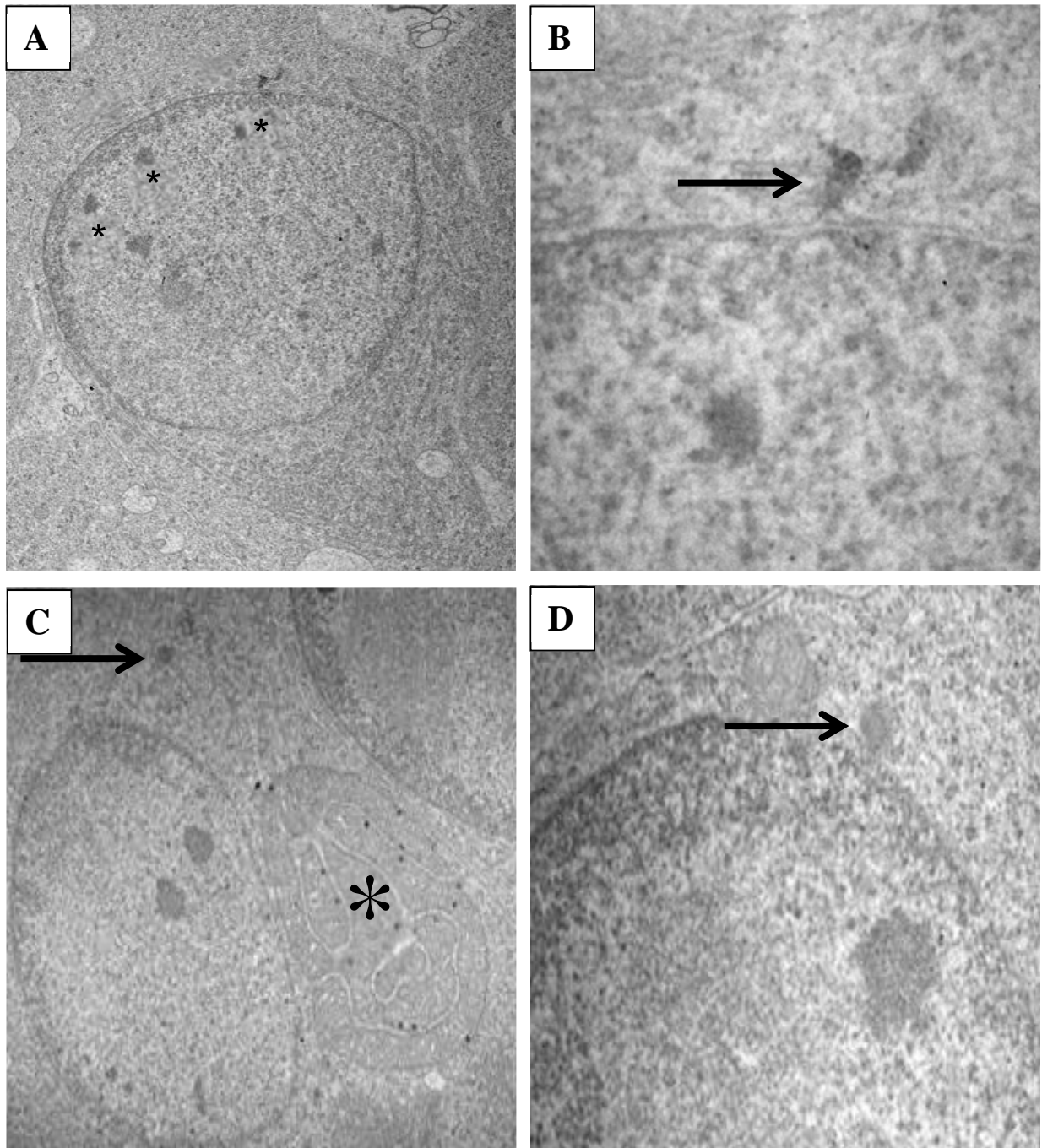


Figura 02. Ultraestrutura do túbulo seminífero de *Triatoma platensis*. Observar possível fragmentação nucleolar (\*) e a migração de material do núcleo para citoplasma, mostrado pelo prolongamento do envoltório nuclear durante a passagem do corpo cromatoide (B, seta). A figura C mostra o corpo cromatoide (seta) em espermatídes em diferenciação e derivados mitocondriais (estrela). Em D, observar o corpo cromatoide (seta). Aumento: 12 000X.

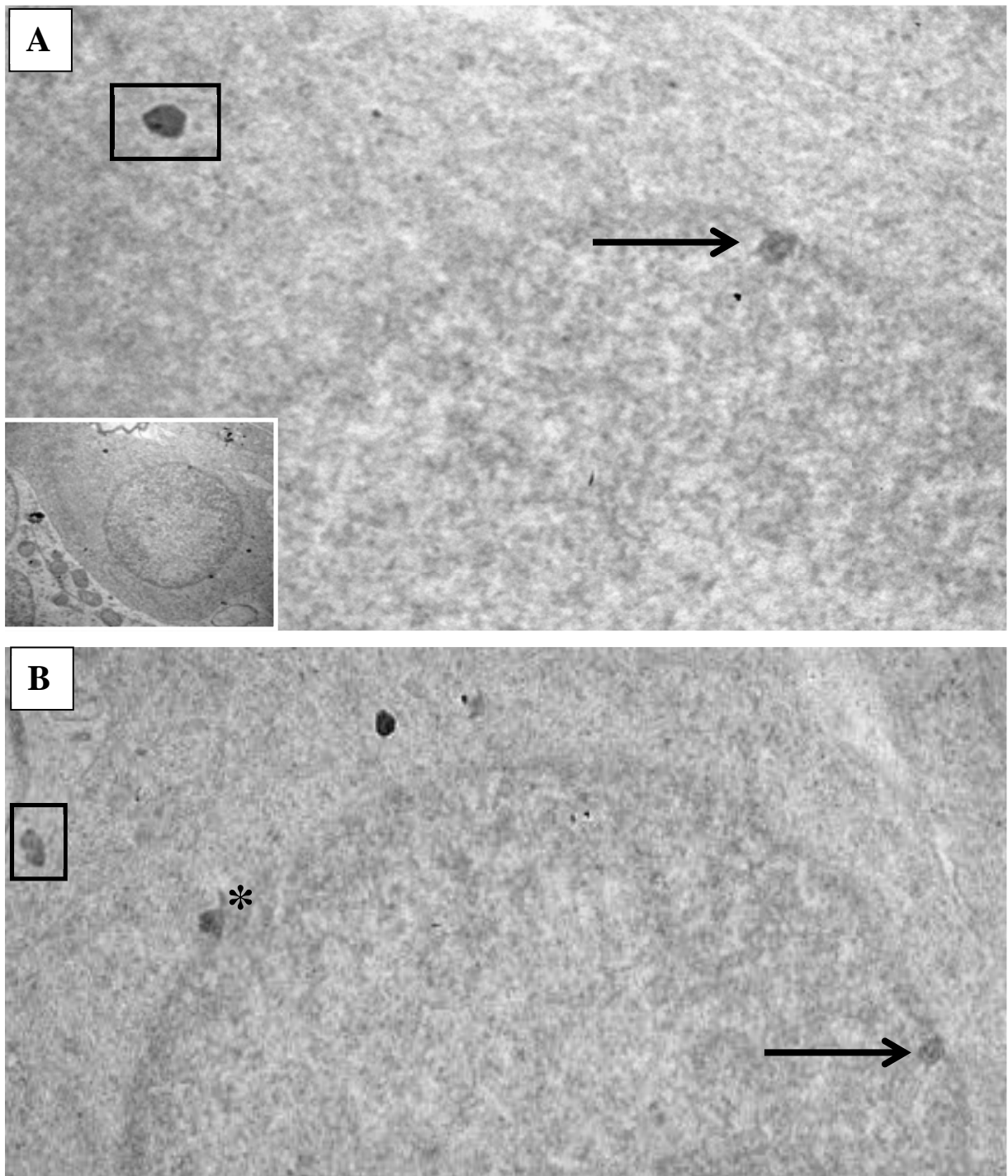


Figura 03 – Ultraestrutura do túbulo seminífero de *Triatoma rubrovaria*. Corpo cromatoide em espermatíde em processo de diferenciação. Observar o corpo cromatoide migrando do núcleo para o citoplasma (seta, A) no citoplasma (quadrado, A). A imagem B ilustra a migração do corpo cromatoide do núcleo para o citoplasma, a seta indica o CB próximo ao envoltório nuclear, (\*) a migração pelo envoltório nuclear e (quadrado) o CB já no citoplasma. Aumento: 20 000X.

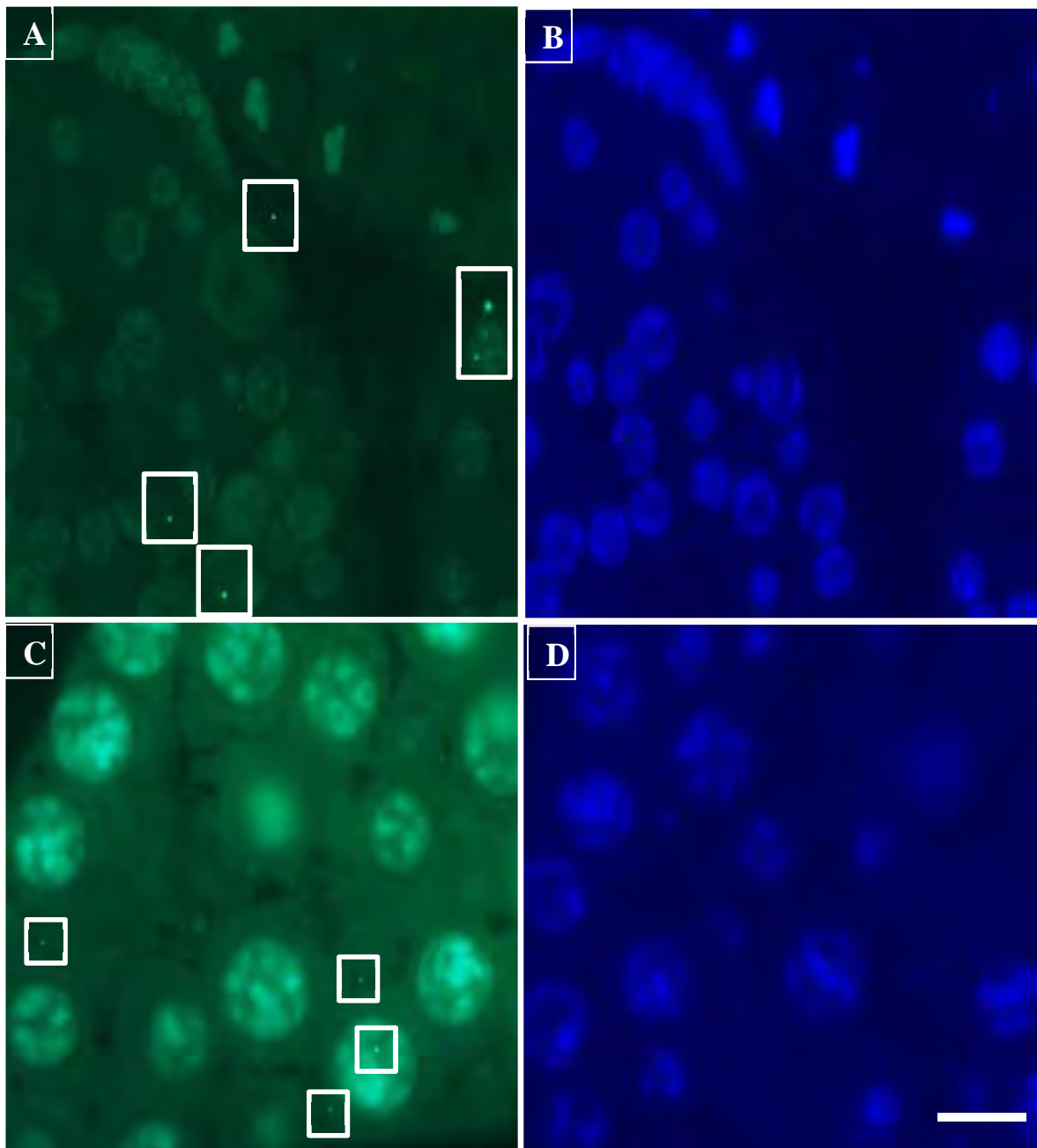


Figura 04: Identificação da proteína nucleolar fibrilarina em espermatogônias de *Triatoma rubrovaria* (A e C). Imunomarcação de fibrilarina no núcleo e citoplasma de espermatogônias (quadrados). Em C e D, controle negativo com DAPI. Célula cística (asterisco). Barras: 20 $\mu$ m.

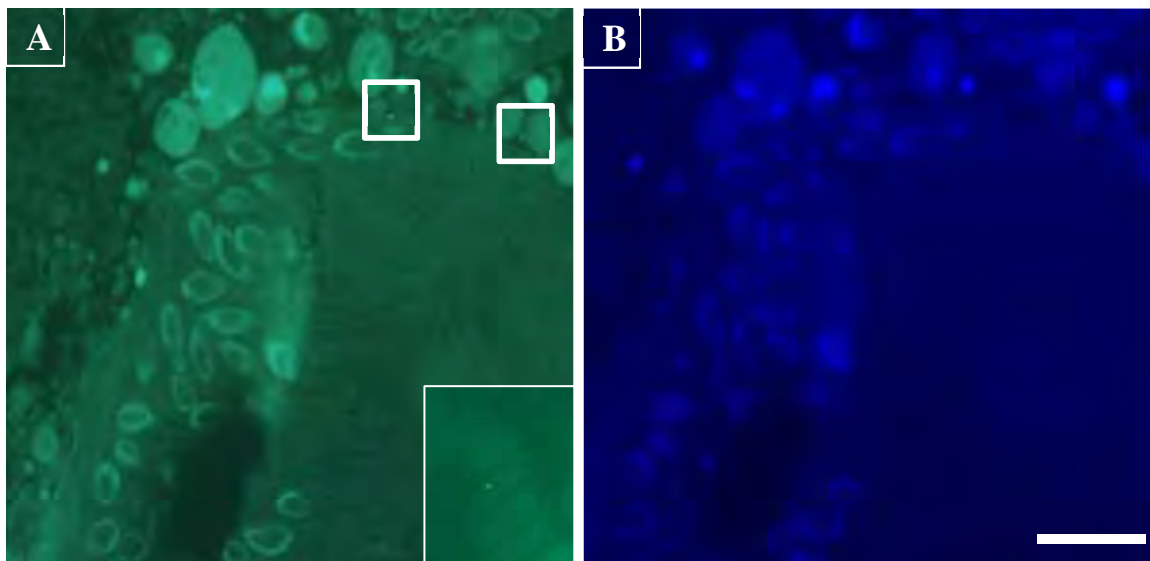


Figura 05: Imunodeteção de fibrilarina em espermátides de *Triatoma rubrovaria* (A). Marcação de fibrilarina em espermátides (quadrado). Em B, coloração com DAPI. Barras: 20 $\mu$ m.

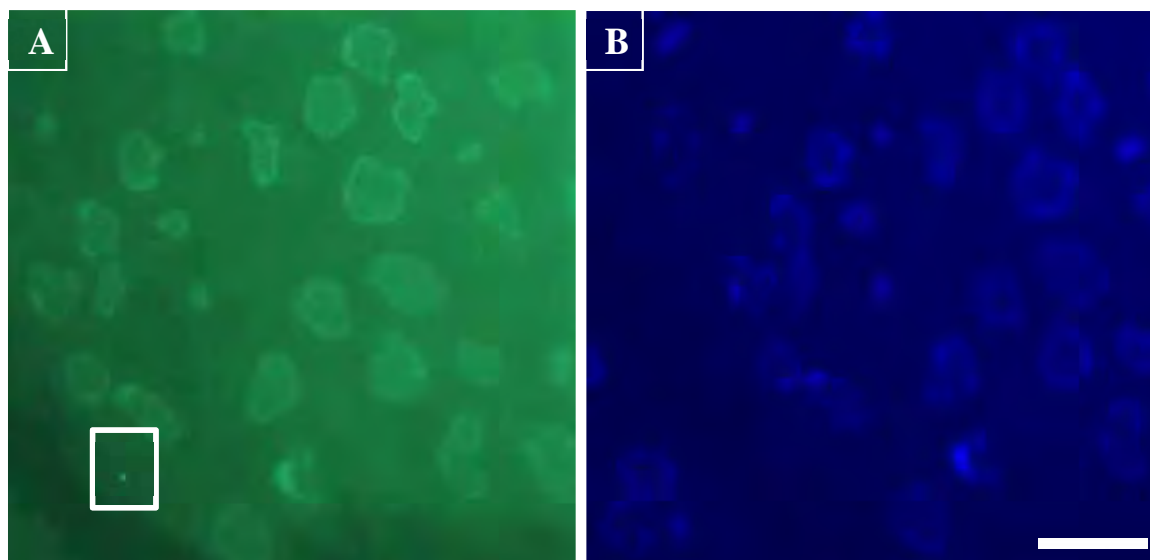


Figura 06: Análise da reação de imunofluorescência em espermátides de *Triatoma platensis*. As espermátides apresentaram imunorreatividade para fibrilarina (quadrado). Em B, coloração com DAPI. Barras: 20 $\mu$ m.

## **Referências Bibliográficas**

ALMEIDA, C.E., PACHECO R.S., NOIREAU, F., COSTA, J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: Isoenzymatic and Chromatic Patterns of Five Populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.. 97, p.829-834, 2002.

BARYGINA, V.V., VEIKO, V.P., ZATSEPINA, O.V. Analysis of nucleolar protein fibrillar mobility and functional state in living HeLa cells. **Biochemistry**, v. 75, p. 979-988, 2010.

BELLINI, M.F., SILISTINO-SOUZA, R., VARELA-GARCIA, M., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V., SILVA, A.E. Biologic and Genetics Aspects of Chagas Disease at Endemic Areas. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.1-11, 2012.

CERDIDO, A., MEDINA, F.J. Subnucleolar location of fibrillar and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. **Chromosoma**. v.103, p. :625-634, 1995.

CHRISTENSEN, M.E., BEYER, A.L., WALKER, B., LESTROURGEON, W.M. Identificationv of NG, NG-dimethylarginine in a nuclear protein from the lower eukaryote *Physarum polycephalum* homologous to the major proteins of mammalian 40S ribonucleoprotein particles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 74, p. 621–629, 1977.

KORCEKOVA, D., GOMBITOVA, A., RASKA, I., CMARKO, D., LANCTO, C.T. Nucleologenesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo. **PlosOne**, v. 7, 2012.

KOTAJA, N., SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cellspecific RNA-processing centre. **Molecular and Cellular Biology**, v.8, p.85-90, 2007.

LENT, H; WYGODZINSKY P. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard) in Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 123-529, 1979.

MADEN, B.E., HUGHES, J.M. 1997. *Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem*. **Chromosoma** 105: 391–400

MAKIMOTO, Y., YANO, H., KANETA, T., SATO, U., SATO, S. Molecular cloning and gene expression of a fibrillarlin homolog of tobacco BY-2 cells. **Protoplasma**, v. 229, p. 53-62, 2006.

MARTINS, L.P., MARCILI, A., CASTANHO, R.E., THEREZO, A.L., OLIVEIRA, J.C., SUZUKI, R.B., TEIXEIRA, M.M., ROSA, J.A., SPERANÇA, M.A. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.9, p.427-34, 2008.

MELÉN, K., TYNELL, J., FAGERLUND, R., ROUSSEL, P., VERDUN, D.H., JULKUNEN, I. Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus

and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin **Virology Journal**, v. 9, p.167, 2012.

NEWTON, K., PETFALSKI, E., TOLLERVEY, D., CÁCERES, J.F. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23. 2003.

PACHECO, R.S., ALMEIDA C.E., KLISIEWICZ, D.R., COSTA, J, PIRES M,Q., PANZERA. F., Bar ME, MAS-COMA S, BARGUES ME. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. **Parasite**, v.14, p. 231-237, 2008.

PEREIRA, J., DUJARDIN, J. P., SALVATELLA, A., TIBAYRENC., M. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. **Heredity** v. 77, p. 47-54, 1996.

PERUQUETI, R.L., TABOGA, S.R., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T,V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid bodies formation during the rat (*Ratus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v.39, p. 419-425, 2008.

PERUQUETTI, R.L; TABOGA, S.R; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Morphological changes of mammalian nucleoli during spermatogenesis and their possible role in the chromatoid body assembling. ISRN **Cell Biology**, p.1-12, 2012a.

PERUQUETTI, R.L., de MATEO, S., SASSONE-CORSI, P. *Circadian Proteins CLOCK and BMAL1 in the Chromatoid Body, a RNA Processing Granule of Male Germ Cells*. PLoS ONE 7(8): e42695. doi:10.1371/journal.pone.0042695. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0042695>. Acessado em: setembro/2012. 2012b.

ROYEN, M. E., FARLA, P., MATTERN, K. A., GEVERTS, B., TRAPMAN, J., HOUTSMULLER, A. B. **The Nucleus** (Hancock, R., ed.) Humana Press, New York, 2009.

SALVATELLA, R., BASMADJIÁN, Y., ROSA, R., MARTÍNEZ, M., MENDARO, G., CIVILA, E. 1991. Finding of *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera, Triatominae) in the Brazilian State of "Rio Grande do Sul". **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.33, p. 1-5, 1991.

SASANO, Y., HOKII, Y., INOUE, K, SAKAMOTO, H., USHIDA C, et al. Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **Biochimie**, v. 90, p. 898–907, 2007.

SILISTINO-SOUZA, R.R., PERUQUETTI, R.L. AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Chromatoid body: Remnants of nucleolar proteins during spermatogenesis in triatomine (Heteroptera, Triatominae). **Micron** 43(9):954-60, 2012.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- Dados como o número cromossômico pode ser uma ferramenta eficaz para solucionar conflitos nos atuais sistemas de classificação, conforme proposto quanto à homogeneidade cariotípica no complexo *matrogrossensis*, por meio da descrição cariotípica de *T. baratai*;
- A digestão endonucleases de restrição (ERs) produziu um padrão de bandas intraespecífico que pode auxiliar na classificação de espécies crípticas como *T. tibiamaculata* que apresenta classificação indefinida;
- Por meio das técnicas de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão foi possível identificar a presença da proteína nucleolar fibrilarina em corpos cromatoides de espermatogonias e espermatídes das espécies *T. platensis* e *T. rubrovaria*, tanto no núcleo quanto no citoplasma, corroborando o envolvimento da fragmentação nucleolar e migração desse material para o citoplasma na origem do corpo cromatoide, uma estrutura citoplasmática que desempenha papéis relevantes durante a espermatogênese.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa

São José do Rio Preto, 13/02/2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pauline Borzatti". The signature is fluid and cursive, with a large initial 'P' and a long, sweeping tail.

Assinatura