Mara Garcia Tavares

Estudo Citogenético em Espécies do Gênero Triatoma, com Ênfase à Estrutura dos Cromossomos e Região Organizadora Nucleolar

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

1910000711

MARA GARCIA TAVARES

ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES DO GÊNERO *TRIATOMA*, COM ÊNFASE À ESTRUTRA DOS CROMOSSOMOS E REGIÃO ORGANIZADORA NUCLEOLAR.

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

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

711/96

São José do Rio Preto
1996

ORIENTADORA: Profª. Drª. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira

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

À Tereza, minha mãe, que vivenciou todas as fases desta investigação, com muito carinho, interesse, estímulo e inestimável ajuda,

Dedico...

"Para todos os seres humanos constitui quase um dever pensar que o que se tiver realizado é sempre pouco em comparação com o que resta por fazer".

(João XXIII)

AGRADECIMENTOS

Reconhecer, é dar graças pelo bem que encontramos nas pessoas, coisas e circunstâncias, e não mero dever ou gentileza. Muito mais que isso, é louvar a Deus; é crer no bem acima de tudo; é trazer à evidência o mundo com beleza e amor.

Agradeço, portanto, a tudo e a todos, nas mais variadas contribuições, permitindo com que chegássemos ao final deste trabalho e, em particular,

À Profa. Dra. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira, pela amizade, entusiasmo ao transmitir seus conhecimentos, incansável dedicação, brilhante orientação e pela confiança que depositou em meu desempenho, intensificando em mim, o amor pela ciência e pela pesquisa e que, como orientadora, esteve presente em todas as etapas deste trabalho,não poupando esforços para o desenvolvimento do mesmo;

À Profa. Dra. Isabel Cristina Martins dos Santos, do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio e exemplo de mestre e pesquisadora;

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo e à profa. Satiko Nanya, pela atenção e valiosas sugestões na análise da Pro forma;

Ao Prof. Dr. James R. Colleman, pela gentileza em revisar o Summary;

Ao Prof. Dr. Wlademir João Tadei, pela atenção e orientação na parte burocrática deste trabalho;

Aos Professores do Departamento de Biologia do IBILCE, pela amizade, incentivos, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico;

Ao Prof. Dr. José S. Barata, Coordenador do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, pela autorização no fornecimento dos triatomíneos utilizados no presente trabalho. Aos funcionários desse Insetário, Sr. João Luis Molina Gil e Sr. Bento Gregório de Jesus, pela disponibilidade, eficiência e atenção com que sempre nos atenderam.

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

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelo apoio e colaboração nestes anos de convívio;

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, pela eficiência e disposição com que sempre nos atenderam;

Aos funcionários da Biblioteca do IBILCE, pela competência e dedicação no atendimento;

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação, pela agradável convivência diária e pela solidariedade nas horas alegres e nos momentos difíceis;

Aos colegas do curso de Graduação em Ciências Biológicas, com os quais convivi durante este período e que tornaram-se meus grandes amigos;

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), UNESP, pela acolhida e cessão de dependências e equipamentos necessários durante a realização deste trabalho;.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro;

Aos meus pais, Alberto e Tereza pelo imenso carinho e incentivos constantes e aos meus irmãos Lúcia, Luiz e Leila pelo apoio e grande amizade;

À Deus, por mais este objetivo alcançado.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 1
1. Aspectos biológicos e médicos-sanitários dos triatomíneos 1
2. Aspectos citogenéticos dos triatomíneos 9
3. Objetivos 19
II. MATERIAIS E MÉTODOS 24
1. Espécies analisadas 24
2. Obtenção dos insetos e procedência 24
3. Manutenção e alimentação 25
4. Órgão e estágio analisado 25
5. Preparação e coloração das lâminas 27
6. Procedimentos para a análise das lâminas 30
7. Fotomicrografias 31
III. RESULTADOS 32
1. Coloração com orceína lacto-acética e Giemsa 32
2. Coloração com nitrato de prata 37
3. Reação de Feulgen 40
4. Bandamento C 43
5. Figuras 03 a 49 48
IV. DISCUSSÃO 95
1. Coloração com orceína lacto-acética e Giemsa 95
2. Coloração com nitrato de prata 107
3. Bandamento C e Reação de Feulgen 120
4. Relações evolutivas entre os triatomíneos 129
V. RESUMO E CONCLUSÕES 137
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS 140
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 142
VIII. APÊNDICE 164

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos biológicos e médico-sanitários dos triatomíneos

A família Reduviidae reúne, segundo Costa Lima (1940), nada menos de 3.200 espécies de insetos, distribuídos em 19 subfamílias, dentre as quais se sobressai, como de importância médica, a subfamília Triatominae, o grupo zoológico que encerra os insetos Reduviideos hematófagos, isto é, que se alimentam de sangue. Alguns autores julgam que as espécies hematófagas devem constituir uma família - Triatomidae - distinta da família Reduviidae. Mas, como assinalam Costa Lima (1940), Usinger (1943) e outros, isto equivale a exagerar desnecessariamente a importância dos "barbeiros", só porque eles têm interesse médico.

A importância dos triatomíneos, especialmente do gênero *Triatoma* em parasitologia humana, liga-se ao fato deles serem transmissores do *Trypanosoma cruzi,* agente causal da doença de Chagas.

A doença de Chagas era primitivamente restrita ao ambiente silvestre, onde infectava mamíferos de pequeno porte em vastas extensões do continente americano, transmitida por triatomíneos também silvestres. Esta situação persiste até hoje em regiões esparsas ou virgens da América, configurando o caráter epidemiológico de uma enzootia silvestre. Em geral, a presença do *T. cruzi* não parece afetar significantemente os triatomíneos e mamíferos silvestres naturalmente infectados, o que sugere a existência de um certo equilíbrio entre as espécies, fruto de longos períodos de adaptação. Portanto, a existência da doença de Chagas humana é um fato "acidental", na medida em que o homem foi entrando em contato com os focos naturais e provocou desequilíbrios ecológicos, que fizeram com que os triatomíneos infectados fossem paulatinamente se adaptando a casas rurais de má qualidade.

Essa visão "ecológica" explica apenas parcialmente o processo de desencadeamento dos mecanismos que levaram ao aparecimento da doença em seres humanos. Além disso, são muito importantes os determinantes econômicos, sociais e culturais, pois como algumas outras moléstias, a doença de Chagas é própria da pobreza, com suas conseqüências típicas, como as condições precárias de moradia, de saneamento e de educação.

Disseminada por grandes extensões do Brasil e de outros países latino-americanos, esta doença representa um importantíssimo e grave problema de saúde pública, não somente pelos elevados índices de prevalência como pelos danos que causa à população. Deve-se considerar ainda, que a doença humana apresenta limitações e dificuldades aos tratamentos específico e sintomático, o que

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

se agrava pela precariedade geral da vida dos contigentes humanos mais expostos à infecção. Portanto, o caráter crônico da doença, e a população afetada ou sob risco predominantemente rural e sem qualquer poder de reinvidicação determinam que a prioridade conferida ao controle da endemia chagásica seja "instável e precária".

Ainda em relação à doença de Chagas, percebe-se claramente que sua epidemiologia e as tecnologias disponíveis limitam o controle da transmissão natural à intervenção no vetor. Além disso, o grande número de reservatórios animais e, a inexistência de drogas que possam ser usadas em larga escala, tornam impossível o controle na perspectiva do esgotamento das fontes de infecção.

O programa de controle da doença de Chagas no Brasil, instituído a rigor, a partir de 1975, priorizou de início, o controle da transmissão primária do vetor, empregando a metodologia então adotada, o controle químico de *Triatoma infestans,* o mais importante vetor.

No sentido de atualizar as informações disponíveis sobre a distribuição dos vetores e a prevalência da infecção humana, entre 1975 e 1980 foram promovidos inquéritos entomológicos e sorológicos, por amostragem em todo o país (Camargo **et alii**, 1984). Com base na informação colhida, foi redesenhada a área endêmica até então conhecida, identificadas aquelas de maior risco e, a partir daí, priorizadas as ações de controle.

A área originalmente endêmica, ou com risco de transmissão, correspondia em 1983, a 36% do território do país, com triatomíneos domiciliados em mais de 2.000 municípios. A população sob risco era de aproximadamente 60 milhões, com 4,2% da população rural infectada (Camargo **et alii**, 1984). Desde 1975, cerca de 60% dessa área já estava coberta pelo programa de controle. A partir de 1982, essa área foi sendo ampliada. E, em 1983, alcançou-se a totalidade da área com vetores domiciliados e, o controle vetorial foi exercido em caráter pleno. Assim se manteve pelo menos até o ano de 1986, quando repetidas epidemias de dengue comprometeram em grande medida as atividades de controle da doença de Chagas.

Os indicadores entomológicos de uso corrente (Silveira, 1993), revelaram a virtual eliminação de *Triatoma infestans*. Inquéritos sorológicos em grupos etários jovens confirmaram o impacto sobre a transmissão. Dados de morbidade, e também de mortalidade, são fortemente sugestivos de que o controle do vetor determinou importante redução no número de casos e de óbitos atribuídos à doença de Chagas.

Por outro lado, merece também menção o fato de que a doença de Chagas é ainda, no grupo de enfermidades infecciosas e parasitárias, a terceira causa de óbito (13,5%), e que o número absoluto de óbitos na década passada (1980/90) foi de aproximadamente 6.000/ano; o que, por si só justifica ainda todo o investimento no controle da doença (Silveira e Resende, 1994).

unesp

No caso de outras espécies de vetores, as respostas têm sido menos satisfatórias, em especial para aqueles de maior importância ecológica e ainda presentes em focos silvestres, tais como: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e outras (Silveira **et alii**, 1993).

Toda esta atividade de controle desenvolvida fez com que a importância relativa desses vetores fosse significativamente alterada e, de outra parte, que novos conhecimentos fossem produzidos, e incorporados à metodologia então empregada.

A partir de então, foi proposto que as espécies fossem agrupadas nas categorias seguintes, que determinam diferentes objetivos e expectativas sob o ponto de vista do controle:

Grupo 1 :*Triatoma infestans* (Klug, 1834), *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773)

Têm em comum o fato de que são espécies "introduzidas" e estritamente domiciliares no Brasil. Como tal, podem ser eliminadas, sem possibilidade de reinfestação a partir de focos extradomiciliares.

Grupo 2: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911)

São espécies "nativas" de diferentes áreas do país. Em função disso, não são passíveis de eliminação pelo controle químico contínuo e regular, uma vez que as casas tratadas podem ser reinfestadas a partir de focos silvestres. Pode-se manter apenas níveis de infestação com menores probabilidades de transmissão. As duas espécies têm em comum, além do fato de que são nativas e de que ocupam e colonizam a casa com muita constância, o fato de que invadem o domicílio mesmo quando não se encontram esgotadas as fontes de alimentação no peridomicílio.

Grupo 3: *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espinola, 1964) e *T. sordida* (Stal, 1859)

São também espécies nativas de diferentes regiões do país. Não são "irradicáveis", podendo reinvadir a habitação a partir de seus ecótopos silvestres. Estão aqui reunidas pelo fato de apresentarem marcada ornitofilia, o que as faz vetores, até aqui, menos importantes que *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis*, ainda que possam colonizar a casa, quando uma densidade crítica torna a oferta alimentar no peridomicílio insuficiente (Diotaiuti, 1991; Silveira **et alii**, 1993).

Grupo 4: *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954), *R. nasutus* (Stal, 1859), *R. prolixus* (Stal, 1859), *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *T. vitticeps* (Stal, 1859).

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

Neste grupo, estão reunidas espécies potencialmente vetoras, que, por razões e circunstâncias diversas, considera-se que possam vir a desempenhar papel relevante na transmissão domiciliar da doença.

Gupo 5: *Triatoma melanocephala* (Neiva e Pinto, 1923), *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926), *T. petrochii* (Pinto e Barreto, 1925), *T. circunmaculata* (Stal, 1859), *T. lenti* (Sherlock e Serafim, 1967), *T. matogrossensis* (Leite e Barbosa, 1953), *T. williami* (Galvão, Souza e Lima, 1965), *Panstrongylus lutzi* (Neiva e Pinto, 1923), *P. geniculatus* (Latreille, 1811), *P. diasi* (Pinto e Lent, 1946), *P. tupynambai* (Lent, 1942), *P. lignarius* (Walker, 1873), *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872), *R. domesticus* (Neiva e Pinto, 1923), *R. robustus* (Larrousse, 1927), *R. brethesi* (Matta, 1919), *Eratyrus mucronatus* (Stal, 1859), *Psammolestes tertius* (Lent e Jurberg, 1965), *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951).

Todas essas espécies são de hábitos estritamente silvestres, causando apenas a manutenção da enzootia chagásica.

Esta classificação corresponde à situação atual, no que se refere à participação das diferentes espécies de triatomíneos no ciclo domiciliar de transmissão da doença de Chagas no País. Está sujeita, e é desejável, à permanente revisão e atualização, desde que, mudanças no ambiente, sobretudo determinadas por atividade de natureza econômica podem implicar na "instabilidade" de focos naturais de espécies ainda não encontradas colonizando ecótopos artificiais (Dias, 1988; Schofield e Dujardin, 1993).

Deve-se ressaltar que, as atividades de controle químico desses vetores incluem, independentemente da espécie ou do grupo de espécies, pesquisa e tratamento com inseticidas de ação residual. A extensão e freqüência da pesquisa e tratamento é que dependerão do grupo ou categoria do vetor presente na área a ser trabalhada.

Percebe-se, entretanto, que, à medida em que é controlada a transmissão vetorial, crescem em importância os mecanismos "secundários" e, em especial, a transmissão por transfusão. Na triagem de doadores em serviços de hemoterapia, a prevalência tem sido da ordem de 0,61% dos soros pesquisados. É bastante provável que por essa via sejam hoje produzidos em maior número os novos casos da doença de Chagas no País. Uma estimativa de 1979, apontava a ocorrência de 20 mil novos casos da doença de Chagas, por ano, atribuídos à transfusão de sangue (Amato Neto, 1979).

A infecção chagásica congênita está também, definitivamente comprovada. Essa transmissão por via transplacentária, é importante, e está a exigir que sejam realizados urgentes estudos que permitam dimensionar os seus riscos e orientar a sua profilaxia.

unesp

A transmissão por meio do leite materno tem sido aventada, mas ainda não se acha totalmente esclarecida (Lopes, 1983).

Além da justa preocupação no sentido de impedir que a doença de Chagas, através dos mecanismos de transmissão aqui citados, se difunda sempre mais, é igualmente necessário ter em consideração a situação em que se encontra a população já infectada. Os cuidados com os chagásicos, inclusive o acompanhamento dos casos assintomáticos, em fase indeterminada, constituem um outro aspecto do controle da doença que nem sempre é reconhecido.

O controle final da doença de Chagas somente será alcançado com o desenvolvimento econômico e social das populações sob risco. Estas, que representam uma parcela significativa da população total do País, têm estado à margem do desenvolvimento, seja como agentes, seja como beneficiários dele. Dessa forma, a vigilância epidemiológica, exercida de forma contínua, permanente e com o envolvimento da rede de serviço de saúde e da população e, paralelamente à construção de casas rurais higiênicas (principal reinvidicação dos cientistas brasileiros que estudam a matéria), e de um trabalho de conscientização a ser desenvolvido em vastas regiões do País, são os principais investimentos a serem feitos.

Já foram descritas mais ou menos 100 espécies de triatomíneos, todas elas capazes de albergar e transmitir o *T. cruzi*. As espécies mais importantes, serão aquelas melhor capazes de se adaptarem e colonizarem a casa do homem, ou seja, de se domiciliarem. No Brasil, de cerca de 40 espécies descritas, as mais importantes são : *T. infestans, P. megistus e T. brasiliensis*. São espécies secundárias o *T. sordida e o T. pseudomaculata,* mais restritas ao peridomicílio e a ninhos de aves.

É interessante lembrar que as aves e os vertebrados de sangue frio (lagartos, rãs, ofídios), embora sejam capazes de alimentar os barbeiros, jamais albergam o *T. cruzi* em seu organismo, não sendo portanto, felizmente, reservatórios.

Além disso, os "barbeiros" tem vários inimigos naturais, como as aranhas e suas teias, os ácaros, insetos predadores (outros heteropteras, baratas e formigas) e vespas parasitas de seus ovos, além de bactérias, cuja ação não está ainda bem esclarecida. Mas nenhum deles chega a provocar o controle nítido de suas populações.

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

De quase uma centena de espécies até hoje descritas, talvez o *T. rubrofasciata* seja a única verdadeiramente cosmopolita. É interessante notar que a

grande maioria das espécies é americana; talvez não atinja a uma dezena o número de espécies encontradas fora do nosso continente.

Na América são encontrados desde 41º de latitude Norte (*Triatoma protacta*, assinalado em Great Lake City, Utah, Estados Unidos) até 46º de latitude Sul (*Triatoma patagonica,* capturada na província de San Luis, na Argentina).

Algumas espécies preferem pequenas altitudes, vivendo em cidades à beira mar, como o *Triatoma rubrofasciata*. Outras, preferem altitudes médias. Enfim outras, como o *Triatoma infestans*, são encontradas desde o nível do mar (Argentina) até altitudes de 3.630 metros (Bolívia).

Espécie com vasta distribuição na América do Sul é o *T. infestans*, encontrado, segundo Neiva e Lent (1941), na Argentina, Brasil (Bahia, Minas, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco), Bolívia, Chile, Paraguai, Peru e Uruguai. Distribuição quase tão vasta como a do *T. infestans* é a do *T. sordida*, sendo porém, menos freqüente do que o primeiro.

A maioria das espécies de triatomíneos é silvestre; algumas entretanto, no decurso da evolução e, muito provavelmente, por mutação genética e seleção, adquiriram a capacidade de colonizar domicílios humanos, constituindo as espécies denominadas domésticas, mas que melhor seriam denominadas domiciliárias, pois elas domiciliaram-se e não se domesticaram. Existem, todavia, espécies que podem ser encontradas tanto nos seus biótopos naturais como nos artificiais, isto é, tanto na natureza como nas moradias humanas, constituindo as espécies denominadas vulgarmente semidomésticas. Para Pessoa e Martins (1977), entretanto, tais espécies constituem na realidade, duas raças ou variedades, uma colonizando casas e outra, biótopos naturais. No primeiro caso, isto é, de espécies estritamente domiciliárias, a mais representativa é o *T. infestans*. Seu encontro em biótopos naturais, de tão raro, era posto em dúvida por vários autores, embora Mazza (1936), na Argentina o tivesse encontrado em abundância em ocos deixados em cascas de árvores, em cactos e principalmente, em ninhos de aves e gambás, próximos ou bastante afastados de povoações.

Outra espécie que parece ser estritamente domiciliária no Brasil é o *T. rubrofasciata,* triatomíneo cosmopolita que vive nas habitações de numerosas cidades do litoral e de portos marítimos. Os diversos autores que têm estudado este inseto têm chamado a atenção para a sua ocorrência em grande número de casas de uma localidade, como se dá no Recife, porém, com pequena densidade. Mas, Deane (1947) já chamara a atenção para o fato de que esta espécie, nos domicílios, é sugadora de sangue de ratos domésticos, sendo encontrada em grande número quando procurada nos biótopos destes roedores, que, justamente em certas regiões, são os forros das casas, os telheiros, as águas-furtadas, etc. Como não desce para sugar o homem, ou raramente o faz, são escassas as capturas, dando a impressão de existir em pequeno número nas casas em que é encontrada.

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

As espécies semidomésticas ou semidomiciliárias, isto é, as que são encontradas colonizando biótopos naturais (na natureza) e artificiais (nos domicílios e peridomicílios) são mais numerosas. Neste caso vemos que o inseto, em certas áreas é encontrado exclusivamente no biótopo natural e, em outras, somente no artificial. Temos o exemplo do *Panstrongylus megistus*, que na ilha de Santa Catarina, é encontrado exclusivamente nos biótopos naturais. Leal, Ferreira Neto e Martins (1961), na ilha de Santa Catarina, encontraram o *P. megistus* conjuntamente com o *Rhodnius domesticus* colonizando em ninhos de ratos selvagens, de gambá e de gambá-mirim. Enquanto os *P. megistus*, após a última muda abandonam estes ninhos e invadem as casas próximas, os adultos de *R. domesticus* permanecem em seus nichos.

Mas, o *P. megistus* é essencialmente domiciliário em outras regiões do Brasil, como em numerosas localidades de Minas Gerais e Bahia. Na cidade de Salvador, foi encontrado colonizando nas casas da zona urbana de toda a cidade. O hábito que apresenta o *P. megistus* de colonizar quer biótopos naturais (representando as formas primitivas do inseto) quer biótopos artificiais (as formas adaptativas), mostra que se tratam de duas variedades distintas de *P. megistus*. Uma que só coloniza nos biótopos naturais e que quando invade os domicílios o faz de maneira ocasional, como se dá com outros insetos, mas que não tem capacidade de colonizar nas habitações; outra, uma variedade domiciliária, que, como qualquer outro inseto caseiro, coloniza nas residências humanas, perdendo a capacidade, devido à mutação genética, de colonizar nos biótopos naturais primitivos. Existem outras espécies importantes, que mostram o mesmo fenômeno, de colonizarem em biótopos naturais e artificiais, como por exemplo: o *T. brasiliensis* e *T. maculata*, encontrados em nichos de mocós e nos domicílios no Nordeste; o *T. sordida* em São Paulo, colonizando em moirões de cerca, palmeiras,etc, e também no domicílio e peridomicílio humano. Todos estes casos, devem referir-se a variedades diferentes da mesma espécie. Do contrário, torna-se inexplicável por que certas espécies como o *P. megistus* não colonizam os domicílios em certas regiões, e em outras, nunca são encontradas em focos extradomiciliares.

Martins (1968 **apud** Pessoa e Martins, 1977), porém, afirma que a domiciliação do *P. megistus*, bem como a de outras espécies de triatomíneos foi devida à destruição de seus biótopos naturais, com redução drástica da fauna silvestre e conseqüente escassez de alimento e, ao aparecimento simultâneo de um tipo rudimentar de habitação humana, a cafua ou casa de pau-a-pique, onde os barbeiros encontram abrigo seguro nas frestas das paredes de barro e alimento abundante, representado pelo sangue dos moradores e dos animais domésticos, não havendo necessidade de mutação genética prévia. Onde persiste fauna silvestre abundante e/ou o tipo de habitação humana não se presta à colonização,

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

os triatomíneos permanecem com seus hábitos exclusivamente silvestres, só se encontrando no interior das casas, adultos alados, possivelmente atraídos pela luz.

Dentro dos estudos de comportamento, um dos tópicos mais importantes está relacionado com os hábitos de alimentação e defecação dos triatomíneos, desde que representam o contato entre o vetor e o hospedeiro e, portanto, a via mais importante de transmissão direta do *T. cruzi*.

Estudos de Wigglesworth (1943) em várias espécies de triatomíneos, principalmente em *R. prolixus*, mostraram que a parte da hemoglobina do sangue ingerido que é aproveitada, circula na hemolinfa do inseto, sendo daí retirada por células de diversos órgãos. Lwoff e Nicolle (1945) verificaram que a hematina é a substância essencial, sem a qual, o desenvolvimento não se processa além do quarto estágio. O sangue é a fonte exógena dessa substância que os animais não conseguem sintetizar.

Uma única alimentação em cada estádio é suficiente para que os triatomíneos retirem todo o sangue necessário ao desenvolvimento, exceto no quinto estágio, onde as ninfas necessitam, em geral, mais que um repasto para realizarem a muda imaginal (Buxton, 1930). Estas características estão, entretanto, condicionadas com a temperatura e a qualidade do sangue ingerido (Juarez, 1970).

Dias (1955), verificou que nas mesmas condições, a evolução do *T. infestans* varia com o número de refeições. Exemplares alimentados duas vezes por mês gastaram 258 a 260 dias para chegar à fase alada; para os outros, nas mesmas condições, porém com quatro refeições mensais, a evolução se processou em 148 dias. Tal encurtamento do ciclo evolutivo, de acordo com o número de refeições, não foi verificado com a mesma nitidez, no caso do *P. megistus*; com duas refeições mensais, o ciclo durou 389 a 416 dias e, com quatro refeições por mês, foi de 372 dias.

Zeledón **et alii** (1977) estudaram o comportamento alimentar e excretor de três espécies de triatomíneos, distribuídos amplamente na América Central e do Sul. Estes estudos determinaram que *R. prolixus* é mais rápido em defecar que *T. dimidiata* e *T. infestans* e, portanto, mais eficiente como vetor da doença de Chagas.

Já em 1988, Zabala e D'Antonio estudaram o comportamento alimentar e de excreção de ninfas de quinto estádio em quatro espécies de triatomíneos e chegaram à conclusão de que devido ao fato de *R. prolixus* ser um triatomíneo intradomiciliar e *T. pallidipennis* ser peridomiciliar, *R. prolixus* poderia ser superior na transmissão da doença de Chagas em relação às outras espécies estudadas. Seguindo esta eficiência estaria *T. pallidipennis* e por último, *T. brasiliensis,* uma espécie semiselvática.

Segundo Costa Lima (1940), a hematofagia, normal desses insetos, evoluiu provavelmente do predatismo, ainda observado em espécies que lhe são afins.

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

Lent e Martins (1940) observaram ninfas de *T. arthurneivai, P. megistus e T. vitticeps* sugando hemolinfa de baratas silvestres e escorpiões, já tendo sido também assinalado o predatismo de *T. sanguisuga, T. rubrofasciata, T. phyllosola e T. rubrovaria* sobre percevejos, aranhas e larvas de lepidópteros.

2. Aspectos citogenéticos dos triatomíneos

Além da importância médica destes insetos, eles também são de interesse citogenético porque seus cromossomos possuem cinetócoro difuso, isto é, distribuído ao longo do cromossomo e não localizado na região do centrômero (Schrader, 1947; Hughes-Schrader e Schrader, l961) e uma forma não usual de meiose (John e Lewis, 1965), onde a segregação dos cromossomos sexuais é pós-reducional (Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956a; Ueshima, 1966; Solari, 1979)

O comportamento particular dos cromossomos dos insetos desta ordem, levou os autores a várias discussões, havendo ainda sérias dúvidas a respeito de pontos fundamentais.

Em 1935, Schrader, analisando o comportamento do heterocromossomo do *Protenor* introduziu, na morfologia dos cromossomos dos Heteroptera, um conceito inteiramente novo sobre o cinetócoro. Para este autor, a função universalmente desempenhada por essas estruturas localizadas em situação definida e constante nos cromossomos quer de plantas, quer de animais, poderia ser, nos Heteroptera, desenvolvida ao longo de toda a extensão dos cromossomos, ou seja, estes insetos teriam cromossomos holocêntricos e, seu cinetócoro deixaria assim de ser localizado, para se tornar difuso.

Desde então, muito se aprendeu sobre genes, cromossomos e sobre a biologia das células mitóticas, mas o cinetócoro permanece um enigma. Até recentemente, o conhecimento sobre o cinetócoro se restringia largamente à sua ultraestrutura e citoquímica e sobre seu comportamento durante o movimento cromossômico. Hoje, entretanto, a aplicação de técnicas de imunocitoquímica, bioquímica e biologia molecular renovaram o interesse sobre o cinetócoro e seu relacionamento com a estrutura cromossômica e a segregação gênica, de modo que atualmente, o cinetócoro pode ser definido como "uma estrutura especializada dos cromossomos eucarióticos que serve para ligar os cromossomos ao fuso mitótico e é necessário para o movimento normal de distribuição dos cromossomos na meiose e na mitose" (Brinkley **et alii**, 1989)

Sabe-se também, que quando examinado ao microscópio eletrônico, o prato cinetocórico apresenta uma organização trilaminar, consistindo, de acordo com Brinkley **et alii** (1989), de:

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

- uma camada externa de 40-60 nm de espessura;
- uma camada média de 25-30 nm de espessura;
- uma camada interna de 40-60 nm de espessura.

Estudos citoquímicos sugerem que o cinetócoro é composto de DNA, RNA e proteínas, e que ele não é uma estrutura separada, mas pode ser composto de, ou estar integrado às fibras especializadas de cromatina que são contínuas com as fibras de DNA cromossômico e, como Schrader (1935) já apontava, os cinetócoros podem realmente, ser de dois tipos:

-**Cinetócoros localizados**: são aqueles confinados a um local específico do cromossomo. A posição do cinetócoro é facilmente identificada pela evidente constrição primária existente no cromossomo metafásico.

-**Cinetócoros difusos**: ocorre em cromossomos que não apresentam constrição primária e então, os microtúbulos se ligam em todo o comprimento dos cromossomos. Conseqüentemente, quando os cromossomos movem-se para os polos na anáfase, eles permanecem paralelos uns aos outros. Este tipo de cinetócoro está presente em alguns grupos de insetos.

Hughes-Schrader (1948, 1955) demonstrou claramente que em alguns dos organismos com cromossomos holocêntricos, ocorria uma seqüência meiótica invertida. Isto ocorre por exemplo, nos Coccídeos, onde a separação reducional ocorre na segunda divisão e a separação equacional na primeira divisão meiótica. Uma seqüência invertida foi também demonstrada nos Aphidis (Ris, 1942). Nos Heteroptera, muitos citologistas acreditam que a seqüência meiótica é normal, pelo menos para os autossomos, com separação reducional na primeira divisão e separação equacional na segunda (Hughes-Schrader e Schrader, 1961; Helenius, 1952), ao passo que os cromossomos sexuais apresentam uma seqüência meiótica invertida.

Em 1948, Schreiber e Pellegrino iniciaram, no Brasil, o estudo do cariótipo das espécies *Triatoma infestans, T. sordida, T. maculata, T. vitticeps, T. brasiliensis, T. rubrovaria, T. dimidiata, T. pallidipennis, Panstrongylus megistus, Rhodnius prolixus e Psammolestes coreodes*. Neste trabalho foram indicados o número de cromossomos autossomos e dos cromossomos sexuais e assinalados os fenômenos de heteropicnose de alguns autossomos no *Triatoma infestans*.

Em 1950, Schreiber e Pellegrino analisaram mais detalhadamente, o fenômeno da heteropicnose dos autossomos de *T. infestans* e verificaram alguns fenômenos análogos menos evidentes em *T. platensis e T. sordida, T. brasiliensis e T. nitida*. Neste estudo ressaltou-se o fato de que três autossomos em *T. infestans*, de tamanho maior do que os demais, parecem nitidamente heteropicnóticos e ligados ao grupo dos cromossomos X e Y na fase inicial do longo estágio chamado de "estágio confuso". Este fenômeno conhecido em pouquíssimos outros casos de

meiose, indicou que estes três cromossomos tinham um ciclo de duplicação precoce em relação aos demais cromossomos do complemento desta espécie e neste comportamento assemelhavam-se aos cromossomos sexuais com os quais aparecem ligados por delgados filamentos. O comportamento específico dos três autossomos (A,B,C) de *Triatoma infestans* foi usado por Schreiber e Pellegrino (1950) para a análise da meiose de híbridos entre *Triatoma infestans* e *Triatoma rubrovaria,* isto é, uma espécie com e a outra sem autossomos heteropicnóticos. Apesar das duas espécies terem o mesmo número cromossômico e se cruzarem em ambas as direções, este estudo mostrou uma falta de pareamento entre os homólogos das duas espécies, que seria devido, provavelmente, à natureza heteropicnótica dos três autossomos de *Triatoma infestans.* Este fato sugeriu que a heteropicnose dos autossomos pode ser um mecanismo de isolamento específico do processo meiótico.

Em 1951, Schreiber e Pellegrino estudaram o efeito de injeções de colchicina sobre o processo espermatogenético em *T. infestans.* Verificaram o bloqueio das divisões meióticas e mitóticas e as conseqüentes anomalias na formação das espermatogônias. A ação da colchicina nesse inseto manifestou-se desde as primeiras horas de injeção, com o bloqueio das metáfases goniais e da primeira e segunda metáfases espermatocíticas. A prófase meiótica e a diacinese foram normais. Depois de sete dias de colchinização, as tétrades na primeira metáfase e as díades na segunda, foram desfeitas, deixando respectivamente 44 ou 22 cromátides livres no citoplasma. Após nove dias, quase todo o testículo era constituído por espermátides cujos núcleos tinham tamanhos muito variáveis. A medição destes núcleos e a análise estatística revelou uma curva polimodal na relação 1:2:4 . A comparação desta série múltipla dos valores nucleares das espermátides colchicinizadas com os valores nucleares dos estádios normais indicou serem estas espermátides respectivamente haplo, diplo e tetraplóides, derivadas da recuperação das primeira e segunda metáfases bloqueadas pela ação da colchicina.

Um estudo detalhado sobre a anatomia e histologia dos testículos e espermiocitogênese de *T. infestans* foi realizado por Barth (1956a). O cariótipo e o tamanho relativo dos cromossomos de *T. infestans,* estudados por Schreiber e Pellegrino (1948), foram redescritos por Barth neste trabalho. Este confirmou que *T. infestans* possui 22 cromossomos, dos quais 2 eram heterocromossomos, sendo o cromossomo Y maior e o X menor e que, os três maiores autossomos desta espécie, A, B, C, bem como os heterocromossomos, eram heteropicnóticos, formando nas espermatogônias e nos espermatócitos, corpos que permaneciam fortemente condensados, mesmo quando os outros cromossomos se individualizavam ou quando formavam os cromossomos difusos.

Neste mesmo trabalho, Barth, descreveu pela primeira vez, as células apicais em *T. infestans.* A função das mesmas é, como tudo indica, a de uma célula reguladora no sentido de induzir as células não diferenciadas a formarem espermatogônias ou células de revestimento dos cistos. Esta célula típica é bem caracterizada, destacando-se nitidamente de todas as células do germário em cada folículo.

Dando continuidade ao seu trabalho, Barth (1956b) fez um estudo comparativo sobre certos pontos da espermiocitogênese de sete espécies de Triatominae: *Triatoma maculata, T. vitticeps, T. infestans, T. sordida, Panstrongylus megistus, Rhodnius prolixus e R. neglectus*. A espécie usada como base de comparação foi *Triatoma infestans.* Os resultados levaram-no a concluir que, considerando-se concomitantemente, as placas equatoriais da primeira e da segunda divisão de maturação, o número e a forma dos autossomos e dos heterocromossomos e o número, tamanho e forma das células apicais, era possível estabelecer uma classificação das espécies, ou pelo menos, uma separação das espécies duvidosas.

Na segunda parte deste trabalho, o autor estudou a espermiocitogênese de *Triatoma vitticeps.* Observou que, nesta espécie, o heterocromossomo X era representado por três cromossomos verdadeiros, que se comportavam exatamente da mesma forma que o Y. Em comparação com *T. infestans*, não se encontrou, nesta espécie, heteropicnose dos três autossomos e dos heterocromossomos, apesar dos quatro heterocromossomos apresentarem coloração bastante acentuada.

Barth (1956b) também verificou que em todas as espécies de *Triatoma* e *Panstrongylus* analisadas, cada folículo possui uma só célula apical, sendo que só no gênero *Rhodnius* encontram-se sempre duas células em cada tubo folicular.

Em 1959, Espínola e Schreiber descreveram um mutante da cor dos olhos em *Panstrongylus megistus,* analisando o comportamento genético desta mutação em duas gerações sucessivas.

A natureza holocêntrica dos cromossomos dos Heteroptera foi finalmente demonstrada pelo trabalho de Hughes-Schrader e Schrader (1961) no gênero *Euchistus* e *Solubea*. Eles trataram *E. tritigmus*, *E. servus e E. pugnas* (Pentatomidae, Heteroptera) com raios-X e então estudaram o comportamento desses cromossomos durante a meiose. Embora observassem alta freqüência de rearranjos estruturais, eles se concentraram no comportamento de fragmentos durante a meiose. Observaram que esses fragmentos se perpetuavam mitoticamente através de muitas gerações de espermatogônias e que, fragmentos livres também eram capazes de participar das divisões meióticas. Assim, suas observações indicavam que fragmentos livres de cromossomos autossomos e sexuais se perpetuavam durante a meiose, evidenciando a natureza holocêntrica

destes. Deve-se ressaltar ainda, o fato de que em sistemas monocêntricos, fragmentos acêntricos regularmente falham na sua orientação na placa metafásica.

Antes deste trabalho, houve consideráveis discussões sobre o sistema centromérico nos Heteroptera. Baseando-se em estudos sobre o comportamento cromossômico durante a meiose, bem como na mitose, muitos pesquisadores afirmavam que os cromossomos dos Heteroptera eram holocêntricos (Schrader, 1935, 1940, 1947; Troedsson, 1944). Em suporte a esta afirmação, Hughes-Schrader propôs as seguintes características para os cromossomos dos Heteroptera, que claramente os diferencia dos sistemas monocêntricos: a) cada cromossomo se orienta com seu eixo maior em ângulo reto ao eixo polar na metáfase mitótica; b) nenhuma constrição primária aparece durante a mitose; c) as fibras cromossômicas se organizam sobre todo o comprimento de cada cromátide, para que, d) na anáfase mitótica, as cromátides se separem por disjunção paralela e, e) a terminalização do quiasma se complete no final da diacinese. Estes critérios e, a natureza holocêntrica dos cromossomos dos Heteroptera foram apoiadas por Heizer (1950); Halkka (1956). Adicionalmente, a holocentricidade foi demonstrada experimentalmente nos Homoptera por Hughes-Schrader e Ris (1941) e Ris (1942).

Outros pesquisadores por sua vez, discordavam destas interpretações (Mendes, 1949; Rao, 1958; Parshad, 1957) e sugeriram que os cromossomos dos Heteroptera eram monocêntricos, por causa da presença de uma presumível constrição primária na metáfase mitótica. Este argumento foi fortemente criticado por Hughes-Schrader e Schrader (1961).

Por outro lado, a descoberta de cromossomos possuindo um centrômero em cada extremidade, tal como se constata em escorpiões do gênero *Tityus* (Piza, 1939, 1941, 1943a,b), levou o autor a reinvestigar a questão e a concluir que, também nos Heteroptera, os cromossomos eram dicêntricos.

Desde então, numa série de publicações, Piza (1945, 1946a, b, c) procurou provar que os cromossomos dos Heteroptera são providos de um centrômero em cada extremidade e, ao estudar a meiose de *Lybindus dichrous* Sthal (Coreidae) e *Euryophthalmus humilis* Drury (Pyrrhocoridae), esse autor encontrou mais alguns fatos de grande valor demonstrativo, em suporte à sua teoria. Seu argumento se baseou na evidência da restrição da atividade cêntrica na meiose.

Porém, considerando estudos anteriores (Schrader, 1935, 1940), Hughes-Schrader e Schrader (1961) concluiram que a restrição da atividade cêntrica às extremidades dos cromossomos era também uma característica dos cromossomos holocêntricos.

A maioria dos autores entretanto, apoiam a opinião de Hughes-Schrader e Schrader, de que os cromossomos dos Heteroptera são holocêntricos (Ueshima, 1966; Wolfe e John, 1965) e adicionam aos critérios definidos por eles, a seguinte afirmação: "fragmentos livres induzidos por irradiação geralmente se comportam

normalmente e persistem através das divisões celulares" (John e Lewis, 1965; White, 1973; Cooper, 1972).

Uma importante monografia sobre a citogenética dos triatomíneos foi realizada por Ueshima (1966). Nesta, Ueshima, estabeleceu que "os dados citogenéticos sugerem que o número modal da subfamília Triatominae é 22 (20A + XY no macho). Estabeleceu também, que no gênero *Triatoma*, havia cinco tipos de complementos cromossômicos: 18A + XY; 20A + XY; 20A + X_1X_2Y; 20A + $X_1X_2X_3Y$ e 22A + X_1X_2Y. Vinte autossomos foram considerados normais e os desvios a partir do número normal são derivados por fragmentação ou fusão ocorridas no curso da evolução (Tab. 01; Fig. 01).

Parece claro que, pelo menos nas 19 espécies estudadas por aquele autor, os cromossomos sexuais do tipo X0 não existem e que, a maioria dos gêneros e espécies de triatomíneos mostra uma tendência dos cromossomos sexuais de se manterem juntos no "estágio confuso", sendo que esta associação persiste até a diacinese.

Uma outra característica desses insetos é que a prófase da primeira divisão meiótica não aparece com as subfases características, ou seja, leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Ao contrário, os estágios, leptóteno, zigóteno e paquíteno são denominados de "estágio confuso" e a estrutura do núcleo parece ser tipicamente interfásica, sendo visíveis apenas o nucléolo e os cromossomos sexuais heterocromáticos. A distinção começa a ocorrer a partir do diplóteno e da diacinese. Em algumas espécies de Triatominae, outras massas heterocromáticas aparecem nesse estágio.

O mesmo autor estabeleceu ainda que, nos triatomíneos os cromossomos sexuais eram encontrados na metáfase I no centro de um anel formado pelos autossomos ou na região periférica deste.

A partir de 1967, estas pesquisas foram reativadas no Brasil, com a publicação do livro "Genetics of insects vectors of disease" (Wright e Pal, 1967), no qual Schreiber, Carvalho e Espínola foram incumbidos de escrever o capítulo sobre a "Genética de *Triatoma* e outras espécies de vetores" (Schreiber **et alii**, 1967).

Neste capítulo, relativo aos triatomíneos, os autores descreveram a genética convencional do gênero *Triatoma* e o cariótipo de várias espécies desses insetos, dando ênfase às características morfológicas do testículo e túbulos espermatogoniais; número de células apicais; número de gerações espermatogoniais antes da meiose; número de autossomos e de cromossomos sexuais; tamanho dos cromossomos; heteropicnose dos autossomos; número, tamanho e posição dos cromossomos sexuais na metáfase.

No ano seguinte, Schreiber **et alii** relataram pesquisas feitas com a técnica cariométrica, citofotométrica e autorradiográfica com timidina tritiada, sobre a síntese do DNA durante o processo espermatogenético a partir das

espermatogônias até o espermatócito de primeira ordem. Foi constatado que a síntese do DNA se realiza somente nas espermatogônias em multiplicação e na primeira fase do espermatócito de primeira ordem. Sucessivamente este espermatócito sofre um ciclo de duplicação do volume nuclear, sem ulterior síntese de DNA (heterossíntese). Este fenômeno foi interpretado como uma fase funcional do espermatócito provavelmente de preparação dos materiais ativos no processo morfogenético da formação do espermatozóide.

Logo após, Penalva da Silva e Schreiber (1969) publicaram um trabalho sobre a importância taxonômica do número e tamanho relativos dos túbulos testiculares em 12 espécies de Triatominae pertencentes a quatro gêneros diferentes. Foi verificado que os gêneros têm características próprias, sendo que o gênero *Panstrongylus* tem sete túbulos aproximadamente iguais, os gêneros *Rhodnius e Psammolestes* têm cinco túbulos mais curtos e dois longos, e o gênero *Triatoma* três túbulos curtos, dois médios e dois longos.

Em 1972 Schreiber, Bogliolo e Pinho retomaram o estudo do cariótipo dos Triatominae. Foram estudadas as seguintes espécies: *T. infestans, T. vitticeps, T. platensis, T. pseudomaculata, P. megistus, P. herreri e Rhodnius prolixus.* Destas espécies, foram estudados três aspectos citogenéticos relacionados, ou seja, descrição e representação fotomicrográfica dos autossomos e dos cromossomos sexuais, (cariótipo), determinação do conteúdo em DNA por núcleo nas espermatogonias e determinação do volume nuclear deste estágio;

Este trabalho, para algumas espécies, completa o trabalho inicial de Schreiber e Pellegrino (1948) sobre a heteropicnose dos autossomos, que foi somente apresentado num congresso internacional sem documentação gráfica.

Pela comparação com o estudo citofotométrico do DNA dos Heteroptera, paralelamente ao do cariótipo, feito pelo casal Schrader (1956), ficou demonstrado que nestes animais, apesar de terem o mesmo número de cromossomos (com exceção do *P. megistus*), os valores de DNA podem variar significantemente, alcançando entre certas espécies valores de duplicação.

Em 1974, alguns híbridos entre *T. infestans* e *T. pseudomaculata* foram analisados citogeneticamente por Schreiber **et alii**. A esterilidade dos machos F1 foi verificada pela ausência total ou parcial do pareamento dos homólogos e o conseqüente bloqueio de pelo menos parte das divisões meióticas. Foram encontradas espermátides gigantes no estádio inicial da espermiogênese, bem como espermatozóides gigantes anômalos.

Schreiber **et alii** (1975, 1977) trabalharam também com indivíduos híbridos interespecíficos, indivíduos capturados em zonas de alta radiação natural e verificaram alterações drásticas na espermatogênese desses triatomíneos.

Maudlin (1974) descreveu a técnica de bandamento G para os triatomíneos. Esta técnica, tornou possível identificar cromossomos individuais no complemento

de diferentes espécies de triatomíneos e, indicou a possibilidade de se produzirem mapas cromossômicos para este grupo, os quais servirão para investigações adicionais sobre marcadores cromossômicos e sua aplicação a problemas genéticos de caracterização e manipulação dos vetores da doença de Chagas.

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

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Koshy (1979c) descreveu detalhadamente o cariótipo mitótico de *Triatoma pallidipennis*. Todos os cromossomos foram identificados e dispostos no cariótipo de acordo com seu comprimento total; medida que foi adotada também nos trabalhos anteriores deste autor. O cariótipo mitótico desta espécie, segundo o referido autor, também é composto por dez pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais. Com os dados obtidos, foi construído um idiograma onde pode ser notado um decréscimo gradual e uniforme no tamanho dos cromossomos.

Solari (1979) estudou o comportamento dos cromossomos meióticos de *T. infestans,* e mencionou um padrão definido de segregação na primeira metáfase: enquanto os autossomos são quiasmáticos e segregam-se regularmente, os cromossomos X e Y são aquiasmáticos e dividem-se equacionalmente, sendo que a divisão segregacional ocorre na segunda divisão. Baseando-se neste fato, fez um importante estudo, a nível de microscopia eletrônica, sobre os complexos sinaptonêmicos nesta espécie. Apenas os autossomos formam este tipo de emparelhamento, pois a divisão equacional de X e Y impede esse fenômeno nesse par de cromossomos, o que sugere dois mecanismos diferentes de pareamento, operando nos autossomos e nos cromossomos sexuais durante o paquíteno. Neste trabalho, o autor também mostra os resultados obtidos com a técnica de bandamento C, determinando a localização dos blocos heterocromáticos nos três maiores pares de autossomos e no cromossomo Y, que se associam formando o grande cromocentro observado nas células interfásicas de diversos órgãos desse inseto.

De Vaio **et alii** (1985) realizaram um estudo em três espécies de triatomíneos, comparando a existência de autossomos heteropicnóticos; a formação de cromocentros pelos cromossomos sexuais e as características dos núcleos poliplóides das mesmas. Seus resultados confirmaram os dados obtidos anteriormente por outros autores.

No mesmo ano, Salles e Carvalho adaptaram a técnica da banda C ao estudo citogenético dos polimorfismos dos cariótipos somáticos dos triatomíneos, nas espécies *T. infestans, T. brasiliensis e T. sordida*.

Dujardin **et alii** (1987), compararam geneticamente populações selvagem e doméstica de *Triatoma infestans* através de análises de isoenzimas e, similarmente, compararam linhagens isoenzímicas de *Trypanosoma cruzi* isoladas daquelas populações, a fim de entenderem suas relações taxonômicas e evolutivas. Verificaram que as populações selvagem e doméstica de *T. infestans* são virtualmente idênticas nos 19 loci gênicos analisados, bem como são idênticas as linhagens isoenzímicas isoladas daquelas, fato que apoia a hipótese de que não houve especiação entre as duas populações.

Azeredo-Oliveira (1990), realizou um estudo das áreas nucleares, nucleolares e heterocromáticas dos túbulos de Malpighi e glândulas salivares, no decorrer do desenvolvimento de *Triatoma vitticeps*, e de aspectos da atividade organizadora nucleolar, heterocromatina e da meiose em testículos de *T. vitticeps*, *T. pallidipennis*, *T. infestans* e *T. maculata*. A partir da análise da área nuclear, nucleolar e da área heterocromática, pode-se sugerir um aumento na atividade metabólica dos túbulos de Malpighi e glândulas salivares, no decorrer do desenvolvimento destas espécies, sendo que, essa atividade foi maior nas fêmeas do que nos machos adultos. Os números cromossômicos obtidos para *T. infestans*, *T. maculata*, *T. pallidipennis*, *T. vitticeps* foram respectivamente, 20A + XY; 20A + XY; 20A + X_1X_2Y; 20A + $X_1X_2X_3Y$, confirmando os dados existentes em literatura. A marcação, pelo nitrato de prata, dos cromossomos metafásicos, apontou os cromossomos sexuais como sendo os portadores das Regiões Organizadoras Nucleolares. Verificou-se ainda, uma associação entre o nucléolo e as regiões heterocromáticas nos três órgãos analisados. Em todos os casos, o nucléolo circundava a massa heterocromática, evidenciando a íntima associação funcional entre estas duas estruturas.

Em 1992, Perez **et alii**, publicaram um estudo comparativo sobre o comportamento cromossômico durante a meiose de machos e as características do bandamento C nas espécies *Rhodnius pictipes*, *R. nasutus*, *R. robustus*, *Triatoma matogrossensis* e *T. pseudomaculata*. Este trabalho permitiu a identificação de sete características genéticas úteis na caracterização e diferenciação de espécies de triatomíneos e, aponta a citogenética como uma ferramenta confiável e de baixo custo para a identificação de espécies em casos de confusões taxonômicas e, como um complemento para outros métodos genéticos que forem inconclusivos. As características citogenéticas utilizadas por este grupo, podem ser assim definidas: número cromossômico da espécie, mecanismo sexual, tamanho relativo dos cromossomos sexuais, comportamento meiótico destes cromossomos sexuais,

tamanho relativo dos autossomos, disposição das bandas-C nos cromossomos autossomos e constituição dos cromocentros.

Ainda em 1992, Panzera **et alii** descreveram a variação intraespecífica de banda C em populações naturais de *T. infestans* do Uruguai. Variações no número, na posição e no tamanho das bandas C nos três maiores pares de autossomos foram encontradas. Através de testes estatísticos, concluíram que, apesar destas duas populações apresentarem diferenças significativas nos seus padrões de banda C, a homogeneidade delas não deve ser questionada.

Em 1995, Panzera **et alii** publicaram novo trabalho onde o padrão de banda C, o conteúdo de DNA e a seqüência meiótica de machos de *Triatoma platensis* e *T. delpontei* são comparadas aos de *T. infestans*. Verificaram que, apesar de algumas similaridades, cada espécie apresenta diferente comportamento cromossômico durante a meiose, distinto conteúdo de DNA e localização e quantidades específicas de bandas C. A análise dos dados citogenéticos permitiu sugerir que *T. infestans* e *T. platensis* são espécies mais relacionadas uma à outra do que com *T. delpontei*.

Embora as técnicas de bandamento tenham se tornado parte essencial da análise citogenética, pouco se encontra em literatura sobre o bandamento cromossômico nos triatomíneos. Até agora, a maioria dos resultados foram obtidos através da investigação cromossômica comparativa nos triatomíneos com a coloração convencional dos cromossomos. Nesses trabalhos, os critérios de comparação levados em consideração, foram basicamente o número e a morfologia dos cromossomos, bem como a disposição destes na placa metafásica. Os dados obtidos através destas investigações deram as primeiras indicações do processo que aconteceu durante a evolução cromossômica destes insetos. Exemplos isolados de análises de bandamento podem ser encontrados em alguns dos trabalhos citados anteriormente (Maudlin, 1974; Azeredo-Oliveira, 1990; Perez **et alii**, 1992; Panzera **et alii**, 1992; e Panzera **et alii**, 1995).

A fim de se obter um conhecimento mais detalhado das características dos cromossomos dos triatomíneos, o uso de técnicas de coloração diferenciada se torna obrigatório. E, uma vez que esses métodos permitem a demonstração e a análise de múltiplas bandas e podem fornecer indicações valiosas da estrutura molecular dos cromossomos (ex: seqüências repetidas), bem como dos processos evolutivos a que determinados taxa foram submetidos, pretendemos, no presente trabalho, obter informações sobre os aspectos cromossômicos, o padrão de distribuição da heterocromatina e da atividade nucleolar em células interfásicas e meióticas do testículo de adultos de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, espécies essas ainda com poucos dados citogenéticos publicados em literatura.

unesp

3 - Objetivos

A partir do que foi exposto, os objetivos do presente trabalho, podem ser assim resumidos:

a - Estudar comparativamente o processo meiótico de cinco espécies do gênero *Triatoma*: *T. brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T.rubrovaria* e *T. sordida*.

b - Obter informações sobre o comportamento nucleolar durante a divisão meiótica e a localização das Regiões Organizadoras Nucleolares nos cromossomos das espécies citadas, através da utilização da técnica de coloração com nitrato de prata.

c - Localizar as regiões heterocromáticas nos núcleos interfásicos dos testículos e nos cromossomos das espécies do gênero *Triatoma*, através da técnica de banda C.

d - Utilizar os dados obtidos para ampliar o entendimento da evolução cromossômica ocorrida entre essas espécies do gênero *Triatoma*.

unesp

Tabela 01. Complemento cromossômico de machos de Triatominae
Fonte: Ueshima (1966), com atualização dos dados através de levantamento bibliográfico realizado no presente trabalho.

ESPÉCIE	DIPLÓIDE	HAPLÓIDE	REFERÊNCIA
Dipetalogaster maximum (Uhler, 1894)	20 + XY	10 + XY	Ueshima, 1966
Panstrongylus herreri (Wygodzinsky, 1948)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
Panstrongylus megistus (Burmeister, 1835)	18 + X_1X_2Y	9 + X_1X_2Y	Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956b
Paratriatoma hirsuta (Barber, 1938)	20 + XY	10 + XY	Ueshima, 1966
Psammolestes coreodes (Bergroth, 1911)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950
Rhodnius nasutus (Stal, 1859)	20 + XY	10 + XY	Perez **et alii**, 1992
R. neglectus (Lent, 1954)	20 + XY	10 + XY	Barth, 1956b; Ueshima, 1966
R. neivai (Lent, 1954)	20 + XY	10 + XY	Koshy, 1979b
R. pictipes (Stal, 1872)	20 + XY	10 + XY	Koshy, 1979a*; Perez **et alii**, 1992
R. prolixus (Stal, 1859)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956b; Ueshima, 1966
R. robustus (Larousse, 1927)	20 + XY	10 + XY	Koshy, 1979b; Perez **et alii**, 1992
Triatoma. barberi (Usinger, 1939)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
T. brasiliensis (Neiva, 1911)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950
T. delpontei (Romana e Abalos,1947)	20 + XY	10 + XY	Ueshima, 1966; Panzera **et alii**, 1995
T. dimidiata (Latreille, 1811)	20 + XY	10 +XY	Schreiber e Pellegrino, 1950
T. eratyrusiforme (Del Ponte, 1929)	20 + $X_1X_2X_3Y$	10 + $X_1X_2X_3Y$	Ueshima, 1966
T. gerstaeckeri (Stal,1859)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966

Tabela 01. Continuação

ESPÉCIE	DIPLÓIDE	HAPLÓIDE	REFERÊNCIA
T. infestans (Klug, 1834)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956a; Ueshima, 1966; Azeredo-Oliveira, 1990; Panzera **et alii**, 1992
T. lecticularia (Stal,1859)	20 + XY	10 + XY	Ueshima, 1966
T. maculata (Erichson, 1848)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956b; Azeredo-Oliveira, 1990
T. matogrossensis (Leite e Barbosa, 1953)	20 + XY	10 + XY	Perez **et alii**, 1992
T. nitida (Usinger, 1939)	18 + X_1X_2Y	9 + X_1X_2Y	Schreiber e Pellegrino, 1950
T. patagonica (Del Ponte, 1929)	20 + XY	10 + XY	Ueshima, 1966
T. penninsulares (Usinger, 1940)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
T. pallidipennis (Stal, 1872)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Schreiber e Pellegrino, 1950; Ueshima, 1966; Azeredo-Oliveira, 1990**
T. pallidipennis (Stal, 1872)	20 + XY	10 + XY	Koshy, 1979c*
T. platensis (Neiva, 1913)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950; Panzera **et alii**, 1992
T. protracta (Uhler, 1894)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
T. pseudomaculata (Corrêa e Espínola,1964)	20 + XY	10 + XY	Schreiber **et alii**, 1972; Perez **et alii**, 1992
T. rubida (Uhler,1894)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
T. rubrofasciata (De Geer, 1773)	22 + X_1X_2Y	11 + X_1X_2Y	Manna, 1950

Tabela 01. Continuação

ESPÉCIE	DIPLÓIDE	HAPLÓIDE	REFERÊNCIA
T. rubrovaria (Blanchard, 1843)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950; Ueshima, 1966
T. sanguisuga (Leconte, 1855)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Payne, 1909
T. sinaloensis (Ryckman, 1962)	20 + X_1X_2Y	10 + X_1X_2Y	Ueshima, 1966
T. sordida (Stal, 1859)	20 + XY	10 + XY	Schreiber e Pellegrino, 1950, Barth, 1956b; Ueshima, 1966
T. vitticeps (Stal, 1859)	20 + $X_1X_2X_3Y$	10 + $X_1X_2X_3Y$	Schreiber e Pellegrino, 1950, Barth, 1956b; Ueshima, 1966; Azeredo-Oliveira, 1990

* metáfases mitóticas
** metáfases meióticas

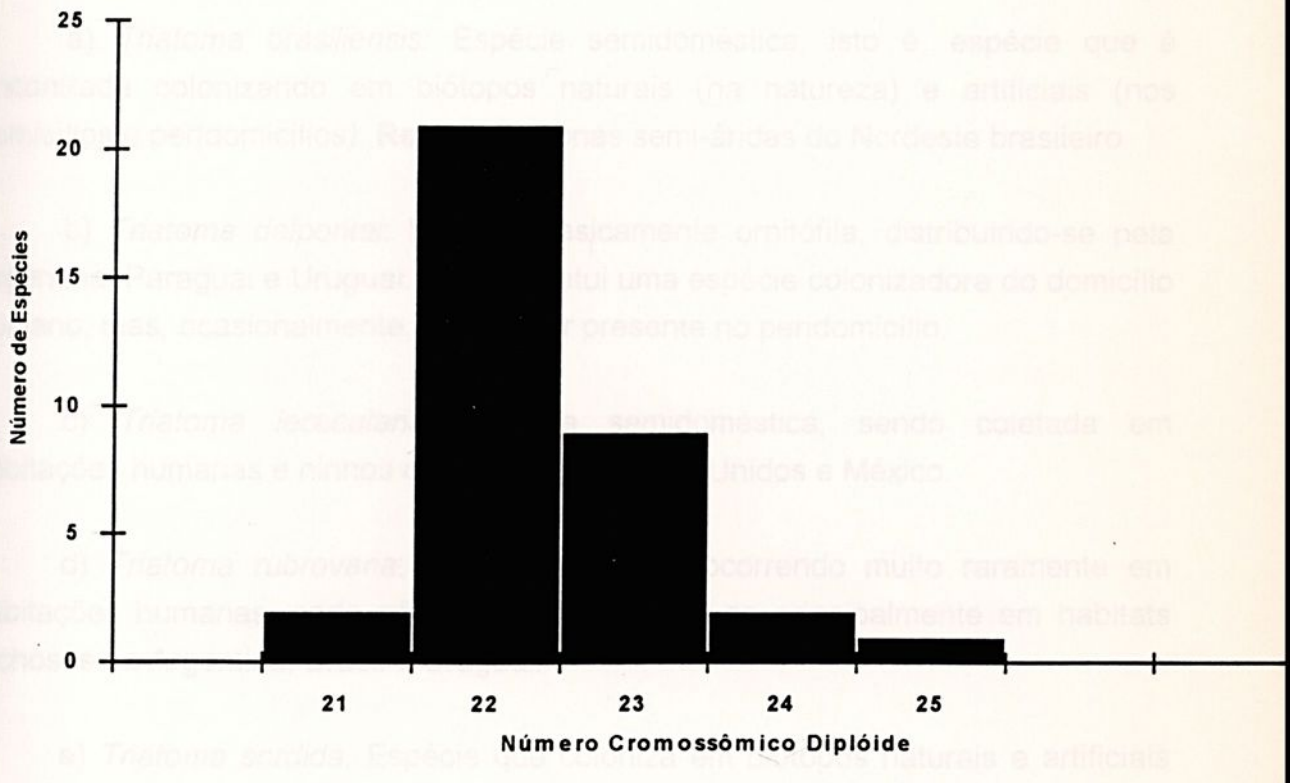


Figura 01. Distribuição do número cromossômico em machos da subfamília Triatominae

II.MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécies analisadas

A escolha das espécies analisadas neste trabalho foi feita considerando-se o número de cromossomos sexuais de cada uma, ou seja, preferiu-se espécies que apresentassem dois cromossomos sexuais (XY) e, sempre o mesmo número de cromossomos autossomos. Satisfeitos estes critérios, as seguintes espécies foram analisadas; todas com 22 cromossomos, sendo 20 autossomos e dois cromossomos sexuais:

a) *Triatoma brasiliensis:* Espécie semidoméstica, isto é, espécie que é encontrada colonizando em biótopos naturais (na natureza) e artificiais (nos domicílios e peridomicílios*).* Restrita às zonas semi-áridas do Nordeste brasileiro.

b) *Triatoma delpontei*: Espécie basicamente ornitófila, distribuindo-se pela Argentina, Paraguai e Uruguai. Não constitui uma espécie colonizadora do domicílio humano, mas, ocasionalmente, pode estar presente no peridomicílio.

c) *Triatoma lecticularia:* Espécie semidoméstica, sendo coletada em habitações humanas e ninhos de aves nos Estados Unidos e México.

d) *Triatoma rubrovaria*: Espécie silvestre, ocorrendo muito raramente em habitações humanas, onde não coloniza. Encontra-se principalmente em habitats rochosos na Argentina, Brasil e Uruguai.

e) *Triatoma sordida*: Espécie que coloniza em biótopos naturais e artificiais da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, sendo portanto, uma espécie semidoméstica.

2. Obtenção dos Insetos e Procedência

As espécies foram cedidas pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob coordenação do Prof. Dr. José Maria Soares Barata. O insetário promove coletas periódicas em algumas regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais e também recebe doações de insetos de todo o mundo, mantendo assim um estoque que possibilita a distribuição às instituições de pesquisa solicitantes.

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

Os insetos analisados no presente trabalho são procedentes dos seguintes lugares (Fig. 02):

Triatoma brasiliensis: Brasil: Ceará (Icó) e Piauí (Conceição do Canindé)
Triatoma delpontei: Argentina: Cordoba
Triatoma lecticularia: USA: Okalahoma (Waurika)
Triatoma rubrovaria: Brasil: Rio Grande do Sul (Caçapava do Sul)
Triatoma sordida: Brasil: São Paulo (Guaíra e Ibitinga)

3. Manutenção e Alimentação

No insetário, os insetos são mantidos em cristalizadores, à temperatura ambiente, em salas com pouca luminosidade. Os cristalizadores são fechados na parte superior com tecido de malha fina ou meia de seda.

A alimentação dos insetos é feita a cada quinze dias com sangue de pato. No centro dos cristalizadores é colocado um cilindro de cartolina, para apoio e acesso dos insetos aos patos, que são imobilizados com o abdomen parcialmente exposto aos insetos por 15 minutos. As aves não são transmissoras do *Trypanosoma cruzi*, não infectando portanto, as ninfas, que a partir do primeiro estádio, seis a oito dias depois de nascidas já sugam sangue.

É importante salientar que os insetos, machos adultos, sempre que necessário, eram trazidos para o experimento recém-alimentados e que, esses organismos resistem a até sete meses de jejum (Heeitzman-Fontenelle, 1972). Em nosso laboratório, os insetos foram mantidos em câmara escura, com a temperatura de 25ºC , $\pm$ 1ºC.

4. Órgão e Estágio Analisado.

No desenvolvimento deste trabalho, o órgão escolhido para a análise foi o testículo. Os testículos foram obtidos exclusivamente de indivíduos adultos machos das espécies anteriormente citadas, pois a espermiogênese em Heteroptera continua também na fase adulta, não terminando no estádio larval como, por exemplo, em Lepidoptera. Neste órgão, procurou-se estudar os diversos aspectos da meiose e também acompanhar o comportamento do nucléolo, bem como a localização das regiões heterocromáticas

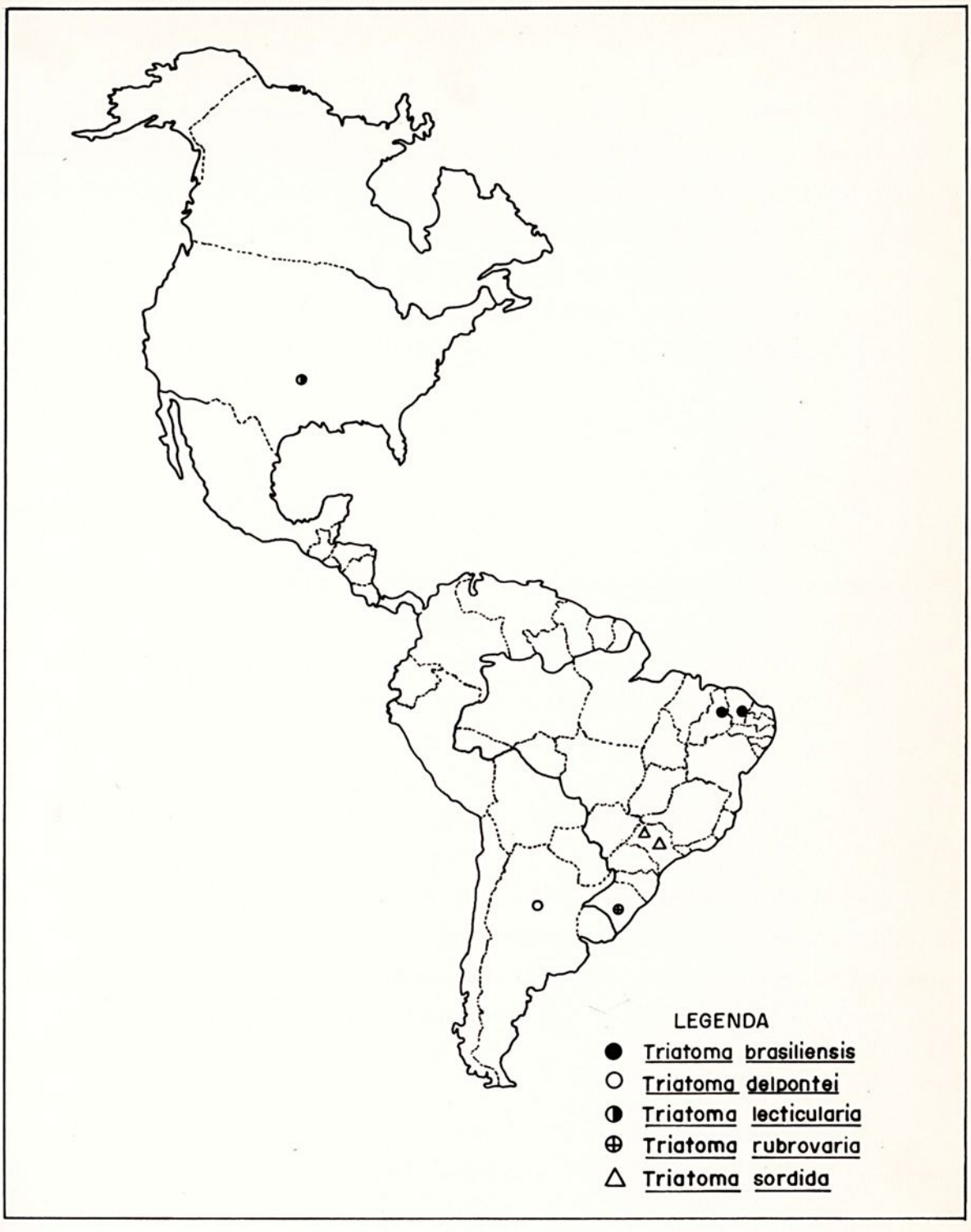


Figura 02 - Procedência geográfica das espécies de triatomíneos analisadas no presente trabalho.

5. Preparação e Coloração das Lâminas.

As lâminas e lamínulas empregadas nas preparações citológicas foram previamente submetidas ao seguinte tratamento: foram colocadas no detergente por 30 minutos, esfregadas individualmente e colocadas numa cuba com água, por uma hora. Em seguida foram lavadas uma a uma em água corrente e transferidas para outra cuba contendo solução sulfocrômica forte, onde permaneceram por uma hora. As lâminas foram então enxaguadas em água deionizada, seguindo-se a secagem ao ar , sendo que as lamínulas eram mantidas em álcool 70% na geladeira.

Neste trabalho, foram utilizadas as seguintes técnicas citológicas:

5.1. Esmagamento celular.

A. Esmagamento e coloração pela Orceína lacto-acética (De Vaio **et alii**, 1985, com algumas modificações).

a. Dissecar o inseto em solução fisiológica de Demerec;
b. Depositar os túbulos seminíferos em solução aquosa de ácido acético a 45%; por 01 minuto;
c. Transportar o material para solução de orceína lacto-acética por 10 minutos;
d. Esmagar o material na solução de orceína lacto-acética entre lâmina e lamínula. O esmagamento é feito batendo-se delicadamente, com a ponta de um lápis borracha sobre a lamínula colocada sobre a lâmina estando ambas envolta em papel de filtro;
e. Lutar a lamínula com esmalte incolor.

B. Esmagamento e coloração pelo Nitrato de Prata

a. Dissecar o inseto em solução fisiológica de Demerec;
b. Transportar o órgão para uma solução aquosa de ácido acético a 45% por 01 minuto;
c. Transportar o órgão para solução aquosa de ácido lático a 50% por 5 minutos;
d. Esmagar em ácido acético a 45 % entre lâmina e lamínula;
e. Depositar as lâminas em câmara úmida por aproximadamente 10 minutos;

f. Retirar a lamínula com o auxílio de nitrogênio líquido. Este processo consiste em congelar a lâmina em nitrogênio líquido e retirar a lamínula, forçando-a com uma gilete e deixar secar ao ar. As lâminas secas podem ser guardadas no freezer por vários dias.

A coloração pelo Nitrato de Prata foi feita segundo a técnica de Howell e Black (1980), como descrita a seguir:

a. Tratar a lâmina com o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de ácido fórmico);
b. Adicionar sobre esta, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las;
c. Cobrir com lamínula;
d. Incubar as lâminas em estufa a 70ºC de 8 a 11 minutos, em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada, até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada;
e. Lavar a lâmina em água deionizada até que a lamínula se desprenda e deixar secar ao ar

5.2. Suspensão Celular (Segundo Cella, 1986, informação pessoal)

No preparo das lâminas, há duas fases a saber: colchicinização e fixação.

A colchicinização consiste em injetar no abdomen do inseto adulto 0,5 ml de colchicina a 0,01% e deixar 2 horas, para que ocorra acúmulo de metáfases.

A fixação segue os passos descritos a seguir:

a. Abrir o abdomen do inseto em solução fisiológica e retirar os testículos, transferindo-os para uma placa escavada, também contendo solução fisiológica para insetos;
b. A seguir, colocá-los em solução hipotônica (água de torneira) por 5 minutos. Acompanhar à lupa para verificar o grau de turgescência das células. Caso não tenha ocorrido a turgescência, aumentar o tempo;
c. Fixar em dois banhos de Carnoy (metanol-ácido acético, na proporção 3:1), por 15 minutos cada. O testículo assim fixado pode ser guardado em Carnoy na geladeira por até 3 anos.

unesp

d. Colocar o testículo em uma placa escavada pequena com Carnoy sob a lupa e escolher um túbulo seminífero, transferindo-o para uma lâmina escavada contendo ácido acético a 45%.
e. Afundar o material que se dissocia logo após;
f. Suspender o material com uma pipeta Pasteur, repetindo a suspensão várias vezes até que o material fique completamente dissociado;
g. Gotejar o material sobre a lâmina limpa com uma pipeta, mantendo esta mais ou menos a 70cm distante da lâmina;
h. Colocar a lâmina em placa aquecida (aproximadamente 40ºC) até que fique totalmente seca.

Após o preparo das lâminas, seguem-se as colorações por Giemsa a 5% por 10 min., por Nitrato de Prata como descrito anteriormente, ou ainda, por bandamento C.

5.3. Bandamento C

O bandamento C foi realizado segundo a técnica de Sumner (1972), com algumas modificações, como descrito a seguir:

a. Tratar o material com ácido clorídrico 0,2N a temperatura ambiente (aproximadamente 25ºC) por 15 minutos;
b. Lavar uma vez rapidamente em água deionizada gelada;
c. Lavar uma vez em água deionizada à temperatura ambiente;
d. Secar ao ar;
e. Tratar com Hidróxido de Bário filtrado a 5% por 15 minutos à temperatura de 60ºC;
f. Lavar várias vezes em água deionizada;
g. Incubar em 2XSSC, pH 7,0 por 1 hora a 60ºC;
h. Dar um banho rápido em água deionizada contendo 3 a 4 gotas de ácido acético glacial;
i. Dar 3 banhos rápidos em água deionizada e secar ao ar;
j. Corar com solução de Giemsa a 3% em tampão fosfato, pH 6,8 por 20 minutos e secar novamente ao ar.

5.4. Reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1980)

a. Hidrolisar o material em HCl 1N, a 60ºC durante 10-15 minutos, dependendo do tipo de célula e de seu grau de compactação cromatínica;
b. Lavar três vezes em água destilada;
c. Tratar com Reativo de Schiff à temperatura ambiente por 40 minutos;
d. Lavar três vezes (5 minutos cada) em água sulfurosa;
e. Lavar em água destilada;
f. Desidratar, diafanizar e montar.

6. Procedimento para a Análise das Lâminas

Nas lâminas coradas com Orceína lacto-acética e Giemsa, foram observados o número de corpúsculos heterocromáticos, bem como a disposição dos cromossomos meióticos e mitóticos na placa metafásica.

Já nas lâminas coradas com Nitrato de Prata, foi observado o número de corpúsculos nucleolares e, sempre que possível, tentou-se determinar a localização das Regiões Organizadoras Nucleolares nos cromossomos meióticos.

Através da Reação de Feulgen, procurou-se neste trabalho, apenas evidenciar a presença do DNA, dispensando-se a realização de uma acurada análise quantitativa do mesmo, o que será realizado posteriormente.

Analisaram-se também, lâminas coradas pelo bandamento C, nas quais destacam-se a heterocromatina, tanto nos tipos nucleares, como nos cromossomos meióticos.

Posteriormente, o cariótipo das espécies foi montado através da identificação dos possíveis pares cromossômicos com base no tamanho e morfologia dos mesmos.

Para a obtenção de todas essas informações, não se estabeleceu um número ótimo de indivíduos a ser analisado, ou seja, foram analisados tantos indivíduos quantos necessários, para que se pudesse realizar as comparações desejadas e assim, fossem alcançados os objetivos propostos.

7. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas em Microscópio Zeiss Standard Junior (166), com sistema fotográfico MC-63 automático acoplado utilizando-se filme Kodak Plus X-Plan 125 ASA ou Ilford 50 ASA e papéis fotográfico Kodak Kodabromide F3. As fotos foram reveladas e ampliadas no laboratório fotográfico do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP), de acordo com as técnicas rotineiras empregadas neste.

Em todas as figuras, a ampliação final corresponde a 1250 vezes, tendo sido calculada da seguinte forma:

A - Ampliação dos negativos:

10 x 100 x 1,25 x 0,25 = 312,5 vezes, onde,

10 = aumento da ocular;
100 = aumento da objetiva;
1,25 = aumento da optovar e,
0,25 = fator de correção do microscópio.

B - Ampliação das fotos:

312,5 x 4 = 1250 vezes, onde,

312,5 = ampliação do negativo e,
4,0 = aumento do ampliador fotográfico.

III - RESULTADOS

Os resultados serão apresentados segundo as colorações empregadas, seqüencialmente para as espécies *T. brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, procurando-se esquematizar o ciclo meiótico destas em cada caso. Este mesmo esquema de apresentação será utilizado na discussão, para permitir a detecção de aspectos similares e diferenciáveis da meiose destas espécies, os quais conduzirão à diversas conclusões.

As principais observações realizadas no presente trabalho, através das técnicas de esmagamento ou suspensão celular dos testículos de indivíduos adultos de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* e posteriores colorações com orceína lacto-acética, Giemsa, Feulgen, nitrato de prata e bandamento C, estão resumidamente descritas na Tabela 02.

1. COLORAÇÃO COM ORCEÍNA LACTO-ACÉTICA E GIEMSA

As colorações com orceína lacto-acética e com Giemsa destacam a eucromatina e a heterocromatina, corando a segunda mais fortemente que a primeira.

1.1. Meiose de *Triatoma brasiliensis* (20A + XY)

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentaram um único corpúsculo heterocromático (Figs. 03**a**, 03**b** e 22**a**). Os núcleos das espermatogônias, durante a intérfase, apresentaram os cromossomos sexuais formando um corpo compacto, heterocromático, mais ou menos arredondado, podendo-se observar em alguns destes, a sua natureza vesiculosa (Figs. 04**a,** 04**b**,23**a** e 23**b**).

O complemento cromossômico diplóide apresentou-se com 22 cromossomos, ou seja, a metáfase espermatogonial consistia de 20 autossomos mais os cromossomos sexuais XY nos machos. Os cromossomos sexuais X e Y eram equivalentes um ao outro em tamanho. Nota-se ainda, a presença de finos filamentos unindo os cromossomos (Figs. 05**a**, 05**b** e 24**a**).

Na prófase I, especialmente no "estágio confuso", observou-se uma nítida região heterocromática, às vezes única ou bipartida, relacionada sempre com a presença dos cromossomos sexuais (figs. 06**a**, 06**b**, 25**a** e 25**b**). Durante o diplóteno, os cromossomos sexuais permaneceram heteropicnóticos e portanto, facilmente distinguíveis dos demais (Figs. 07**a**, 07**b** e 26**a**).

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

As metáfases I mostraram os cromossomos sexuais localizados no centro de um anel formado pelos autossomos ou ainda, uma distribuição aparentemente aleatória destes (Figs. 08**a** e 08**b**), ao passo que, na metáfase II, os cromossomos sexuais sempre estavam no centro de um círculo ou anel formado pelos autossomos (Figs.09**a** e 09**b**). Percebeu-se que um dos cromossomos sexuais (provavelmente o Y) era maior que o outro, fato que pode ser comprovado nitidamente observando-se as Figs.10**a** e 10**b**. Na observação das metáfases vistas lateralmente, não se notou a presença de cromossomos retardatários (Fig. 11**a**).

Observou-se que na anáfase I, os autossomos segregavam regularmente enquanto os cromossomos sexuais se dividiam equacionalmente, sendo que a divisão segregacional destes somente ocorria na segunda divisão. Desta maneira, durante a anáfase da segunda divisão, não havia uma divisão dos cromossomos sexuais, mas sim uma separação no sentido que o X se translocava com 10 autossomos de uma das placas filhas para um centríolo e o Y com os 10 autossomos da segunda placa filha para o outro centríolo. Esta fase mostrou também, a presença de cromossomos migrando tardiamente (Figs. 12**a** e 12**b**). Estes cromossomos retardatários porém, já não foram mais vistos durante as fases mais adiantadas da anáfase (Figs. 13**a** e 13**b**) e nem durante a telófase (Figs. 14**a** e 14**b**).

As espermátides no início da espermiogênese apresentaram núcleos condensados e com citoplasma abundante (Figs. 15**a** e 15**b**), sendo que, em fases mais adiantadas, notou-se claramente uma mudança de sua forma (Figs. 16**a** e 16**b**). O cariótipo de *T. brasiliensis*, bem como um exemplar representativo desta espécie encontram-se ilustrados na Fig. 17.

1.2. Meiose de *Triatoma delpontei* (20A + XY)

Nesta espécie, os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares mostraram várias marcações heterocromáticas (cromocentros), de tamanhos diversos (Figs. 03**c**, 22**b** e 22**c**), enquanto os núcleos interfásicos das espermatogônias (Figs. 04**c** e 23**c**) possuiam apenas um corpúsculo evidente, o qual chamou a atenção pelo seu tamanho. O número variável de cromocentros vistos nos núcleos poliplóides confirmaram a presença de regiões heterocromáticas em alguns dos cromossomos desta espécie.

As metáfases espermatogoniais apresentaram 22 cromossomos, dos quais concluiu-se serem 20 autossomos e 02 sexuais. Os mesmos não apresentavam um arranjo característico, ocupando toda a placa equatorial (Figs. 05**c** e 24**b**). Verificou-se também, que alguns dos autossomos apresentavam uma região heterocromática em uma das extremidades cromossômicas (Fig. 05**c**).

Durante a prófase meiótica, no "estágio confuso", observou-se a presença de um ou dois pontos heteropicnóticos, representativos dos cromossomos sexuais (Figs. 06**c** e 25**c**), que também podem ser vistos no diplóteno (Figs. 07**c** e 26**b**).

Na metáfase I e II, os cromossomos adotaram a configuração típica de outros triatomíneos, ou seja, os autossomos formaram um círculo ou anel, cujo centro era ocupado pelos cromossomos sexuais (Figs. 08**c**, 09**c**, 10**c**, 27**a**, 27**b** e 28**a**). Estes, nesta espécie, eram quase indistinguíveis um do outro. Nenhum cromossomo deslocado foi encontrado quando se analisou metáfases em vista lateral (Figs. 11**b** e 11**c**).

As fases iniciais da anáfase mostraram a presença de cromossomos retardatários, (Fig. 12**c**), sendo que os mesmos não estavam presentes nas fases mais adiantadas (Fig. 13**c**), como não estavam presentes também, na fase de telófase (Fig. 14**c**).

As espermátides novamente mostraram citoplasma abundante e forma arredondada no início da espermiogênese (Fig. 15**c**). ao passo que a forma se modifica, conforme este processo se acentua (Fig. 16**c**).

O cariótipo de *T. delpontei*, bem como um exemplar representativo desta espécie encontram-se ilustrados na Fig. 18.

1.3. Meiose de *Triatoma lecticularia* (20A + XY)

Os resultados obtidos através da coloração com orceína lacto-acética e Giemsa nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos seminíferos e nos núcleos interfásicos das espermatogônias de *T. lecticularia* foram idênticos, ou seja, ambos apresentaram uma marcação heterocromática mais evidente e, alguns outros pontos também destacados (Figs. 03**d**, 04**d**, 22**d** e 23**d**).

Os dez pares de autossomos que compõem a metáfase espermatogonial consistiam, de acordo com Ueshima (1966) de quatro grandes pares, três pares intermediários e três pequenos pares de cromossomos. Os cromossomos sexuais, X e Y, indistinguíveis um do outro, eram do tamanho dos autossomos intermediários (Figs. 05**d** e 24**c**).

Os cromossomos sexuais X e Y eram heteropicnóticos durante a prófase I e se aproximavam um do outro no "estágio confuso" (Figs. 06**d** e 25**d**). Durante o diplóteno, já podia-se distinguir a estrutura de tétrade de cada bivalente, além dos cromossomos sexuais, que constituiam uma massa heteropicnótica bipartida (Fig. 07**d**).

As 10 tétrades e os 02 cromossomos sexuais arranjavam-se na região equatorial da placa metafásica do espermatócito I, de modo que, usualmente, um dos autossomos colocava-se juntamente com os cromossomos sexuais, um pouco

mais no centro do anel formado pelas outras 09 tétrades (Figs. 08**d** e 27**c**). Raramente encontraram-se metáfases I sem esta ordenação dos cromossomos.

Na metáfase II, novamente os cromossomos sexuais adotavam o comportamento típico para os triatomíneos, permanecendo portanto, no centro do anel formado pelos l0 autossomos (Figs. 09**d**, 10**d** e 28**b**). Nas metáfases laterais analisadas, não se detectou a presença de cromossomos retardatários (Fig. 11**d**), sendo que estes podiam (Fig. 12**d**) ou não (Fig. 13**d**) estar presentes na anáfase. Novamente, não se verificou a presença destes na telófase (Fig. 14**d**).

As espermátides apresentaram forma ovalada e citoplasma abundante no início da espermiogênese (Fig. 15**d**), sendo que esta forma era alterada gradualmente, conforme este processo se completava (Fig. 16**d**).

O cariótipo de *T. lecticularia*, bem como um exemplar representativo desta espécie encontram-se ilustrados na Fig. 19.

1.4.Meiose de *Triatoma rubrovaria* (20A + XY)

Novamente, os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares e os núcleos espermatogoniais apresentaram apenas um corpúsculo heterocromático (Figs. 03**e** e 04**e**), quando corados com orceína lacto-acética, sendo que, após a coloração com Giemsa, os primeiros apresentaram o cromocentro formado por várias regiões condensadas (Fig. 22**e**) e, os núcleos espermatogoniais, novamente apresentaram apenas um corpúsculo heterocromático (Fig. 23**e**).

Triatoma rubrovaria foi estudada citologicamente por Schreiber e Pellegrino (1950) e por Ueshima (1966). O número cromossômico de seus achados, foram coincidentes com os encontrados no presente trabalho, onde o complemento cromossômico desta espécie foi de 20 autossomos mais XY no macho (Figs. 05**e** e 24**d**).

Cromatina difusa e cromossomos sexuais condensados caracterizaram o início da prófase meiótica desta espécie. Durante o "estágio confuso", os bivalentes autossômicos estavam desespiralizados e eram individualmente indistinguíveis; os cromossomos X e Y, por sua vez, associavam-se formando uma estrutura única ou bipartida (Figs. 06**e** e 25**e**). Já no diplóteno, os 10 bivalentes autossômicos eram distingüíveis individualmente. O X e o Y ainda associados, foram vistos como dois pontos heteropicnóticos (Figs. 07**e** e 26**c**). Esta associação desfazia-se durante a diacinese, quando eles tornavam-se isopicnóticos .

Nas metáfases I e II, os cromossomos sexuais colocavam se no centro do anel formado pelos autossomos, como já descrito anteriormente para *T. delpontei*,

sendo que neste caso foi possível distinguir o cromossomo X (possivelmente o menor) do Y (Figs. 08**e**, 10**e**, 27**d** e 28**c**).

Não se observou nesta espécie, a presença de cromossomos retardatários quando foram analisadas metáfases laterais (Fig. 11**e**), final de anáfase (Fig. 13**e**) e telófase (Fig. 14**e**). Porém, no início da anáfase, eles sempre puderam ser observados (Fig. 12**e**).

As espermátides desta espécies, apresentaram as mesmas características das espécies anteriormente descritas (Figs. 15**e** e 16**e**).

O cariótipo de *T. rubrovaria*, bem como um exemplar representativo desta espécie encontram-se ilustrados na Fig. 20.

1.5. Meiose de *Triatoma sordida* (20A + XY)

A coloração com orceína lacto-acética destacou nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma sordida* apenas um corpúsculo heterocromático (Fig. 03**f**), ao passo que a coloração com Giemsa destacou nestes mesmos núcleos, quatro regiões condensadas e múltiplos pontos destacados na eucromatina (Fig. 22**f**). Contrariamente, nos núcleos espermatogoniais em intérfase, corados com orceína lacto-acética, evidenciou-se a presença de dois ou mais destes corpúsculos (Fig. 04**f**), enquanto que nestes mesmos núcleos corados com Giemsa, obteve-se a presença de um único corpúsculo heterocromático (Fig. 23**f**).

O número cromossômico desta espécie foi 22, dos quais 20 eram autossomos e 02 eram sexuais (Fig. 05**f**).

O "estágio confuso" da prófase I mostrou um corpúsculo heterocromático, mais alguns pontos destacados (Figs. 06**f** e 25**f**). Este mesmo cromocentro pode ser visto também no diplóteno, onde percebe-se a nítida individualização dos cromossomos sexuais que o compõem (Figs. 07**f** e 26**d**).

O processo meiótico desta espécie foi muito similar ao das espécies anteriormente descritas. Na metáfase I, o X e o Y usualmente permaneciam no centro de um anel formado pelas 10 tétrades autossômicas e dividiam-se equacionalmente na anáfase I (Fig. 08**f**). Quando a metáfase II era formada, os cromossomos sexuais novamente tomavam uma posição central no anel formado pelos autossomos (Figs. 09**e**, 09**f**, 10**f** e 28**d**) e passavam para polos opostos na anáfase II.

Nas metáfases laterais (Fig. 11**f**), final de anáfase (Fig. 13**f**) e na telófase (Fig. 14**f**), não se observou a presença de cromossomos retardatários, os quais puderam ser encontrados nas anáfases iniciais analisadas (Fig. 12**f**).

As espermátides analisadas, apresentaram o mesmo padrão de comportamento que as espécies anteriores (Figs.15**f** e 16**f**).

O cariótipo de *T. sordida*, bem como um exemplar representativo desta espécie encontram-se ilustrados na Fig. 21.

2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

A coloração com nitrato de prata evidencia as massas correspondentes aos nucléolos, as quais coram-se em marrom escuro, enquanto a heterocromatina permanece clara. Dessa maneira, a coloração com nitrato de prata, mostra uma especificidade inversa à da coloração anterior.

Os resultados obtidos com a coloração com nitrato de prata em testículos de indivíduos adultos de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia, T. rubrovaria* e *T. sordida*, estão descritos a seguir.

2.1. Triatoma brasiliensis

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* apresentaram várias pequenas marcações nucleolares (Figs. 29**a** e 29**b**) distribuídas pela cromatina. Já os núcleos espermatogoniais em intérfase por sua vez, apresentaram apenas uma marcação nucleolar, contendo algumas vezes, estruturas semelhantes a vesículas no seu interior (Figs. 30**a** e 30**b**).

As metáfases espermatogoniais não apresentaram marcações nítidas (Fig. 31**a**). Entretanto, na prófase I, especialmente no "estágio confuso", verificou-se uma marcação bem intensa, na qual percebe-se nitidamente sua estrutura vesiculosa (Figs. 32**a** e 32**b**)

As metáfases da primeira divisão meiótica mostram, aparentemente, alguma marcação em um ou dois cromossomos, sendo que nas metáfases da segunda divisão meiótica, nenhuma indicação de marcação cromossômica pode ser constatada (Figs. 33**a**, 34**a** e 34**b**).

As espermátides, na fase inicial da espermiogênese, apresentaram nitidamente uma marcação maior e vários outros pontos dispersos no núcleo (Figs. 35**a** e 35**b**), ao passo que numa fase mais adiantada, somente uma única marcação foi encontrada (Figs. 36**a** e 36**b**).

2.2. *Triatoma delpontei*

As observações, utilizando a técnica de coloração com nitrato de prata nesta espécie, revelaram que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos seminíferos apresentam várias marcações nucleolares de diferentes tamanhos (Fig. 29**c**). A grande e única marcação presente nos núcleos espermatogoniais em intérfase, por sua vez, evidenciam claramente sua natureza vesiculosa (Fig. 30**c**).

Novamente, nenhuma marcação foi encontrada nas metáfases espermatogoniais (Fig. 31**c**). Entretanto, no "estágio confuso" da prófase I desta espécie, uma grande massa nucleolar pode ser observada (Fig. 32**c**).

A análise de placas metafásicas das primeira e segunda divisões meióticas, nos permite afirmar que nenhuma marcação, nítida ou tênue, foi verificada nesta espécie (Figs. 33**b**, 33**c**, 34**c** e 34**d**).

As espermátides, em estágio inicial e mais avançado, responderam ao método com uma ou duas marcações e uma marcação respectivamente (Figs. 35**c** e 36**c**).

2.3. *Triatoma lecticularia*

Testículos de indivíduos adultos de *T. lecticularia* submetidos ao esmagamento e posterior coloração com nitrato de prata, mostraram o seguinte:

Os núcleos poliplóides das células nutritivas apresentaram-se com três ou mais marcações (Fig. 29**d**). Os núcleos interfásicos espermatogoniais sempre apresentaram apenas uma marcação de natureza vesiculosa (Fig. 30**d**), as quais se repetiam nos núcleos em prófase um pouco mais adiantada ("estágio confuso") (Fig. 32**d**).

As metáfases analisadas, espermatogoniais ou da segunda divisão meiótica, não apresentaram nenhuma marcação nítida, como já descrito para as espécies anteriores (Figs. 31**c**, 31**d** e 34**e**).

Nas espermátides em fase inicial de espermiogênese, pode-se verificar a presença de uma, duas, três ou quatro pequenas marcações (Fig. 35**d**).

unesp

2.4. *Triatoma rubrovaria*

Os resultados obtidos através da coloração com nitrato de prata, podem ser resumidos como segue:

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares mostraram várias marcações nucleolares (Fig. 29**e**), enquanto que apenas uma marcação de aspecto vesiculoso pode ser verificado nos núcleos espermatogoniais (Fig. 30**e**). Uma única marcação também foi verificada nos núcleos em prófase I, no "estágio confuso" (Fig. 32**e**).

As metáfases espermatogoniais entretanto, não apresentaram nenhuma marcação nítida (Fig. 31**e**), ao passo que as espermátides no início da espermiogênese (Fig. 35**e**), apresentaram uma ou duas evidentes marcações.

2.5. *Triatoma sordida*

A análise dos testículos, submetidos ao esmagamento e posterior coloração com nitrato de prata, em adultos de *T. sordida*, revelou que:

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentaram vários corpúsculos corados pelo nitrato de prata (Fig. 29**f**). A natureza vesiculosa novamente pode ser constatada na única marcação presente nos núcleos espermatogoniais em intérfase (Fig. 30**f**).

Diferentemente das outras espécies analisadas, pode-se verificar em *T. sordida*, a presença de um ou dois blocos marcados pela prata, no "estágio confuso" da prófase I meiótica (Fig. 32**f**).

As metáfases espermatogoniais (Fig. 31**f**) e da segunda divisão meiótica (Fig. 34**f**), não apresentaram qualquer marcação pela prata. Porém, quando se analisava metáfases da primeira divisão meiótica, pode-se observar, algumas vezes, a presença de uma marcação em um dos cromossomos desta espécie (Fig. 33**d**).

As espermátides, no início da espermiogênese, apresentaram preferencialmente duas marcações (Fig. 35**f**), enquanto que em fases mais adiantadas deste processo, apenas uma marcação por espermátide pode ser encontrada (Fig. 36**d**).

3. REAÇÃO DE FEULGEN

A reação de Feulgen foi descrita em 1924 por Feulgen e Rosenbeck, como específica para o DNA, a partir de pesquisas sobre as aplicações do uso de um reagente desenvolvido por Schiff e, denominado reativo de Schiff, sendo utilizado em química orgânica para a caracterização de aldeídos. Como resultado desta reação, forma-se um complexo corado, vermelho violáceo, específico do DNA. Quando esta técnica é aplicada em preparações citológicas, ela mostra que o DNA está localizado no núcleo celular e, mais precisamente, nos cromossomos. Se a preparação é previamente tratada com desoxirribonuclease, enzima que cataliza especificamente a hidrólise do DNA, nada se cora, o que confere à reação de Feulgen, um real valor citoquímico.

3.1. *Triatoma brasiliensis*

Os resultados obtidos no presente trabalho,utilizando a técnica de esmagamento dos testículos de *T. brasiliensis* e posterior coloração pela reação de Feulgen, levaram às seguintes conclusões:

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentaram dois aspectos diferentes: vários corpúsculos (Fig. 37**a**) ou um único corpúsculo heterocromático (Fig. 37**b**).

Os núcleos interfásicos das espermatogônias mostraram os cromossomos sexuais formando um corpo heterocromático, mais ou menos arredondado (Figs. 38**a** e 38**b**).

O complemento cromossômico diplóide é 22 nesta espécie. A metáfase espermatogonial consiste de 20 autossomos mais XY no macho. Não há uma orientação específica para os cromossomos nesta fase, porém, nota-se a presença de delicados filamentos unindo os cromossomos (Figs. 39**a** e 39**b**).

Na prófase I, especificamente no "estágio confuso", o bloco heterocromático formado pelos cromossomos sexuais é bastante nítido, podendo-se, em alguns casos, visualizar os dois elementos que o compõem (Figs. 40**a** e 40**b**). No diplóteno, este bloco heterocromático ainda pode ser visto como um ou dois pontos mais destacados (Figs. 41**a** e 41**b**).

3.2. *Triatoma delpontei*

As principais observações realizadas no presente trabalho, através da técnica de esmagamento dos testículos de *T. delpontei* e posterior coloração pela reação de Feulgen, estão descritas a seguir, sinteticamente:

Os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentaram várias marcações heterocromáticas (Fig. 37**c**). Já os núcleos espermatogoniais interfásicos, apresentaram apenas uma grande e evidente marcação (Fig. 38**c**).

Aparentemente, esta mesma marcação ocorre nos núcleos em prófase I, na fase denominada "estágio confuso" (Fig. 40**c**), sendo visível também, até o diplóteno. Entretanto, nesta fase, apenas dois pontos mais heteropicnóticos são distinguíveis (Fig. 41**c**).

Nas metáfases espermatogoniais analisadas, pode-se constatar a presença de 22 cromossomos, além de delicados filamentos unindo-os (Fig. 39**c**).

Metáfases da segunda divisão meiótica, vistas frontalmente, apresentaram os 10 bivalentes autossômicos dispostos em forma de círculo ao redor dos 02 cromossomos sexuais (XY). Pode-se verificar ainda, a presença de uma extremidade heterocromática em alguns cromossomos desta espécie (Figs. 42**a** e 42**b**).

As anáfases analisadas (Figs. 43**a** e 43**b**), não evidenciaram a presença de cromossomos retardatários.

3.3. *Triatoma lecticularia*

Testículos de indivíduos adultos de *T. lecticularia,* submetidos ao esmagamento e posterior coloração pela reação de Feulgen, mostraram que os núcleos poliplóides da parede dos túbulos testiculares apresentaram-se com uma única marcação heterocromática (Fig. 37**d**). Esta mesma marcação única, também foi verificada nos núcleos espermatogoniais em intérfase (Fig. 38**d**).

As metáfases espermatogoniais (Fig. 39**d**) apresentaram-se com 22 cromossomos, podendo-se notar em alguns deles, alguns pontos heterocromáticos.

O "estágio confuso", apresentou uma nítida região heterocromática maior e, alguns pontos heterocromáticos adicionais (Fig. 40**d**). No entanto, apenas um ponto heterocromático pode ser evidenciado no diplóteno (Fig. 41**d**).

Na anáfase (Fig. 43**c**) nota-se a presença de cromossomos migrando tardiamente; trata-se, provavelmente, dos cromossomos sexuais.

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

3.4. *Triatoma rubrovaria*

A análise dos testículos de *T. rubrovaria* submetidos à reação de Feulgen revelou que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares e os núcleos espermatogoniais em intérfase, apresentaram uma única marcação heterocromática (Figs. 37**e** e 38**e**).

As metáfases espermatogoniais mostraram-se sem um arranjo característico com os cromossomos ocupando toda a placa equatorial (Fig. 39**e**). Pode-se notar nesta espécie também, a presença de delicados filamentos unindo os cromossomos.

O "estágio confuso" e o diplóteno responderam à esta técnica com uma nítida região heterocromática, na maioria das vezes bipartida, mas outras vezes, única (Figs. 40**e** e 41**e**).

As metáfases da segunda divisão meiótica, mostraram-se com o arranjo característico de outros triatomíneos, ou seja, os cromossomos sexuais se colocaram no centro de um anel formado pelos autossomos. Nota-se também, nas metáfases analisadas, a presença de quatro autossomos mais heteropicnóticos (Figs. 42**c** e 42**d**).

As anáfases não mostraram a presença de cromossomos retardatários (Fig. 43**d**).

3.5. *Triatoma sordida*

Os resultados obtidos através da reação de Feulgen em testículos de *T. sordida* mostraram nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares uma única marcação heterocromática (Fig. 37**f**), ao passo que nos núcleos espermatogoniais em intérfase uma, duas ou mais marcações puderam ser verificadas (Fig. 38**f**).

As metáfases espermatogoniais tornaram evidente, também nesta espécie, a presença de filamentos unindo os cromossomos (Fig. 39**f**).

No "estágio confuso", nota-se a presença de uma marcação heterocromática bipartida, representativa dos cromossomos sexuais, além de alguns pontos heterocromáticos adicionais (Fig. 40**f**), sendo que o diplóteno (Fig. 41**f**), apresenta-se com as mesmas características.

4. BANDAMENTO C

A técnica do bandamento C, permite localizar a heterocromatina constitutiva de forma rápida e precisa. Durante os procedimentos desta técnica, o DNA é fragmentado e progressivamente eliminado dos cromossomos. Por razões ainda não bem esclarecidas, o DNA da heterocromatina constitutiva é menos extraído durante este processo que o restante do DNA. Aparentemente, a associação do DNA com as proteínas na heterocromatina é diferente e mais resistente às condições da técnica de bandamento C do que a associação DNA-proteínas da eucromatina, ocorrendo assim, a maior extração do DNA da eucromatina. Disto resulta que quando os cromossomos são corados, as regiões heterocromáticas coram-se mais fortemente, formando blocos escuros, denominados bandas C (C = constitutiva). O corante utilizado nesta técnica é o Giemsa, que cora sensivelmente os cromossomos, mesmo quando estes apresentam pouquíssima quantidade de DNA.

4.1 *Triatoma brasiliensis*

Os resultados obtidos pela técnica da banda C, mostraram nos núcleos poliplóides das células nutritivas dos túbulos testiculares e nos núcleos espermatogoniais em intérfase, uma marcação heterocromática em cada caso (Figs. 44**a**, 44**b**, 45**a** e 45**b**).

No "estágio confuso", esta mesma marcação se repete (Figs. 46**a** e 46**b**), sendo que no diplóteno, já é mais fácil distinguir os dois elementos que a compõe (Figs. 47**a** e 47**b**).

4.2. *Triatoma delpontei*

A análise dos testículos submetidos ao bandamento C revelou que os núcleos poliplóides apresentaram várias marcações, do mesmo modo que nas técnicas anteriores (Fig. 44**c**).

Os núcleos interfásicos das espermatogônias (Fig. 45**c**) foram corados exatamente na massa heterocromática, que nesta espécie é maior e bem evidenciada. Esta mesma, grande e evidente marcação heterocromática, também pode ser visualizada em núcleos no "estágio confuso", conforme mostra a Fig. 46**c**.

As metáfases da primeira divisão meiótica, mostraram algumas marcações heterocromáticas em uma das extremidades de alguns cromossomos desta espécie (Figs. 48**a** e 48**b**). Estas mesmas marcações também podem ser encontradas quando se analisa metáfases da segunda divisão meiótica, em vista frontal (Figs. 49**a** e 49**b**).

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

4.3. *Triatoma lecticularia*

As observações realizadas utilizando-se a técnica do bandamento C em machos de *T. lecticularia*, podem ser resumidas como segue:

Os núcleos poliplóides da parede dos túbulos testiculares apresentaram uma nítida marcação heterocromática (Fig. 44**d**), do mesmo modo que os núcleos espermatogoniais em intérfase (Fig. 45**d**)

No "estágio confuso" (Fig. 46**d**) e no diplóteno (Fig. 47**d**), uma única marcação heterocromática também estava presente, podendo-se entretanto, visualizar os dois cromossomos sexuais que possivelmente a compõem no diplóteno.

Nas metáfases da primeira e segunda divisões meióticas, há sugestão da presença de algumas extremidades heterocromáticas em alguns cromossomos (Figs. 48**c**, 48**d** e 49**c**).

4.4. *Triatoma rubrovaria*

Testículos de indivíduos adultos de *T. rubrovaria* submetidos ao esmagamento e posterior bandamento C, mostraram que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares possuem apenas uma marcação heterocromática (Fig. 44**e**).

Os núcleos espermatogoniais em intérfase e os núcleos que se encontravam na fase denominada "estágio confuso", também apresentaram uma única marcação heterocromática, quando submetidos ao bandamento C (Figs. 45**e** e 46**e**).

No diplóteno, uma marcação bipartida, pode ser reconhecida (Fig. 47**c**), enquanto que nas metáfases da segunda divisão meiótica, tais marcações não puderam ser verificadas (Fig. 49**d**).

4.5. *Triatoma sordida*

Em relação à *T. sordida*, pode-se dizer que a técnica do bandamento C, revelou uma única marcação heterocromática, quer nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares (Fig. 44**f**), quer nos núcleos espermatogoniais em intérfase (Fig. 45**f**), ou ainda, nos núcleos em prófase I, no "estágio confuso" (Fig. 46**f**).

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

Tabela 02. Resumo dos aspectos diferenciais e similares da meiose entre cinco espécies de triatomíneos, através da coloração com orceína lacto-acética, Giemsa, nitrato de prata, reação de Feulgen e bandamento C.

	Triatoma brasiliensis	*Triatoma delpontei*	*Triatoma lecticularia*	*Triatoma rubrovaria*	*Triatoma sordida*
1. Núcleos poliplóides das células nutritivas	Uma única marcação heterocromática e, várias marcações nucleolares	Várias marcações heterocromáticas e, várias marcações nucleolares	Uma única marcação heterocromática e, várias marcações nucleolares	Uma única marcação heterocromática e, várias marcações nucleolares	Uma única marcação heterocromática e, várias marcações nucleolares
2. Núcleos espermatogoniais em intérfase	Corpúsculo heterocromático único e um nucléolo	Corpúsculo heterocromático único e um nucléolo bem maior que o das outras espécies	Corpúsculo heterocromático único e um nucléolo	Corpúsculo heterocromático único e um nucléolo	Um corpúsculo heterocromático maior e vários pontos menores. Presença de um nucléolo
3. Metáfases espermatogoniais	20A + XY, com filamentos unindo os cromossomos. Não houve indicações de RONs	20A + XY, com filamentos unindo os cromossomos. Não houve indicações de RONs	20A + XY, com filamentos unindo os cromossomos. Não houve indicações de RONs	20A + XY, com filamentos unindo os cromossomos. Não houve indicações de RONs	20A + XY, com filamentos unindo os cromossomos. Não houve indicações de RONs
4. "Estágio confuso"	Cromossomos sexuais unidos, formando um bloco único ou bipartido, destacado	Cromossomos sexuais unidos, formando um bloco único ou bipartido destacado	Cromossomos sexuais unidos, formando um bloco único ou bipartido destacado	Cromossomos sexuais unidos, formando um bloco único ou bipartido destacado	Cromossomos sexuais unidos, formando um bloco único ou bipartido destacado
5. Diplóteno	Cromossomos sexuais próximos, formando um bloco heterocromático bipartido	Cromossomos sexuais próximos, formando um bloco heterocromático único ou bipartido	Cromossomos sexuais próximos, formando um bloco heterocromático único ou bipartido	Cromossomos sexuais próximos, formando um bloco heterocromático bipartido	Cromossomos sexuais próximos, formando um bloco heterocromático bipartido

Tabela 02. Continuação

	Triatoma brasiliensis	*Triatoma delpontei*	*Triatoma lecticularia*	*Triatoma rubrovaria*	*Triatoma sordida*
6. Metáfase I	10A + XY. Os cromossomos sexuais localizam se no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos. Evidência de RONs em alguns cromossomos	10A + XY. Os cromossomos sexuais localizam se no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos. Ausência de RONs. Bandas C em uma das extremidades de alguns autossomos	10A + XY. Os cromossomos sexuais localizam se no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos. Tênues bandas C em uma das extremidades de alguns autossomos	10A + XY. Os cromossomos sexuais localizam se no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos	10A + XY. Os cromossomos sexuais localizam se no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos. Pequena RON evidenciada em um cromossomo
7. Metáfase II	Cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos. Não houve indicações de RONs	Cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos. Não houve indicações de RONs. Pequenas bandas C nos telômeros de alguns cromossomos	Cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos. Não houve indicação de RONs. Indicação de bandas C nos telômeros de alguns cromossomos	Cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos. Presença de quatro cromossomos mais heteropicnóticos que os demais	Cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos. Não houve indicações de RONs.
8. Anáfase	Cromossomos sexuais retardatários presentes na fase inicial	Cromossomos sexuais retardatários presentes na fase inicial	Cromossomos sexuais retardatários presentes na fase inicial	Cromossomos sexuais retardatários presentes na fase inicial	Cromossomos sexuais retardatários presentes na fase inicial

Tabela 02. Continuação

	Triatoma brasiliensis	*Triatoma delpontei*	*Triatoma lecticularia*	*Triatoma rubrovaria*	*Triatoma sordida*
9. Telófase	Cromossomos sexuais retardatários ausentes	Cromossomos sexuais retardatários ausentes	Cromossomos sexuais retardatários ausentes	Cromossomos sexuais retardatários ausentes	Cromossomos sexuais retardatários ausentes
10. Espermátides em fase inicial da espermiogênese	Ausência de marcação heterocromática. Uma marcação nucleolar maior e vários pontos menores	Ausência de marcação heterocromática. Presença de um ou dois corpúsculos nucleolares	Ausência de marcação heterocromática. Presença de um, dois ou três corpúsculos nucleolares	Ausência de marcação heterocromática. Presença de um ou dois corpúsculos nucleolares	Ausência de marcação heterocromática. Presença preferencial de dois corpúsculos nucleolares
11. Espermátides em fase mais adiantada da espermiogênese	Ausência de marcação heterocromática. Presença de uma marcação nucleolar	Ausência de marcação heterocromática. Presença de uma marcação nucleolar	Ausência de marcação heterocromática	Ausência de marcação heterocromática	Ausência de marcação heterocromática. Presença de uma marcação nucleolar

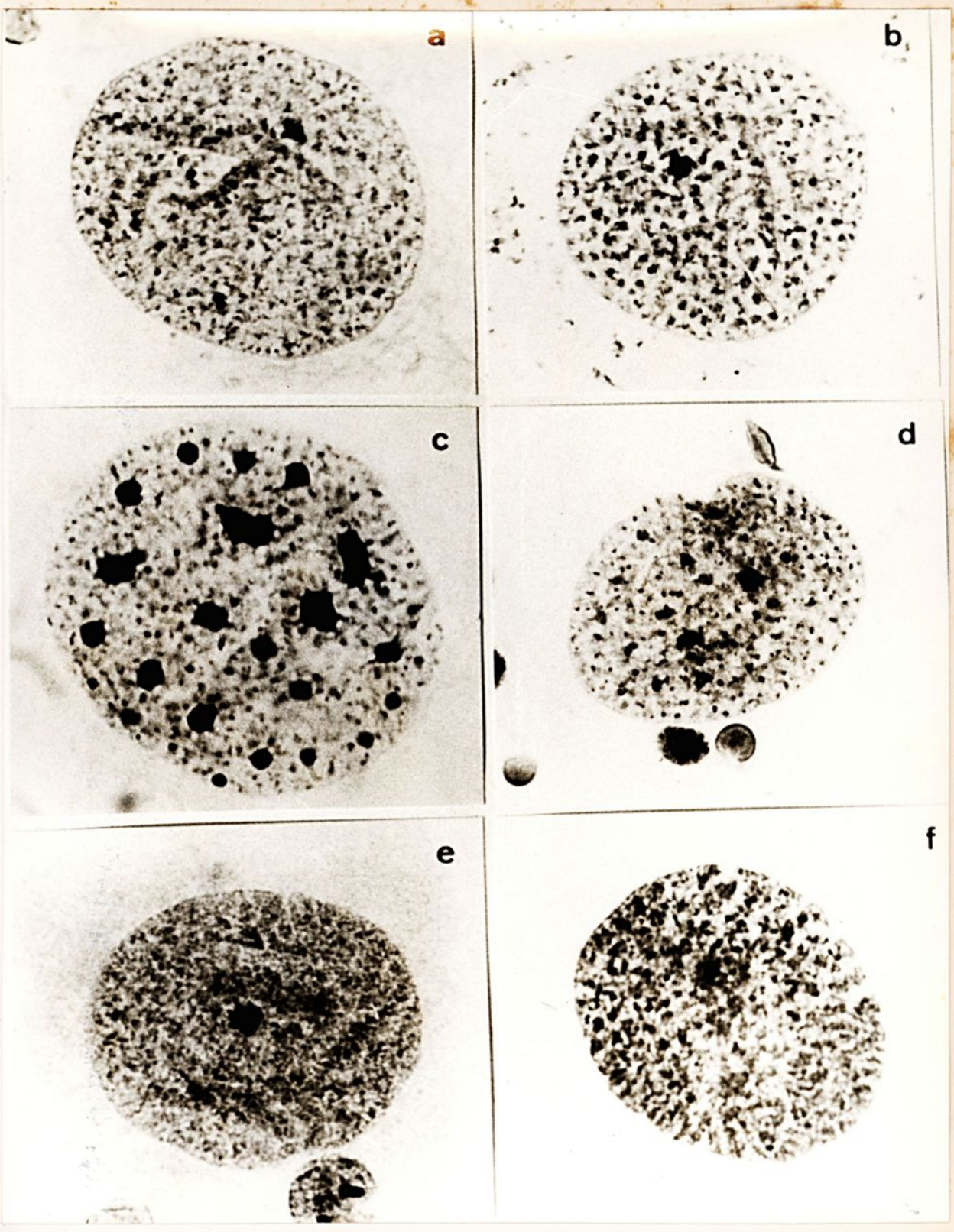


Fig. 03, **a-f**. Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular, corados com orceína lacto-acética. **a-b, e, f** - Núcleos poliplóides de *Triatoma brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* respectivamente, com um único corpúsculo heterocromático. **c** - Núcleo poliplóide de *Triatoma delpontei* mostrando vários corpúsculos heterocromáticos de diferentes tamanhos. **d** - Núcleo poliplóide de *Triatoma lecticularia* apresentando um corpúsculo heterocromático mais evidente e algumas marcações menores.

unesp

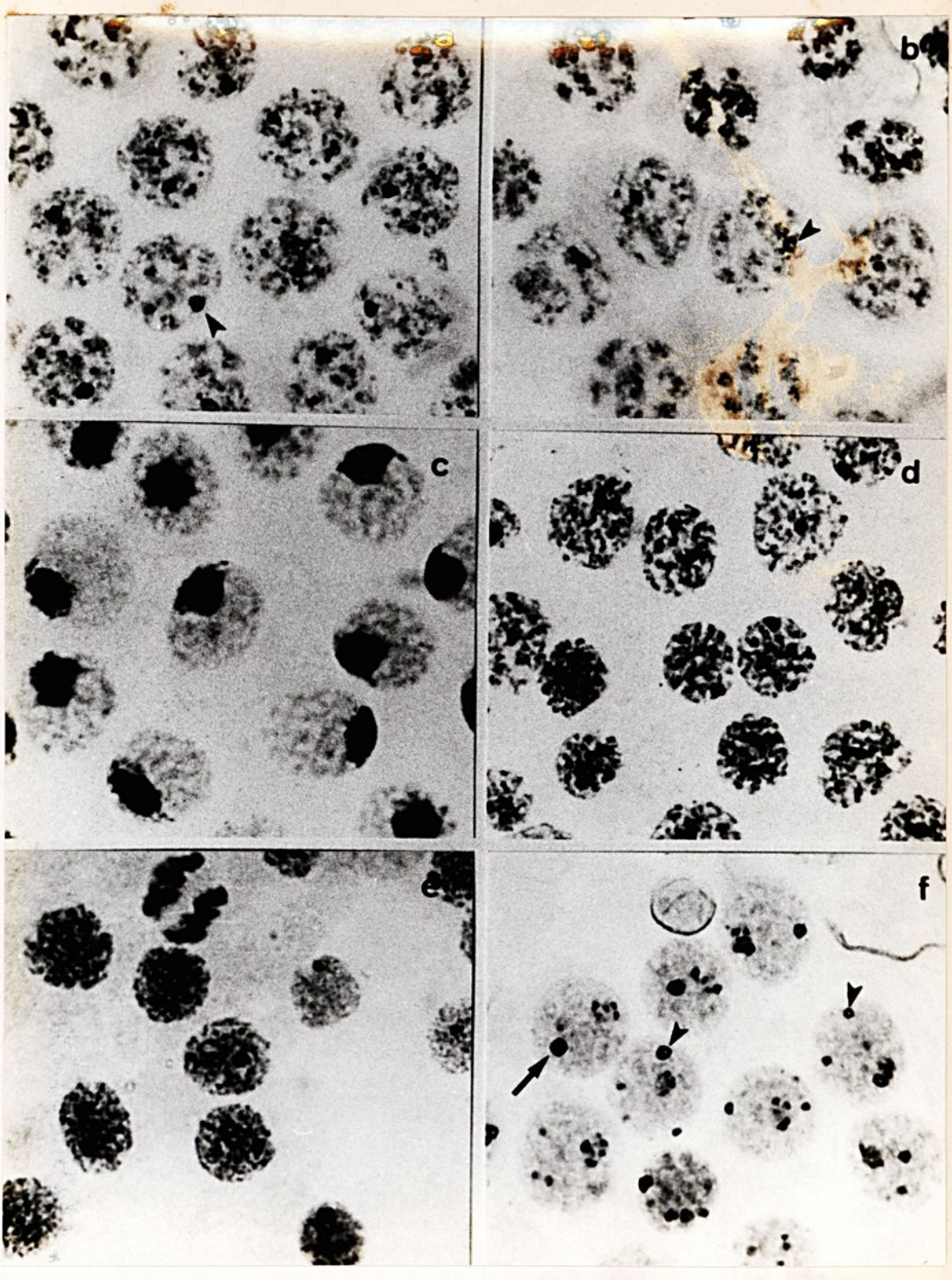


Fig. 04, **a-f**.Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida,* corados com orceína lacto-acética, mostrando, no caso de *T. brasiliensis* (**a, b**), *T. delpontei* (**c**), e *T. rubrovaria* (**e**) um único corpúsculo destacado, ao passo que *T. lecticularia* (**d**) e *T. sordida* (**f**), possuem um corpúsculo maior (setas longas) e vários pequenos corpúsculos evidenciados. Às vezes, alguns corpúsculos apresentam vesículas no seu interior (pontas de setas).

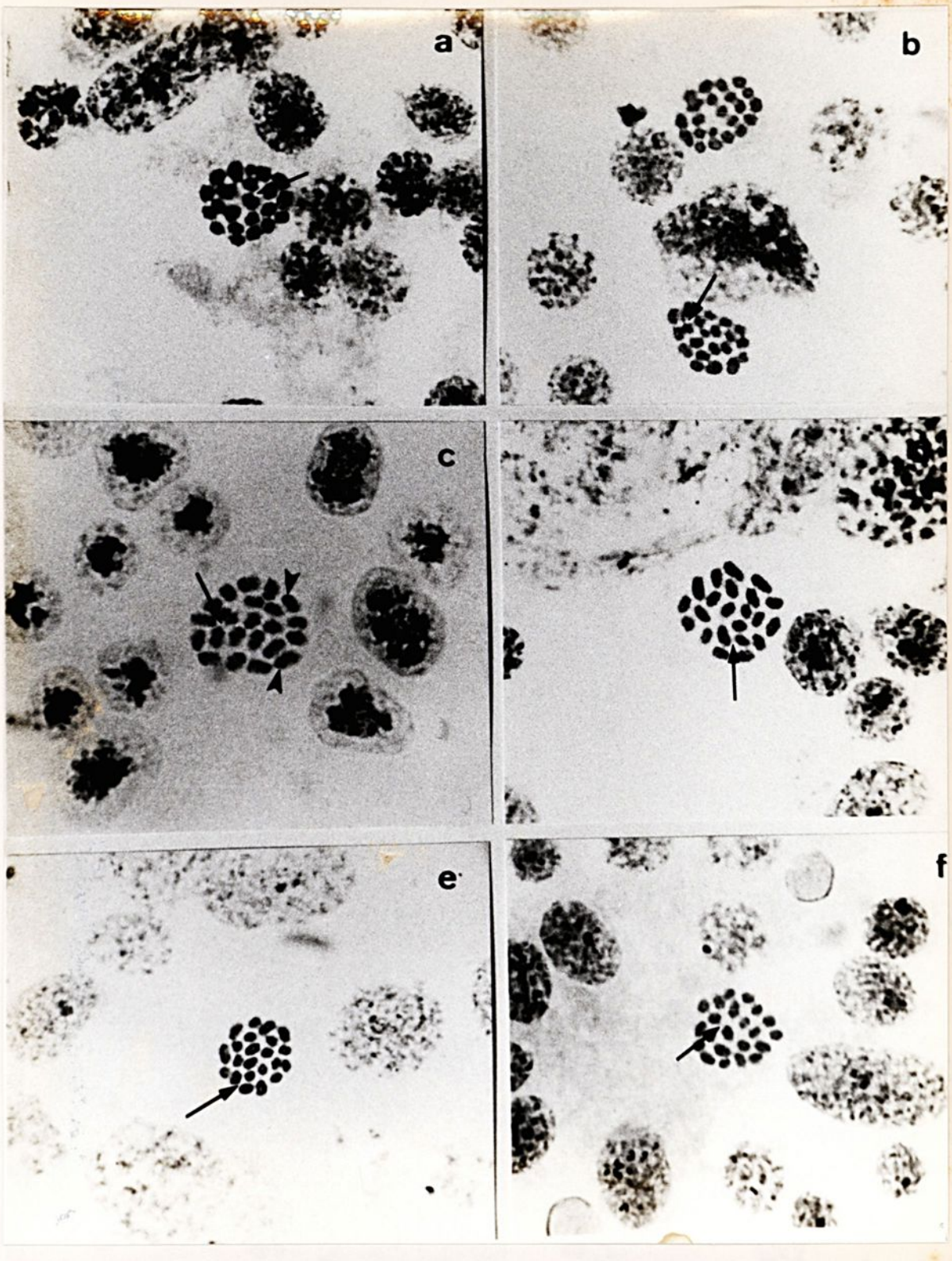


Fig. 05, **a-f**. Metáfases espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. As setas indicam filamentos unindo os cromossomos. Destaca-se uma extremidade heterocromática nos cromossomos espermatogoniais da espécie *T. delpontei* (**c**) (pontas de setas).

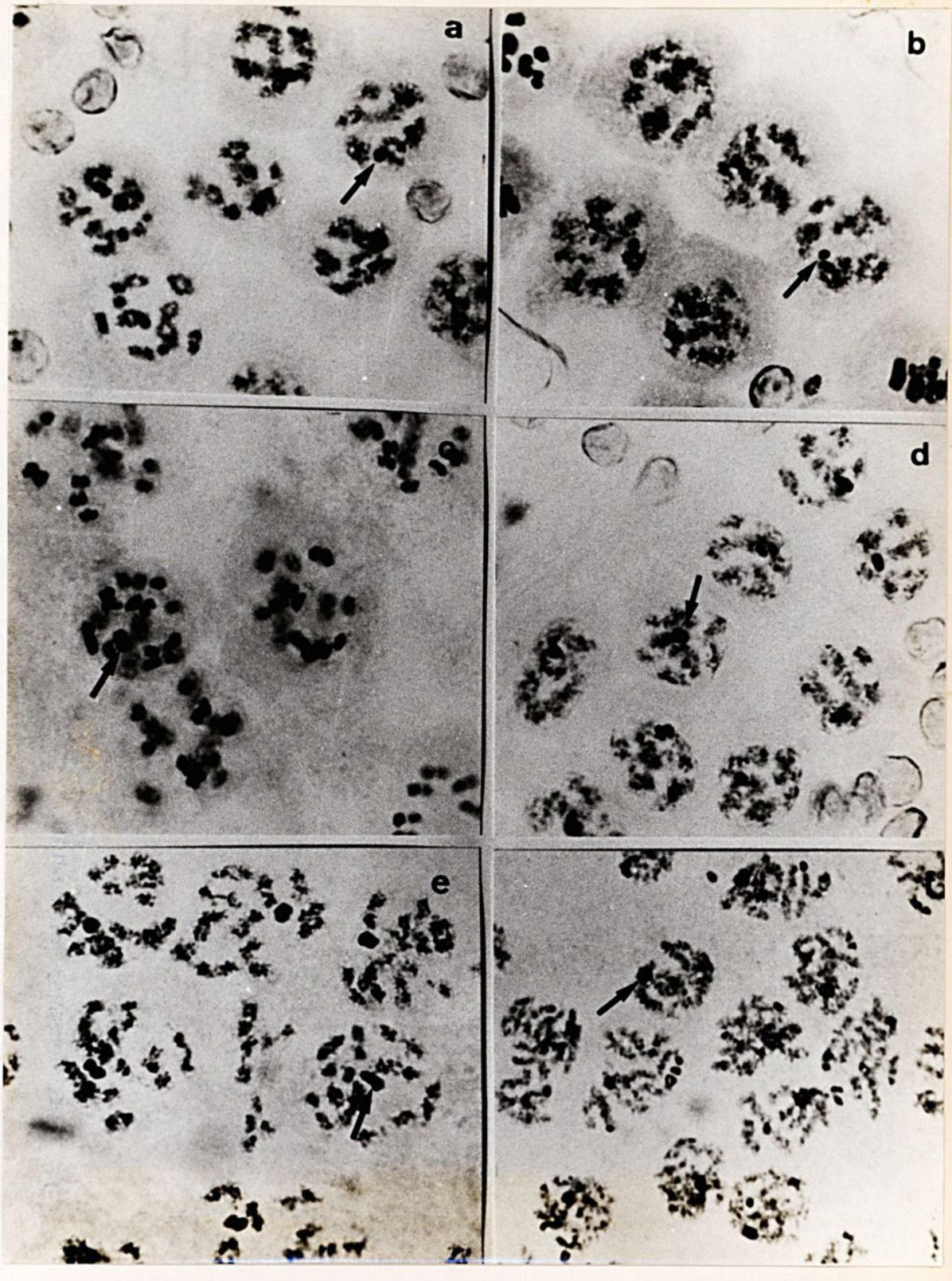


Fig. 06, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose ("estágio confuso") de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), corados com orceína lacto-acética. As setas indicam o corpo heterocromático formado pelos cromossomos sexuais.

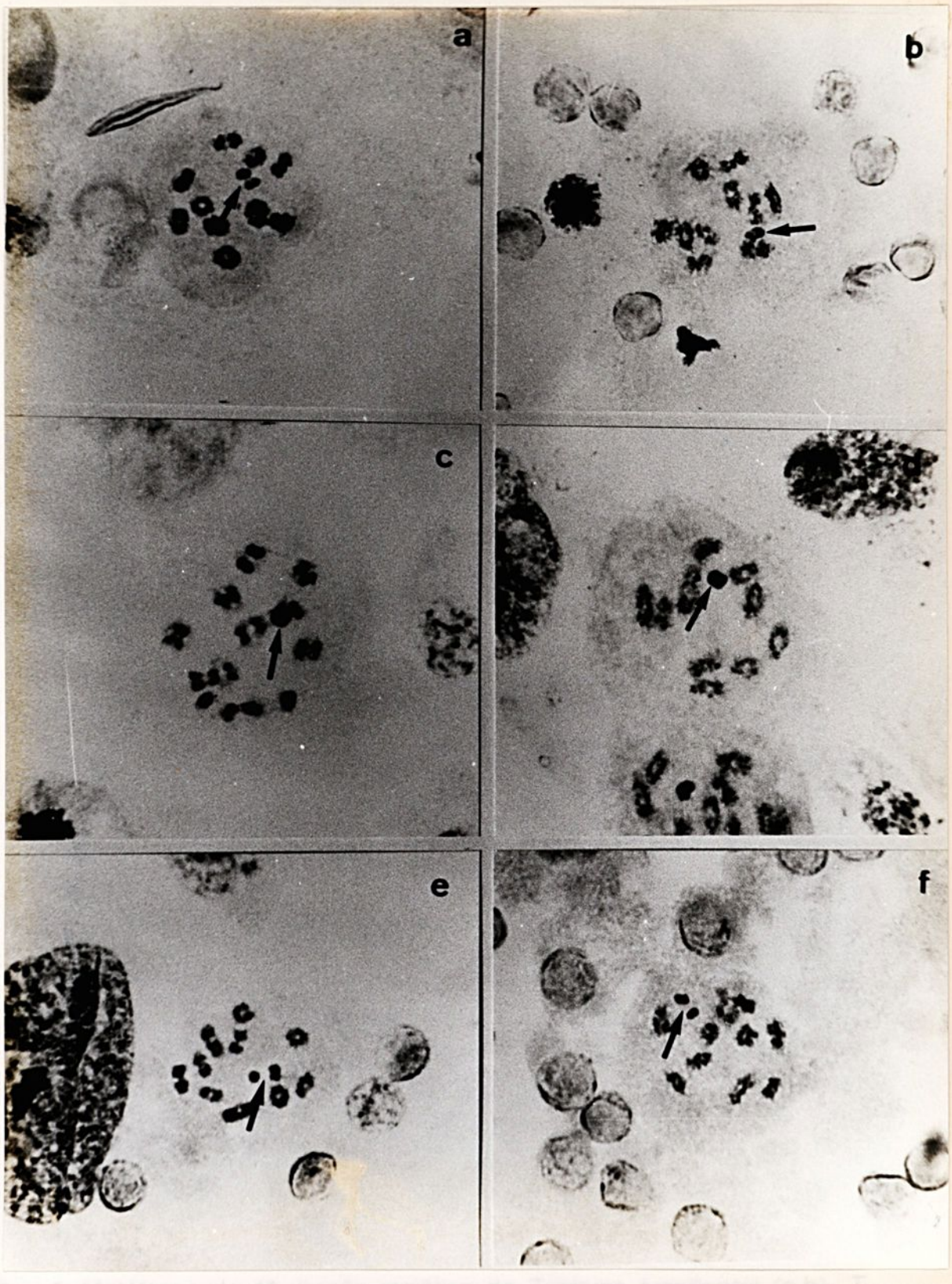


Fig. 07, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno) de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), corados com orceína lacto-acética. As setas indicam a forte marcação do corpo compacto formado pelos cromossomos sexuais.

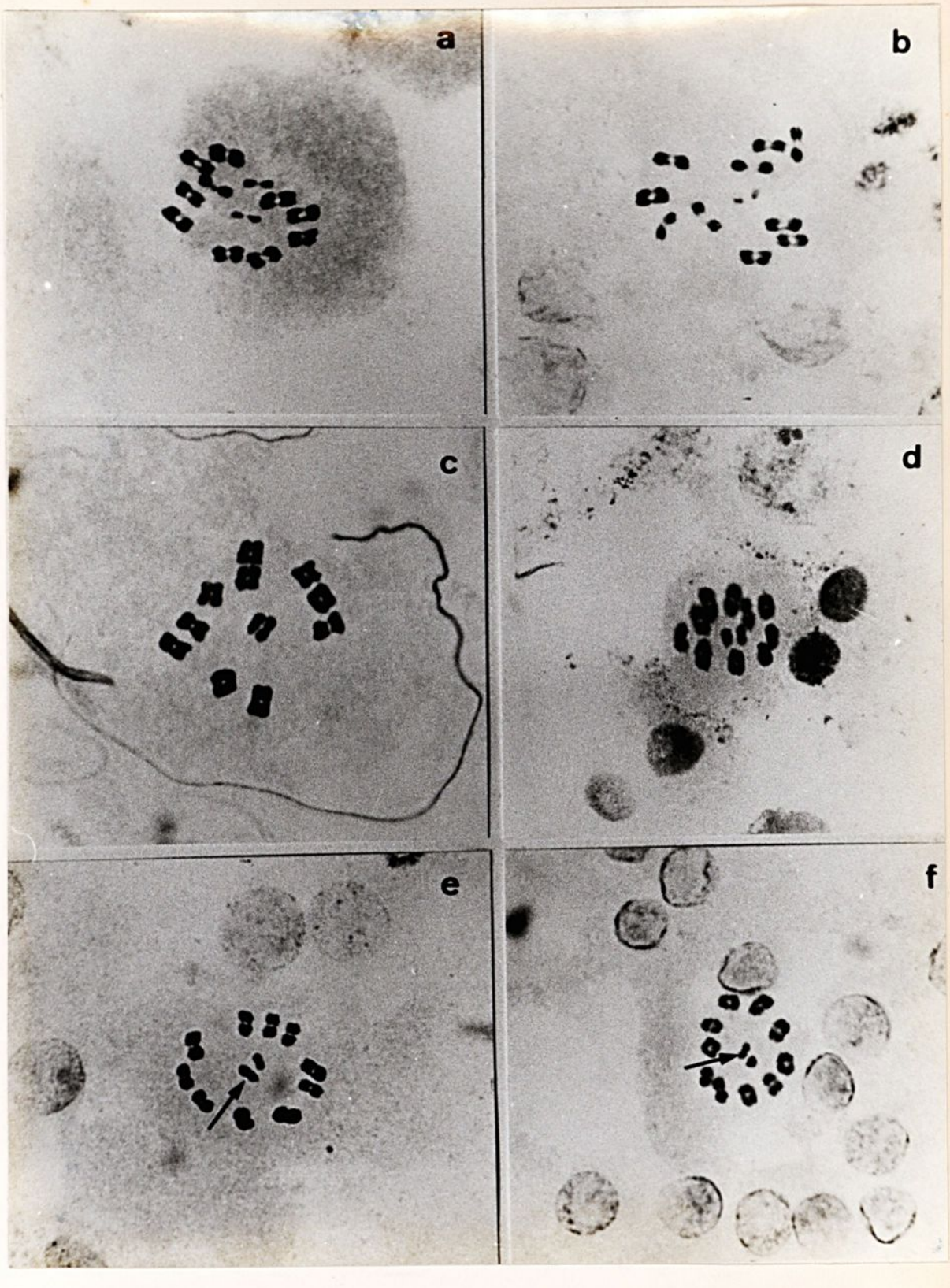


Fig. 08, **a-f**. Metáfases da 1ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Observar a disposição dos autossomos em anel e dos cromossomos sexuais localizados no centro deste. As setas indicam o cromossomo Y.

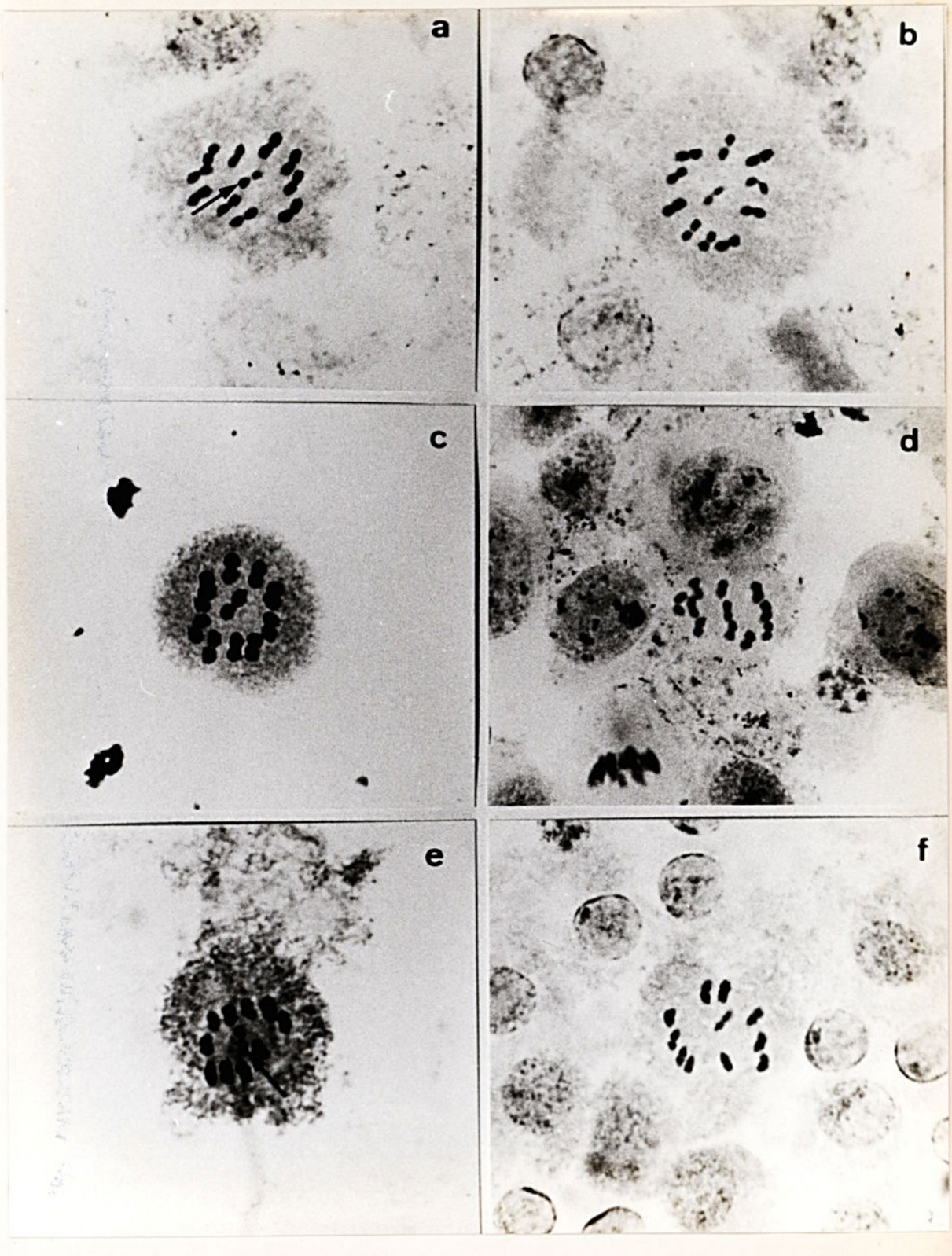


Fig. 09, **a-f**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a-b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**) e *T. sordida* (**e-f**), coradas com orceína lacto-acética. Os cromossomos sexuais localizam-se no centro do anel formado pelos autossomos. As setas indicam o cromossomo Y. Vista frontal.

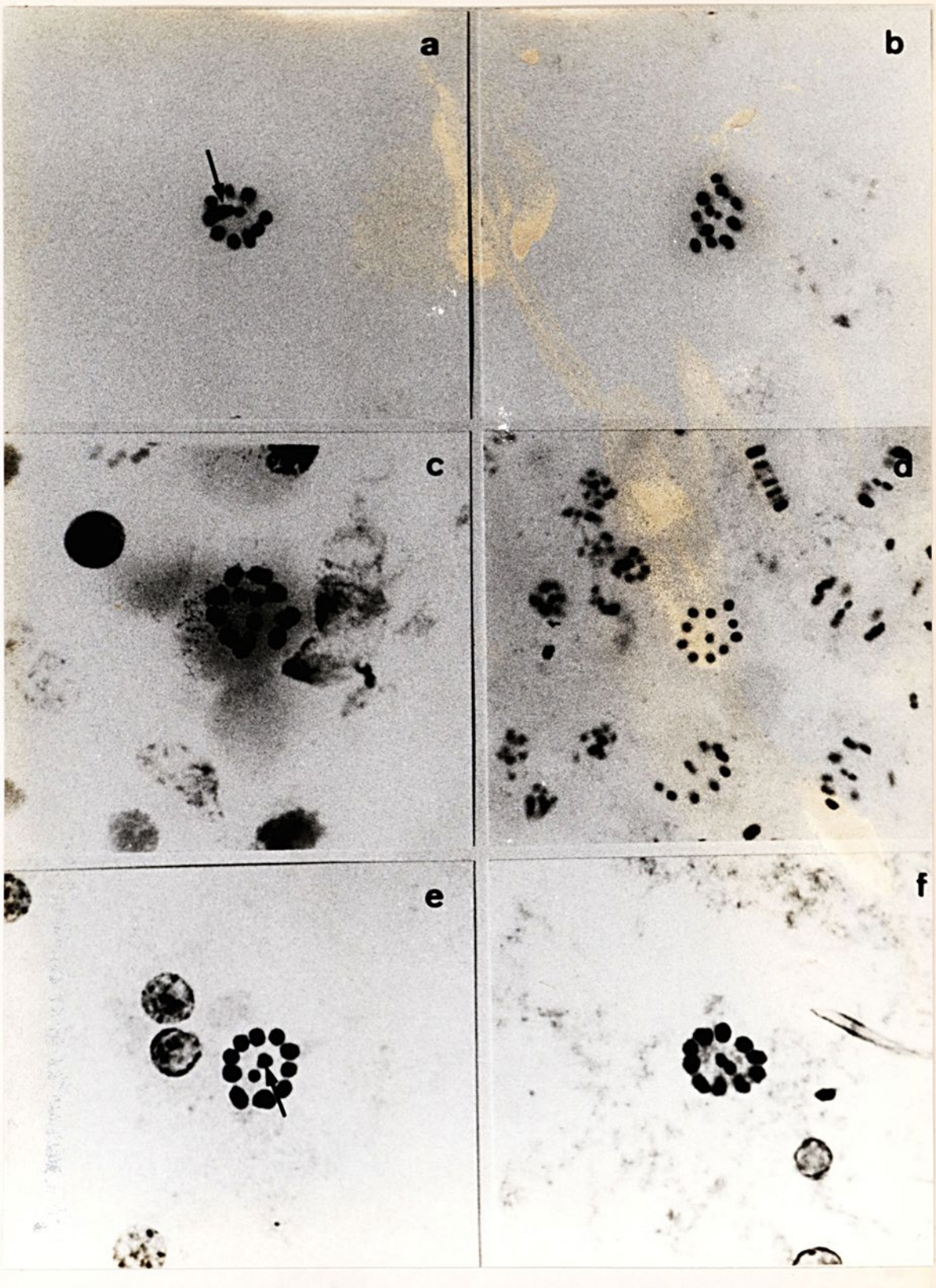


Fig. 10, **a-f**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Novamente, os cromossomos sexuais colocam-se no centro do anel formado pelos cromossomos autossômicos. As setas indicam o cromossomo Y.

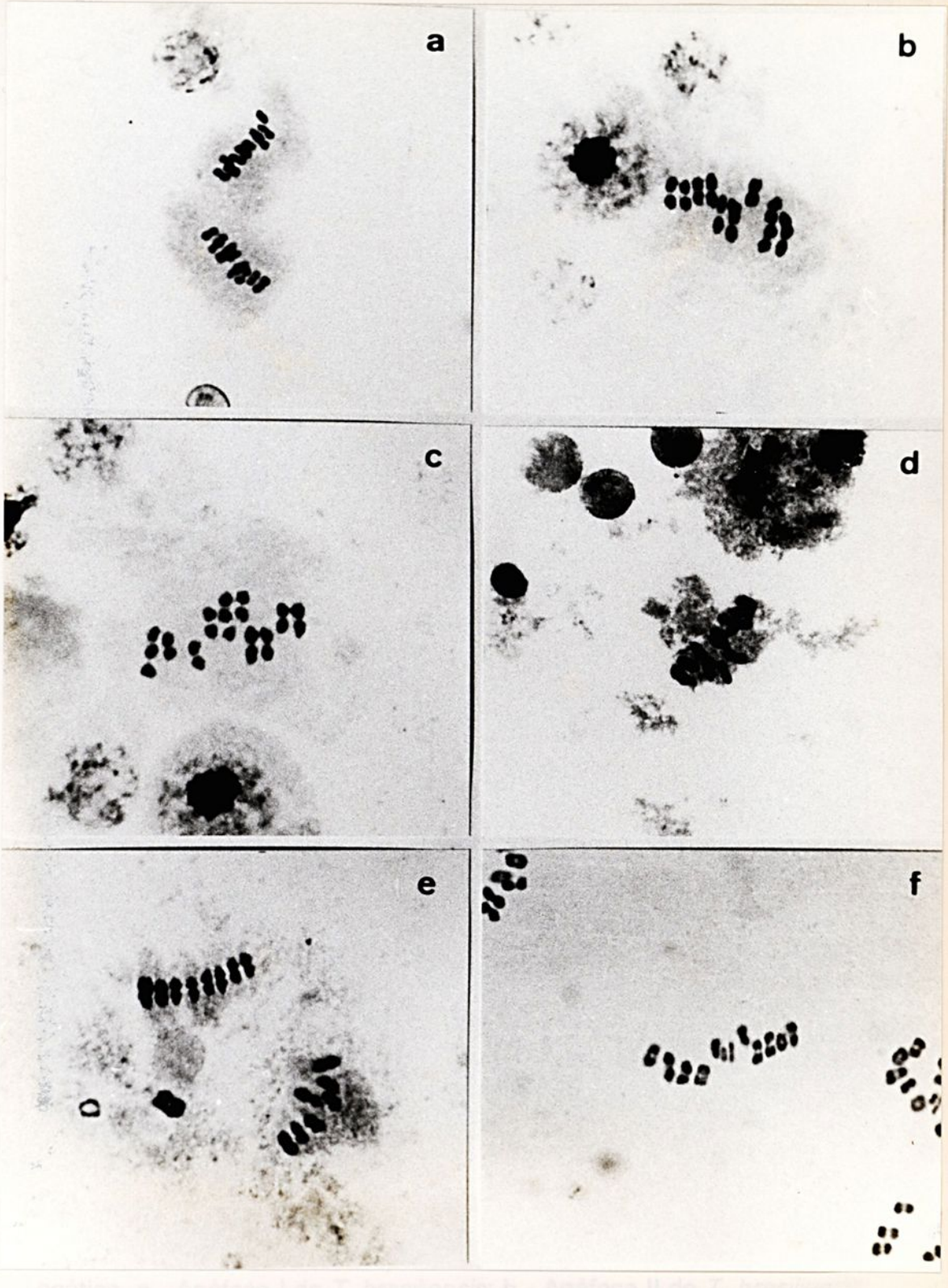


Fig. 11, **a-f**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a**), *T. delpontei* (**b,c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e 1ª divisão meiótica de *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Vista lateral.

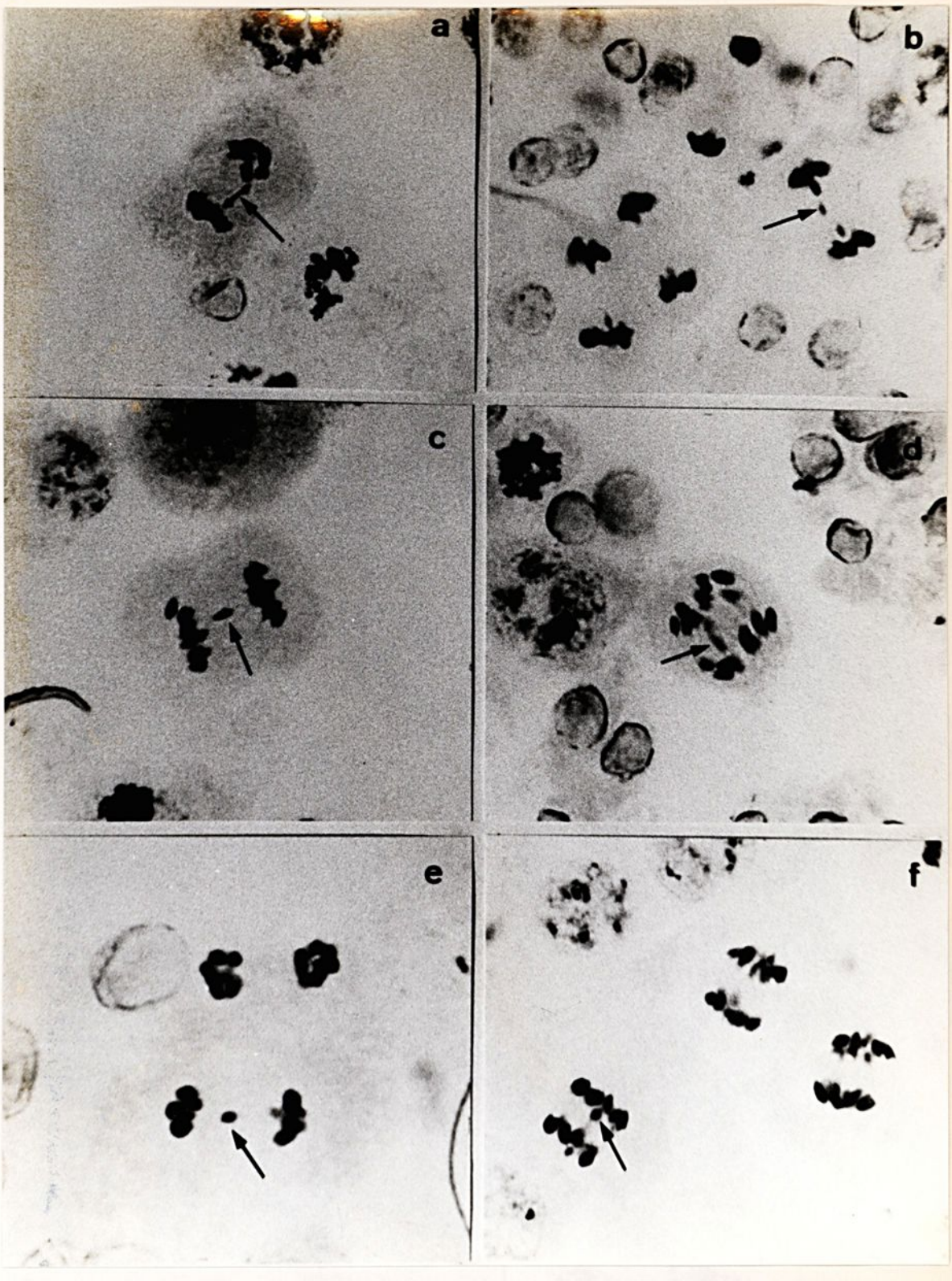


Fig. 12, **a-f** Anáfases meióticas de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida,* respectivamente, coradas com orceína lacto-acética. **a** - Anáfase I de *T. brasiliensis*; **b** - Anáfase II de *T. brasiliensis*; **c** - Anáfase I de *T. delpontei*; **d** - Anáfase I de *T. lecticularia*; **e** - Anáfase II de *T. rubrovaria*; **f** - Anáfase I de *T. sordida*. As setas indicam cromossomos migrando tardiamente.

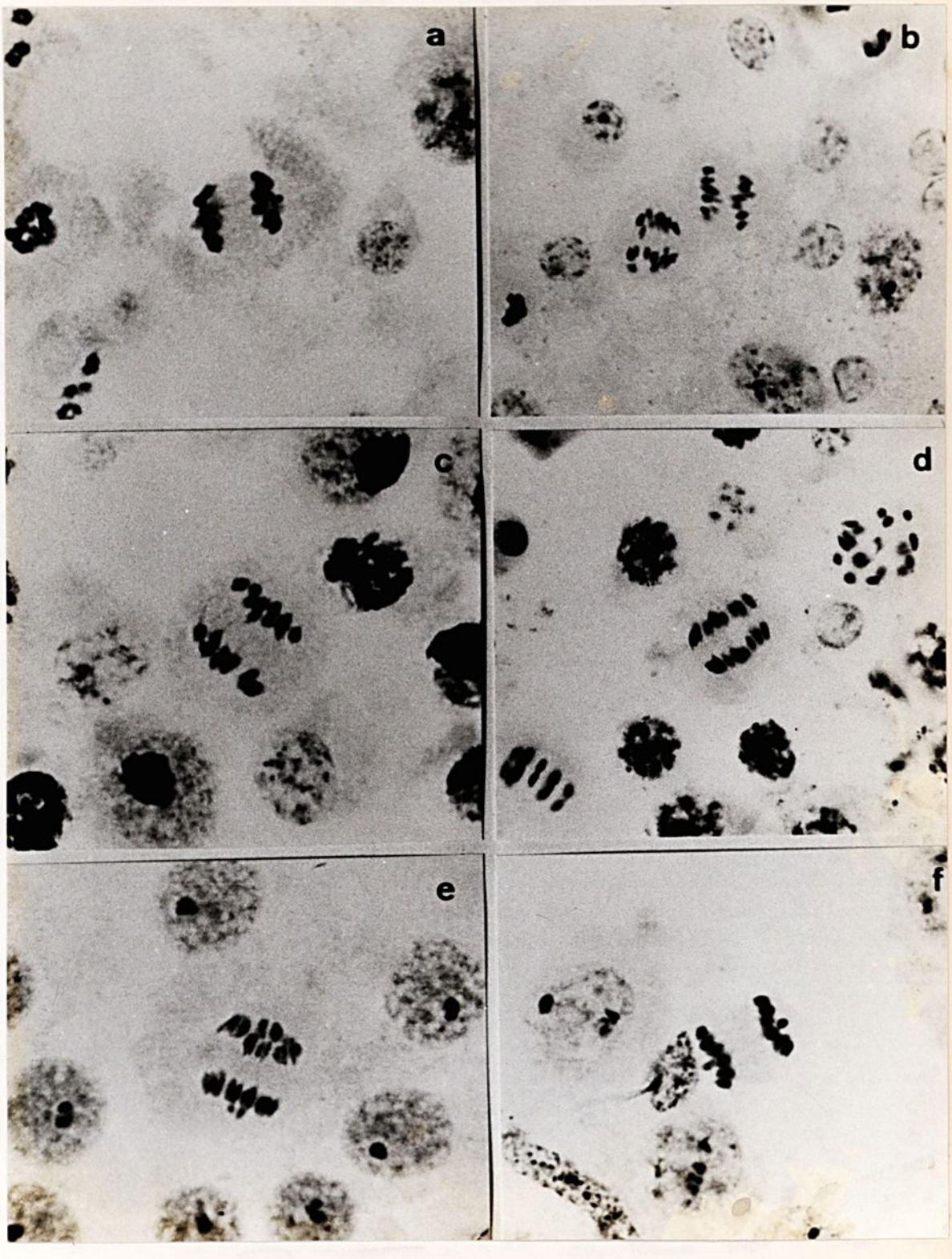


Fig. 13, **a-f**. Anáfases da 1ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Neste estágio, todos os cromossomos já alcançaram os pólos.

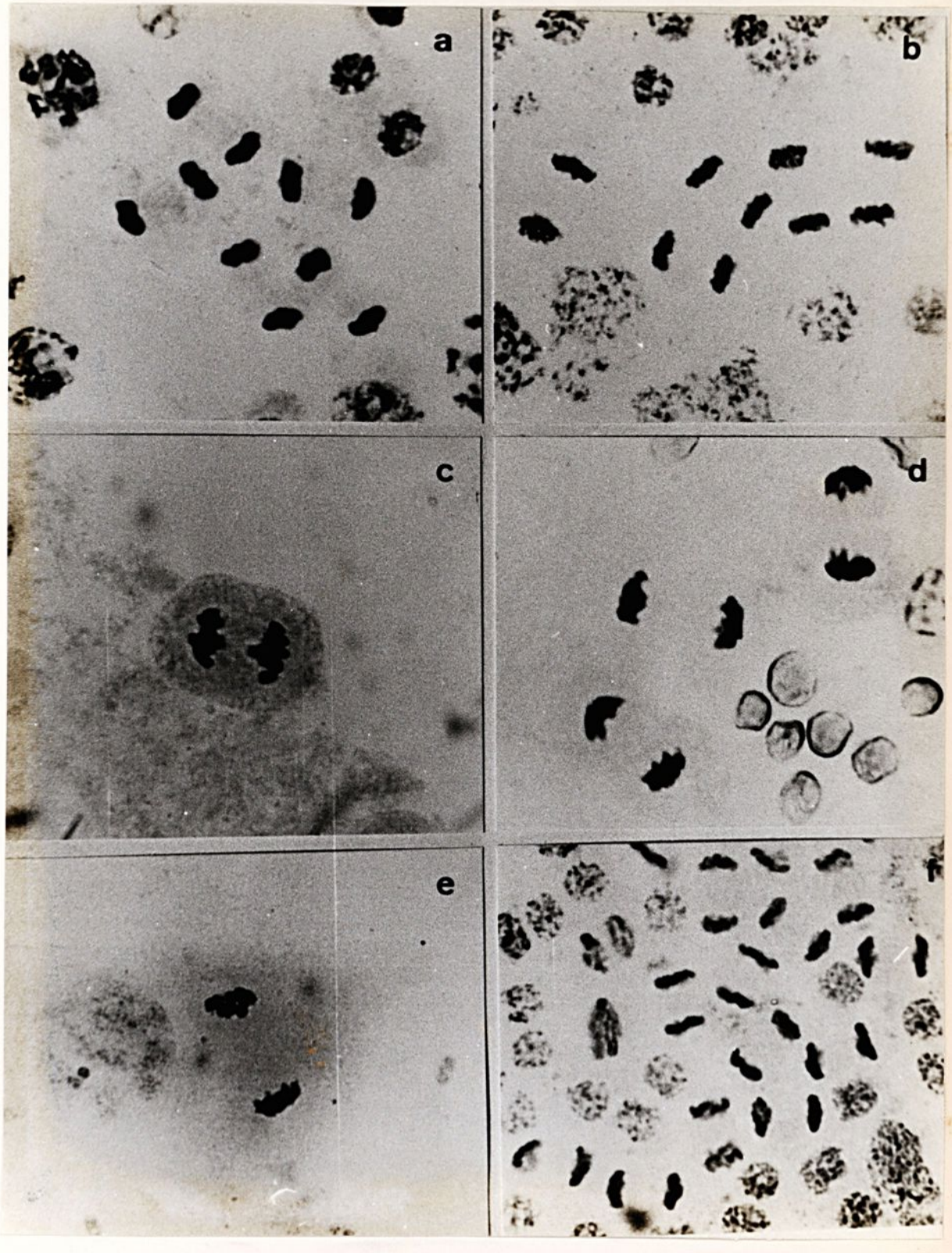


Fig.14, **a-f**. Telófases meióticas de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Telófases I (**c, d, e**). Telófases II (**a, b, f**).

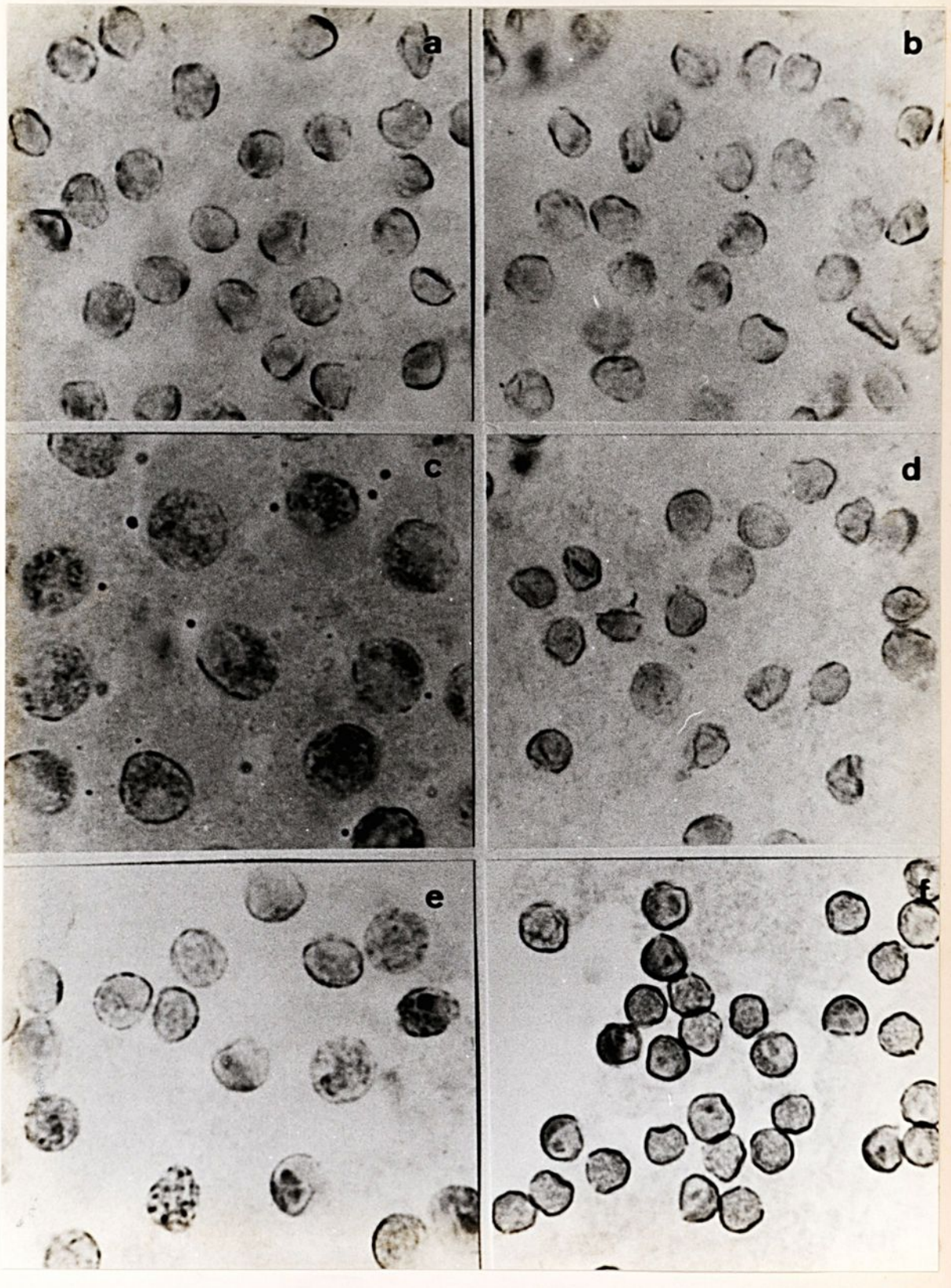


Fig. 15, **a-f**. Espermátides de *T. brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T.lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com orceína lacto-acética. Início da espermiogênese. Notar a forma arredondada das células.

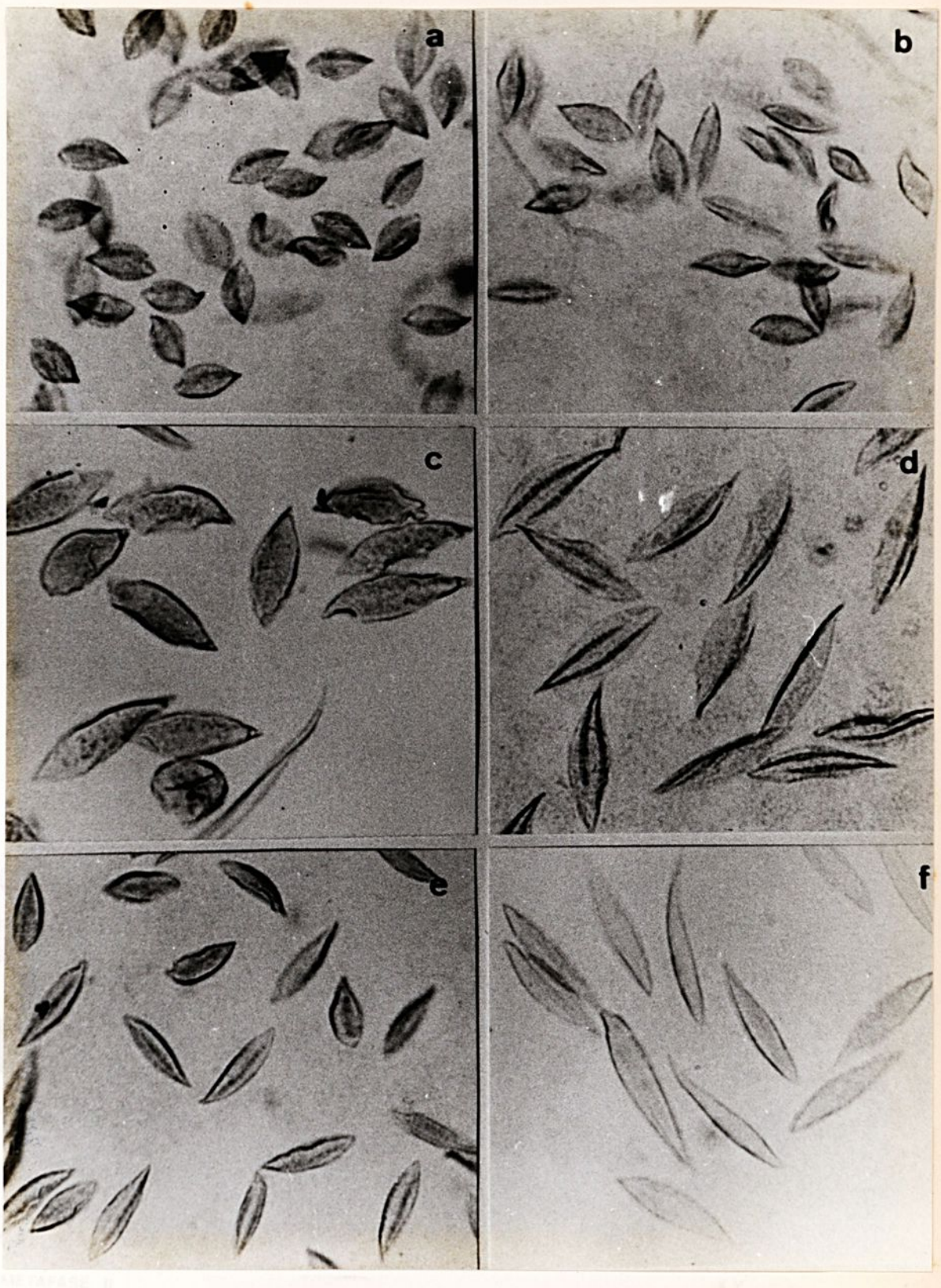
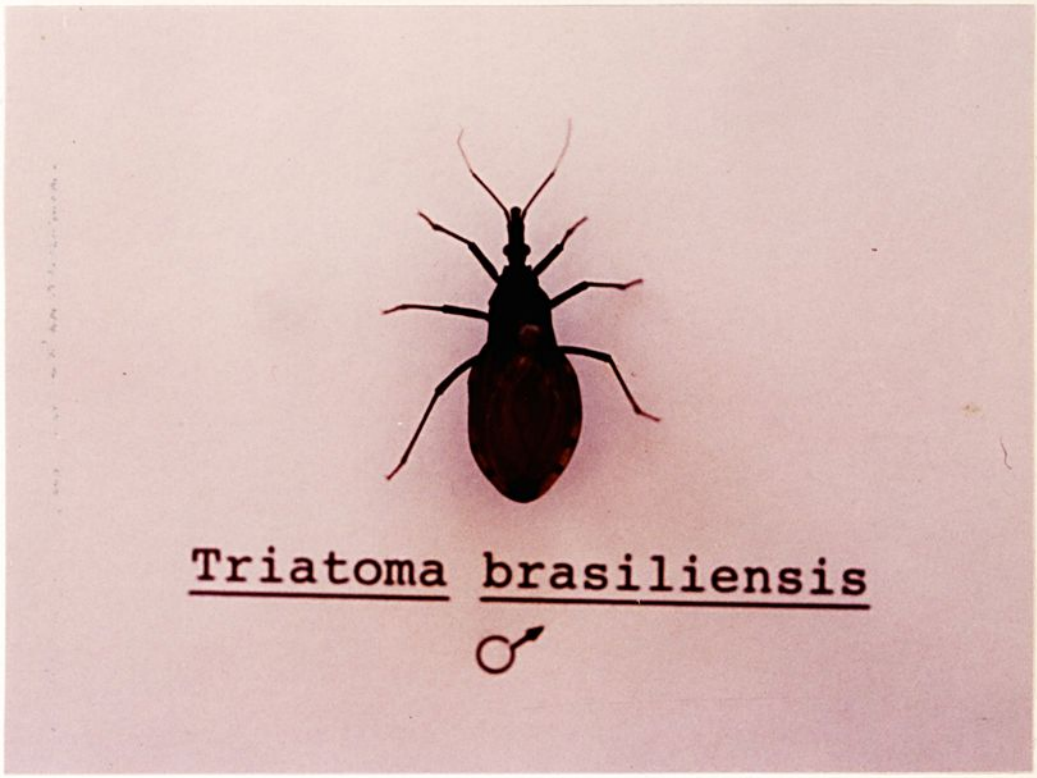


Fig. 16, **a-f**. Espermátides de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), em um estágio da espermiogênese mais adiantado. Notar a forma alongada das células. Coloração: orceína lacto-acética.



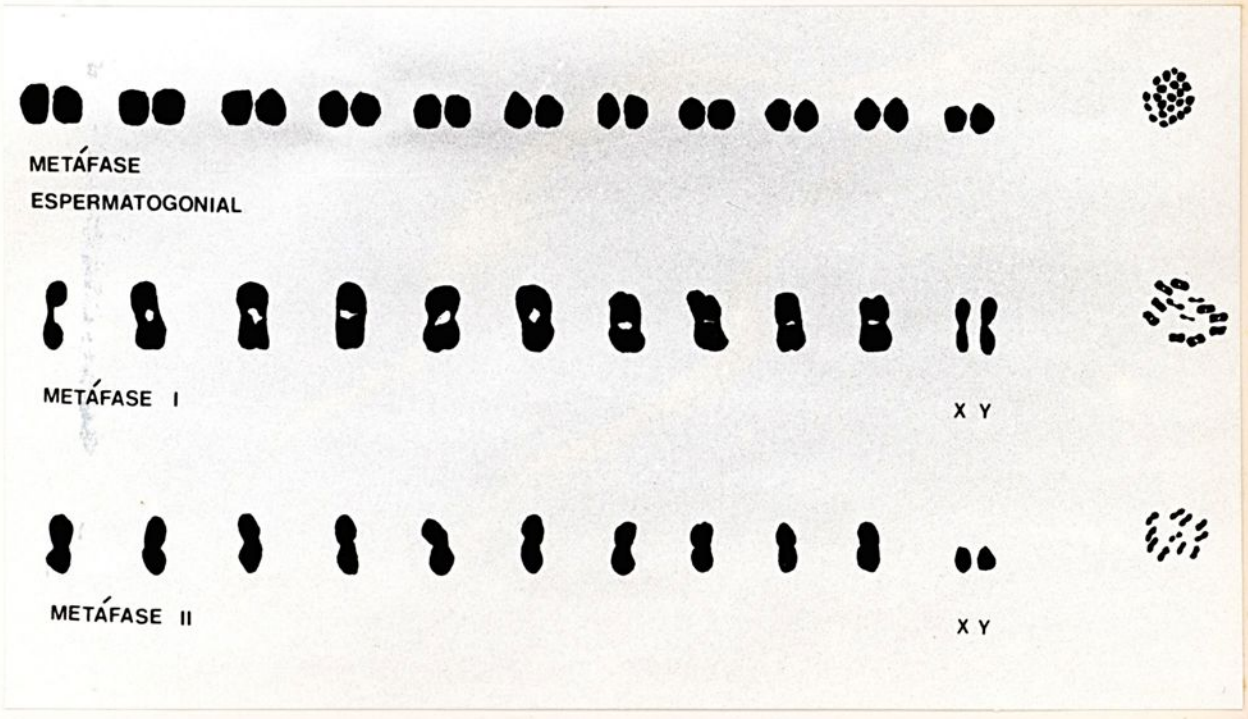


Fig. 17. Exemplar e cariótipo de *Triatoma brasiliensis*.

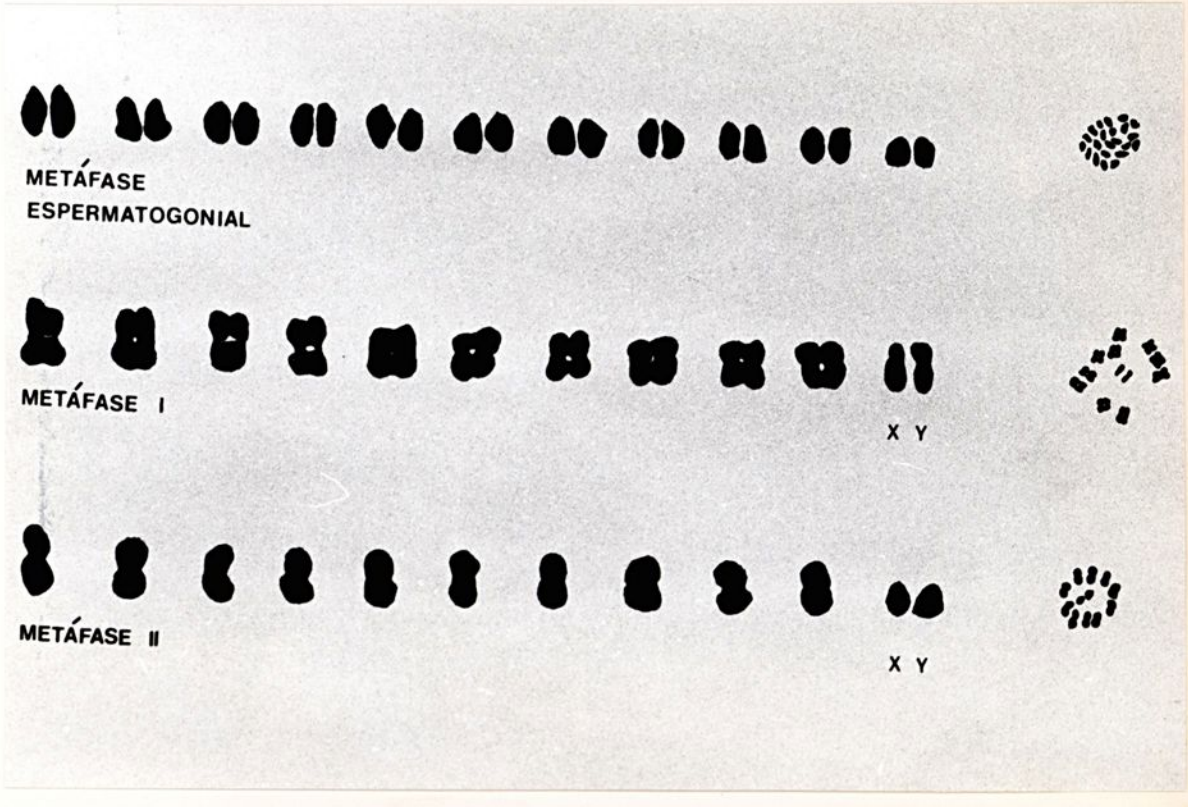


Fig.18. Exemplar e cariótipo de *Triatoma delpontei*.

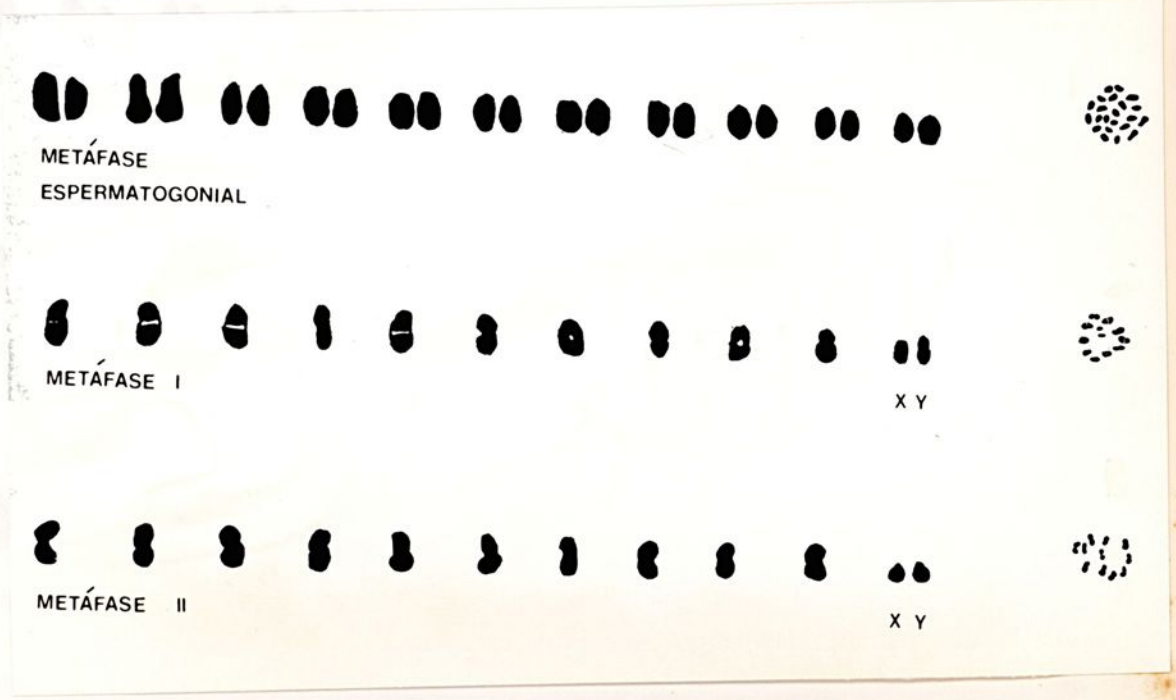


Fig. 19. Exemplar e cariótipo de *Triatoma lecticularia*.

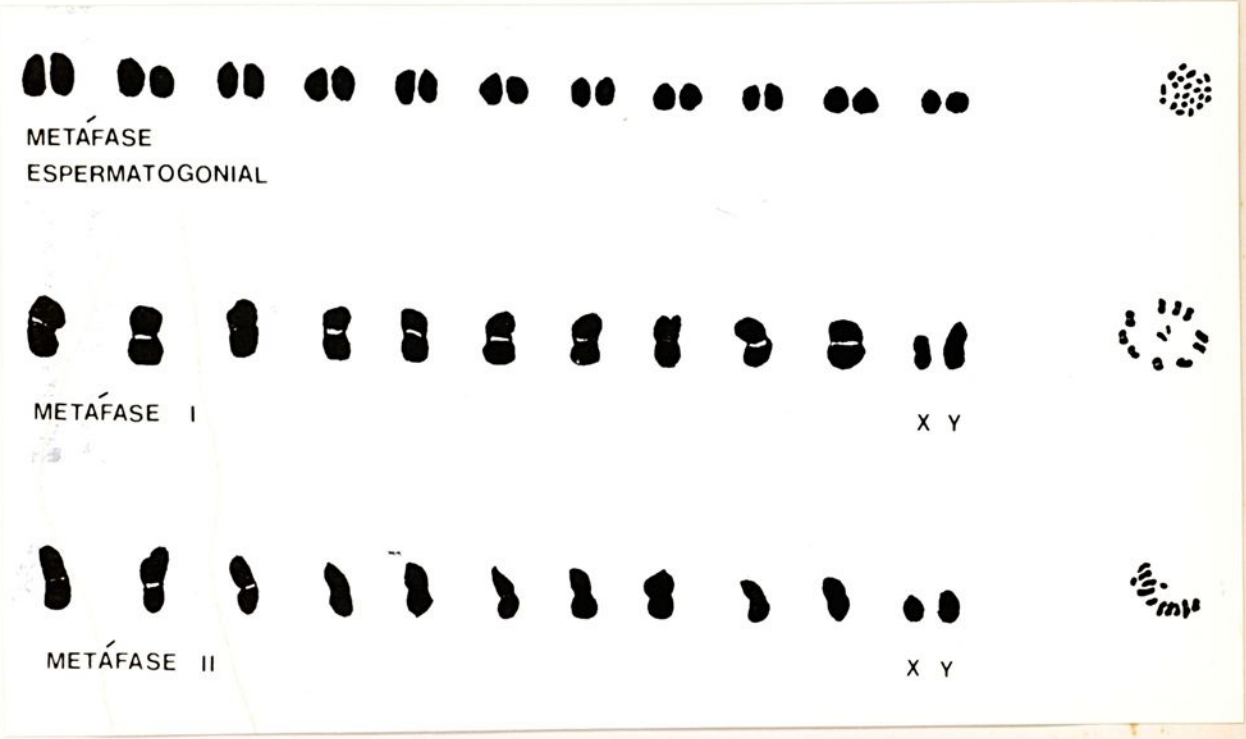


Fig. 20. Exemplar e cariótipo de *Triatoma rubrovaria*.

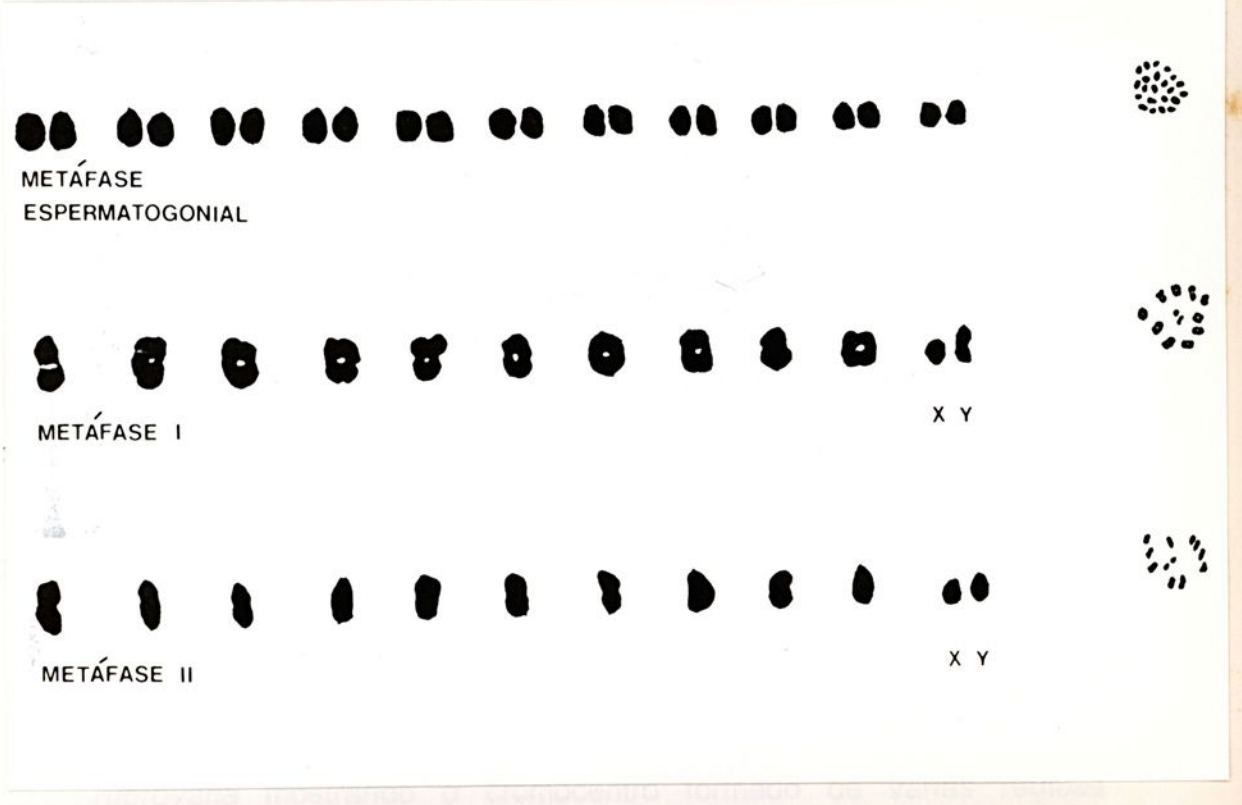


Fig. 21. Exemplar e cariótipo de *Triatoma sordida*.

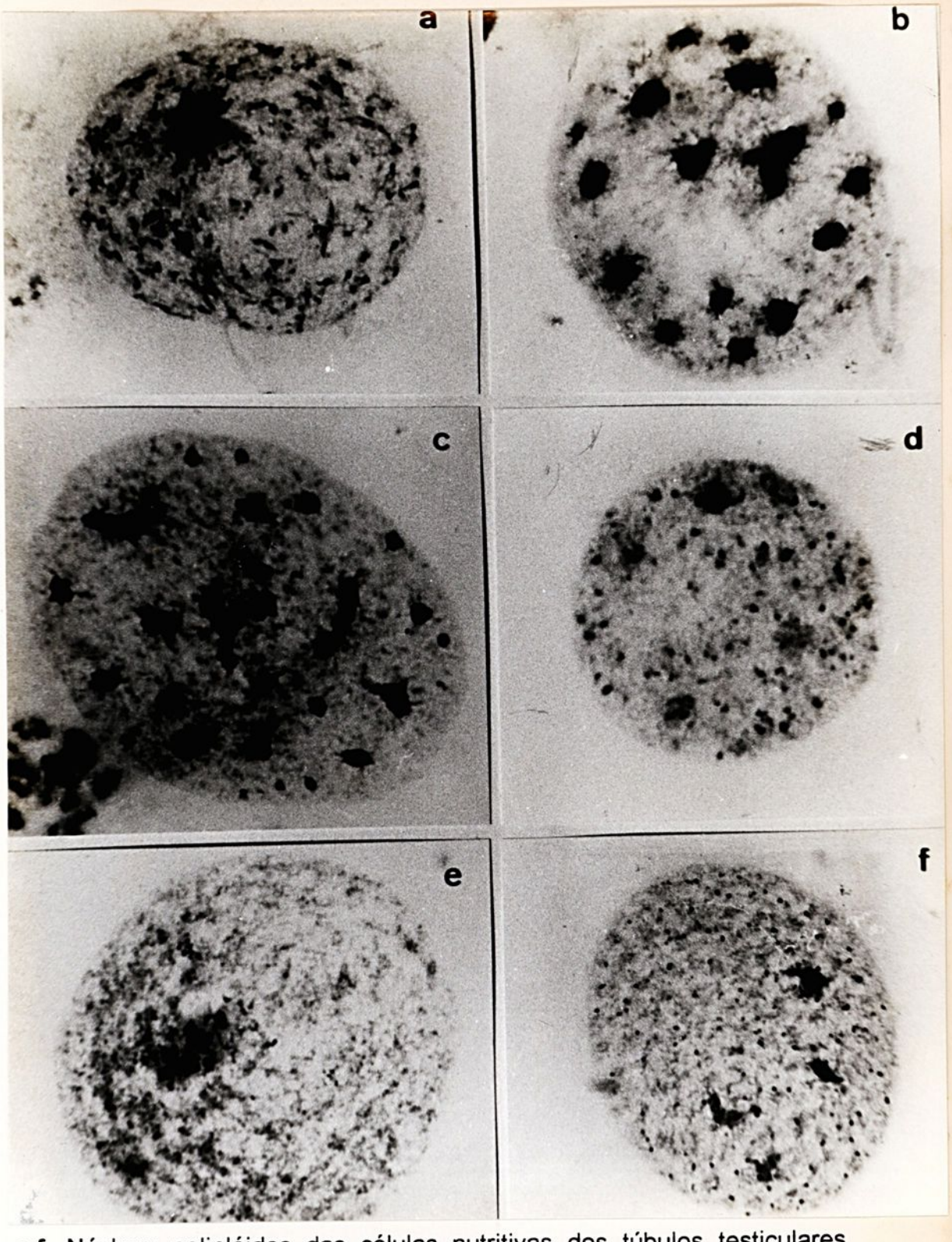


Fig. 22, **a-f**. Núcleos poliplóides das células nutritivas dos túbulos testiculares submetidos à coloração com Giemsa. **a** - Núcleo poliplóide de *Triatoma brasiliensis* com um único corpúsculo heterocromático destacado. **b,c** - Núcleos poliplóides de *T. delpontei* mostrando vários pontos heterocromáticos. **d** - Núcleo poliplóide de *T. lecticularia* com um corpúsculo heterocromático maior. **e** - Núcleo poliplóide de *T. rubrovaria* mostrando o cromocentro formado de várias regiões condensadas. **f** - Núcleo poliplóide de *T. sordida* com quatro regiões condensadas e múltiplos pontos destacados na eucromatina.

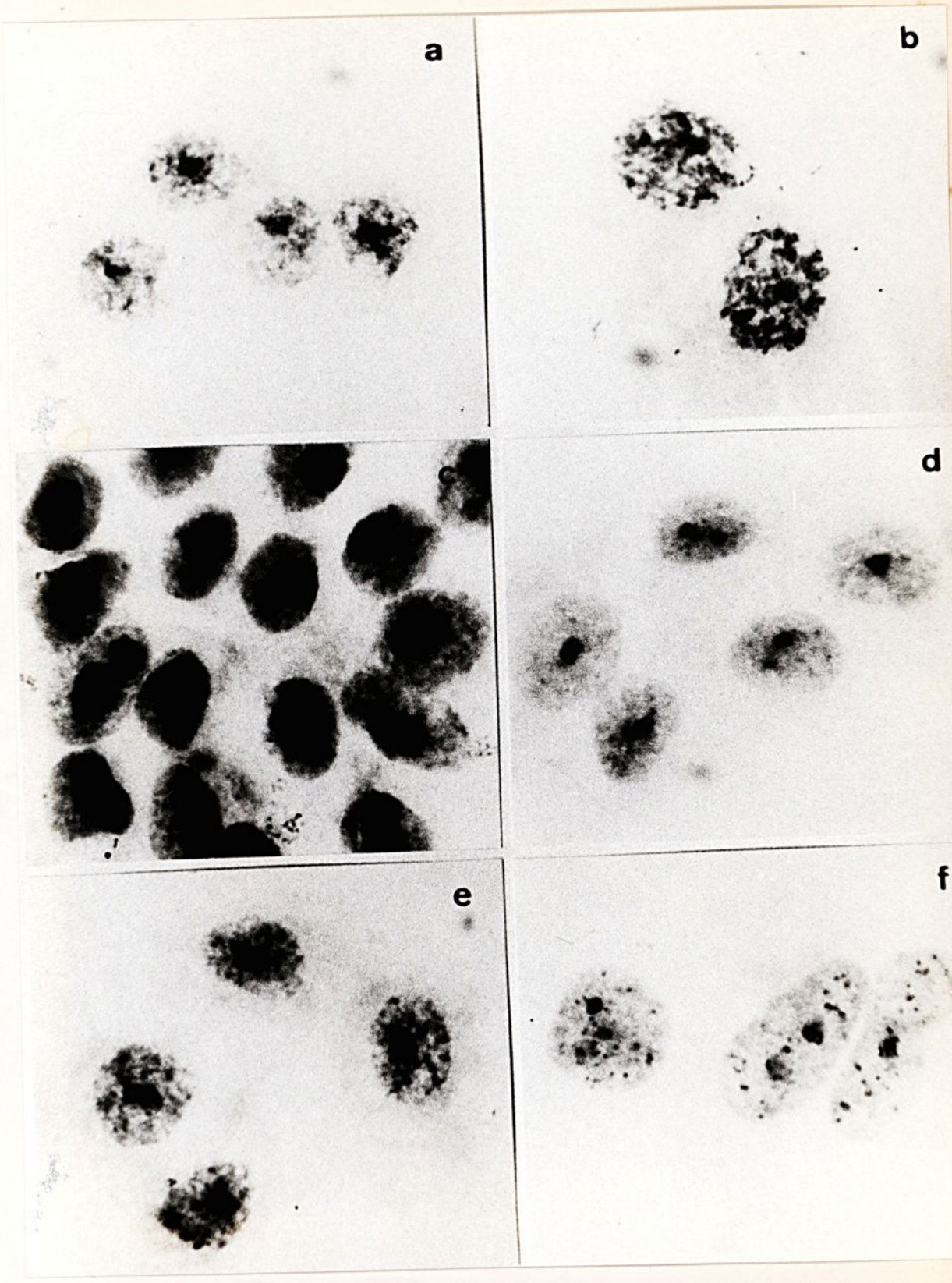


Fig. 23, **a-f**.Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**) , *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), corados com Giemsa, mostrando o corpúsculo heterocromático.

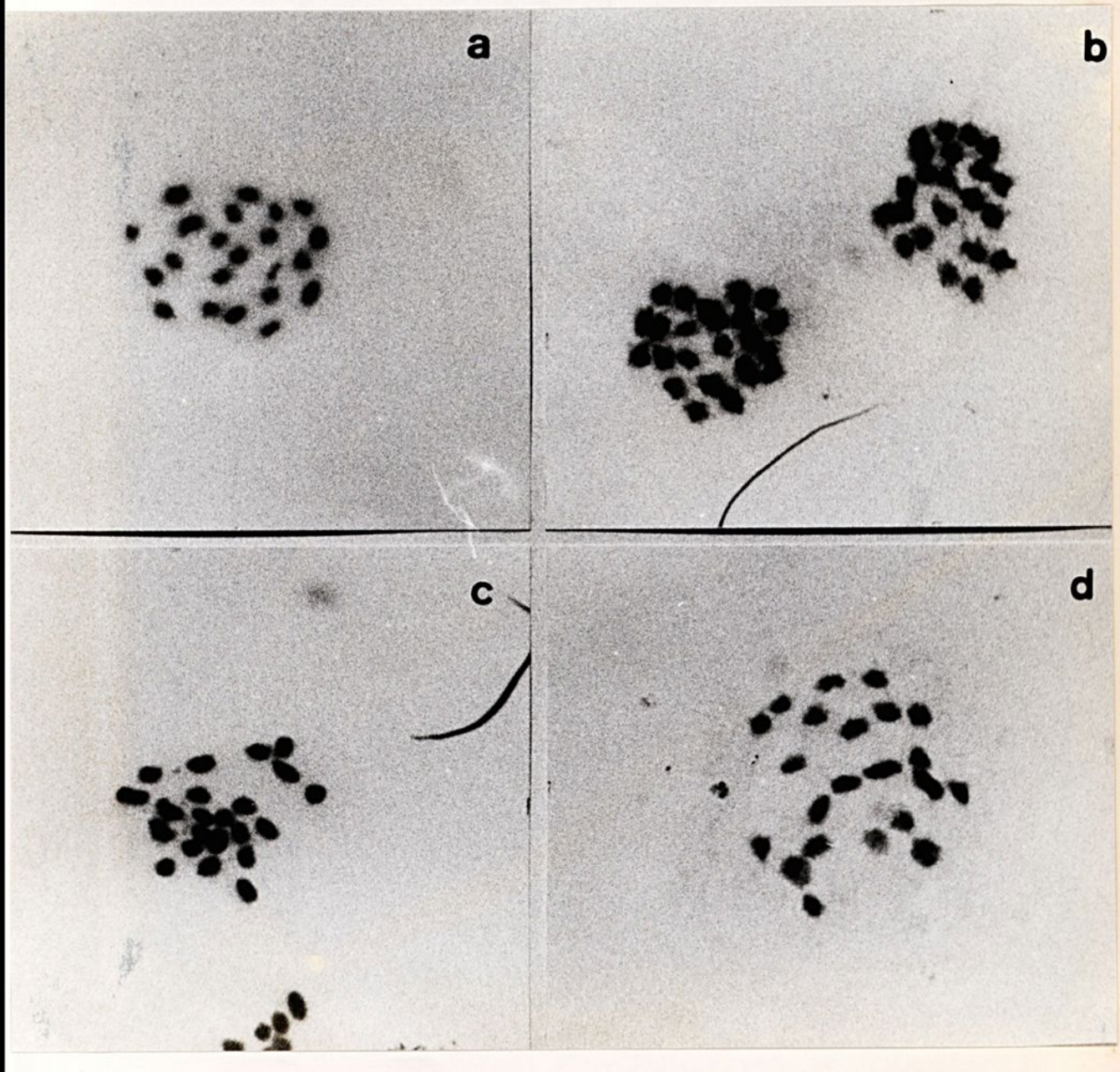


Fig. 24, **a-d**. Metáfases espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia* e *T. rubrovaria*, respectivamente, mostrando a presença de 22 cromossomos. Coloração: Giemsa.

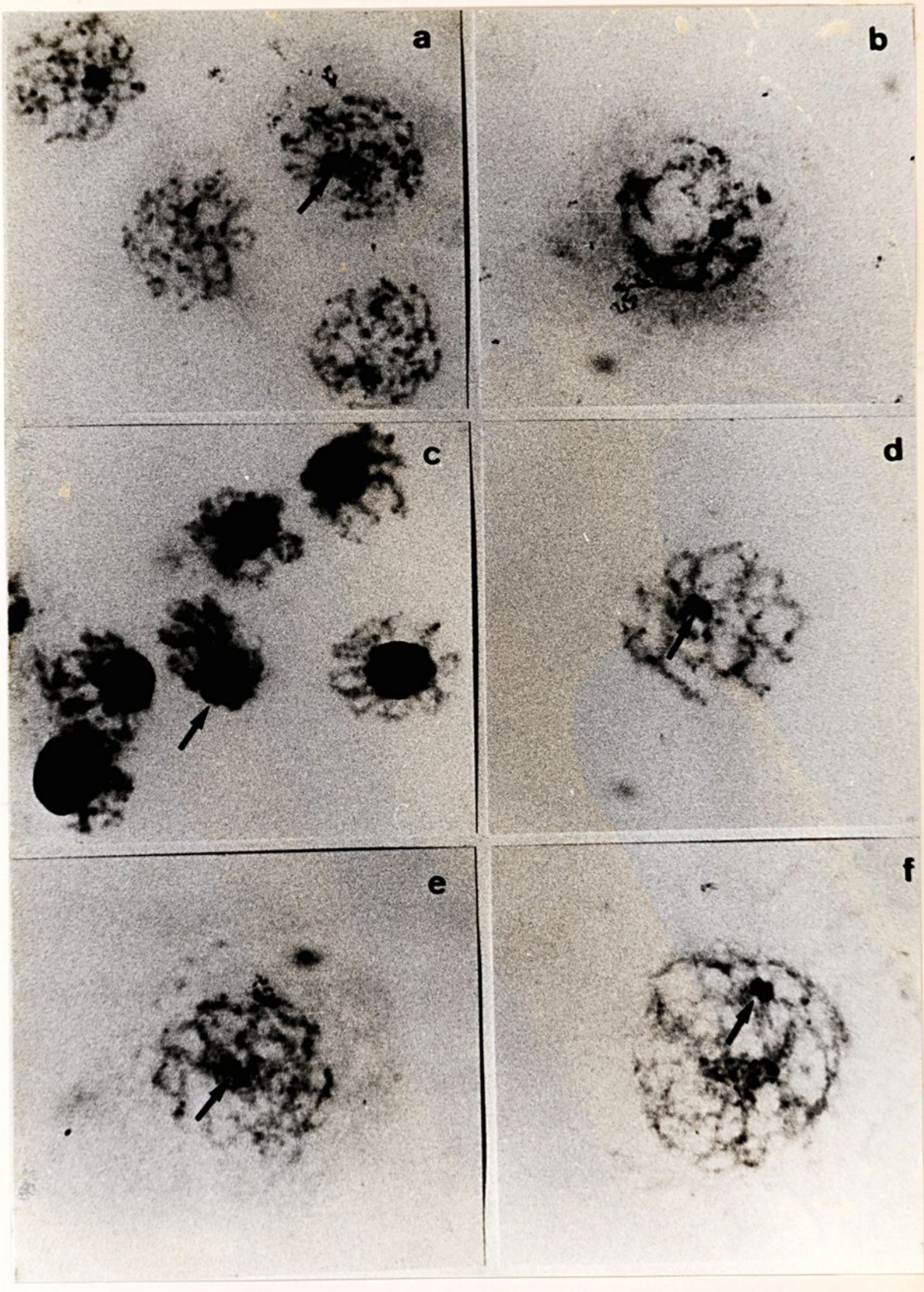


Fig. 25, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose ("estágio confuso") de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos à coloração com Giemsa. As setas indicam o corpúsculo heterocromático formado pelos cromossomos sexuais.

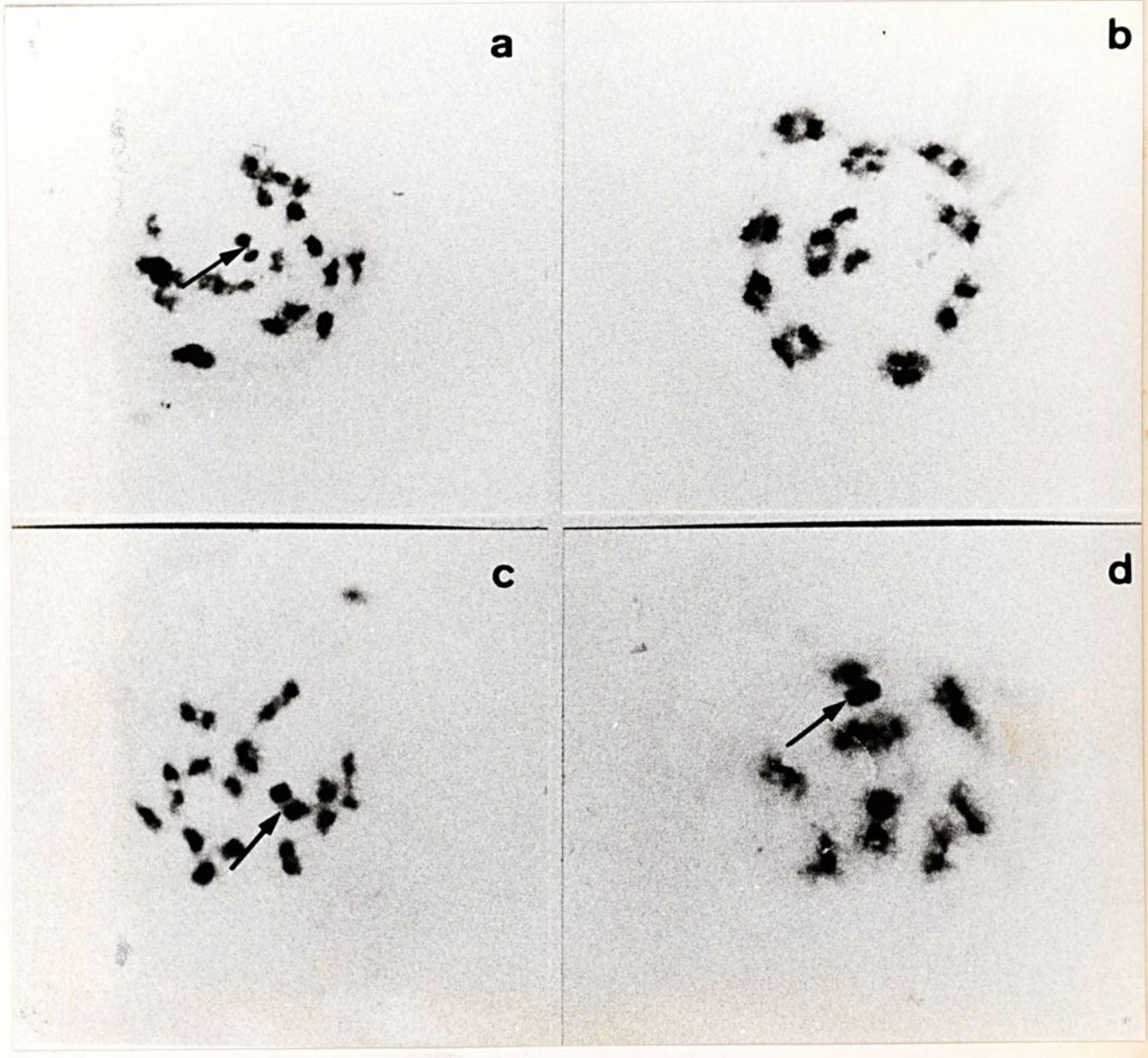


Fig. 26, **a-d**. Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno) de *Triatoma brasiliensis* , *T. delpontei*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* respectivamente, submetidos à coloração com Giemsa. As setas indicam a marcação do corpúsculo heterocromático formado pelos cromossomos sexuais.

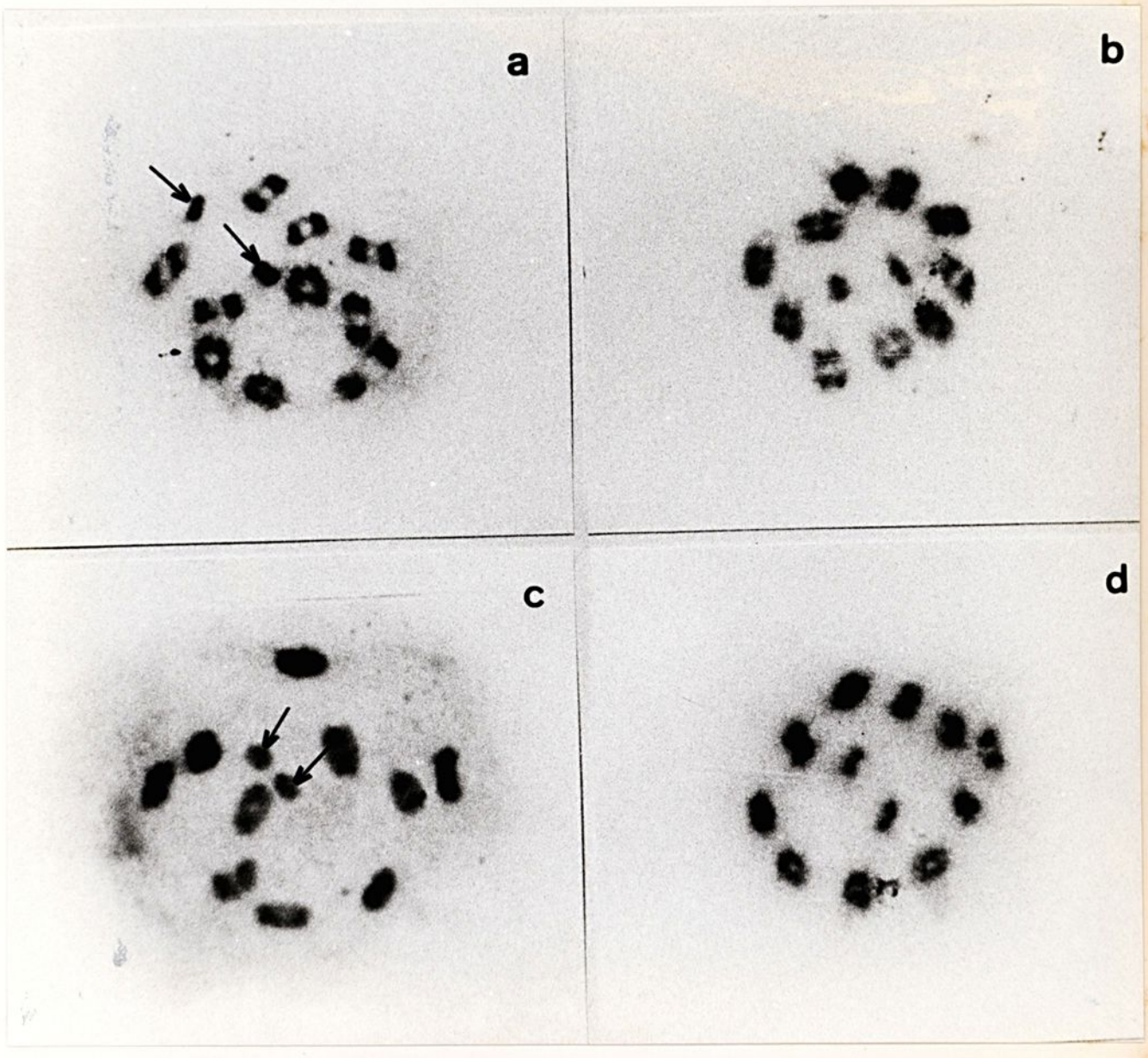


Fig. 27, **a-d**. Metáfases da 1ª divisão meiótica de *Triatoma delpontei* (**a,b**), *T. lecticularia* (**c**) e *T. rubrovaria* (**d**), coradas com Giemsa. Observar que os cromossomos sexuais aparecem no centro (**b,d**) ou distribuídos casualmente (setas) (**a,c**).

unesp

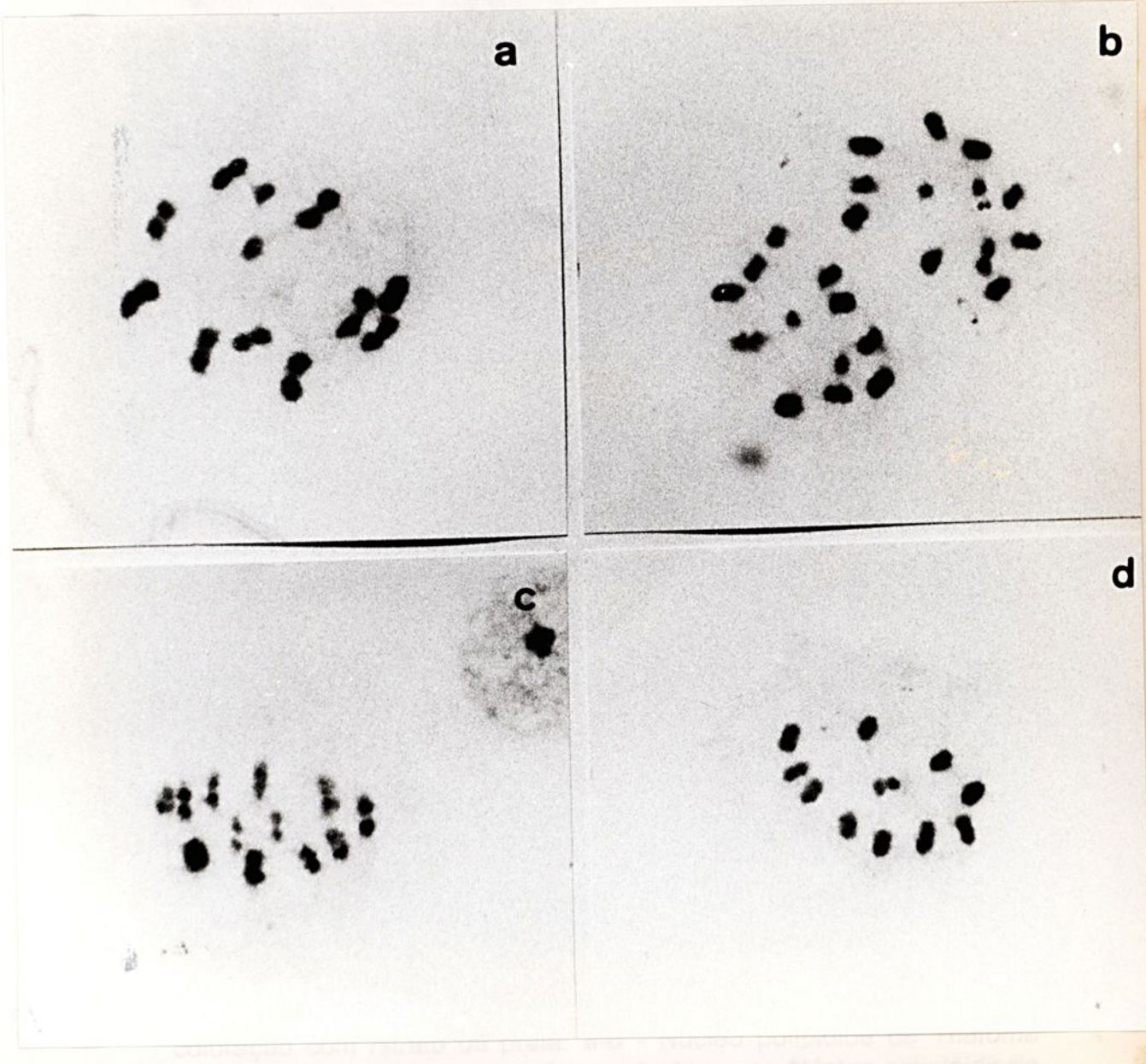


Fig. 28, **a-d**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* respectivamente, coradas com Giemsa. Os cromossomos sexuais localizam-se no centro do anel formado pelos autossomos.

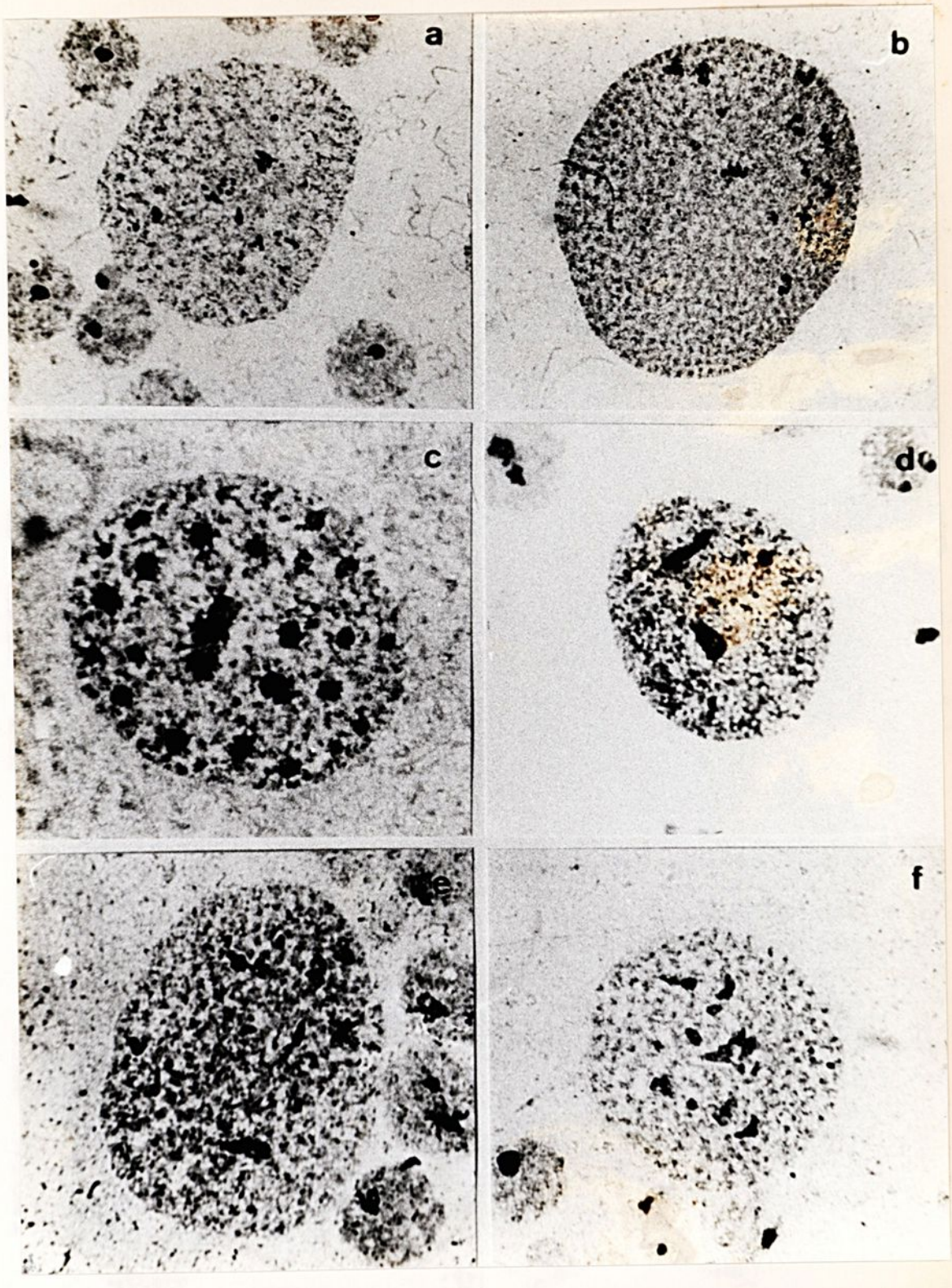


Fig. 29, **a-f** Núcleos poliplóides das células dos túbulos testiculares, submetidos à coloração com nitrato de prata. **a-b** - Núcleo poliplóide de *Triatoma brasiliensis* com várias marcações nucleolares. **c** - Núcleo poliplóide de *T. delpontei* com vários blocos destacados. **d** - Núcleo poliplóide de *T. lecticularia* com 03 marcações. **e,f** - Núcleo poliplóide de *T. rubrovaria* e *T. sordida* respectivamente, mostrando várias regiões impregnadas pela prata.

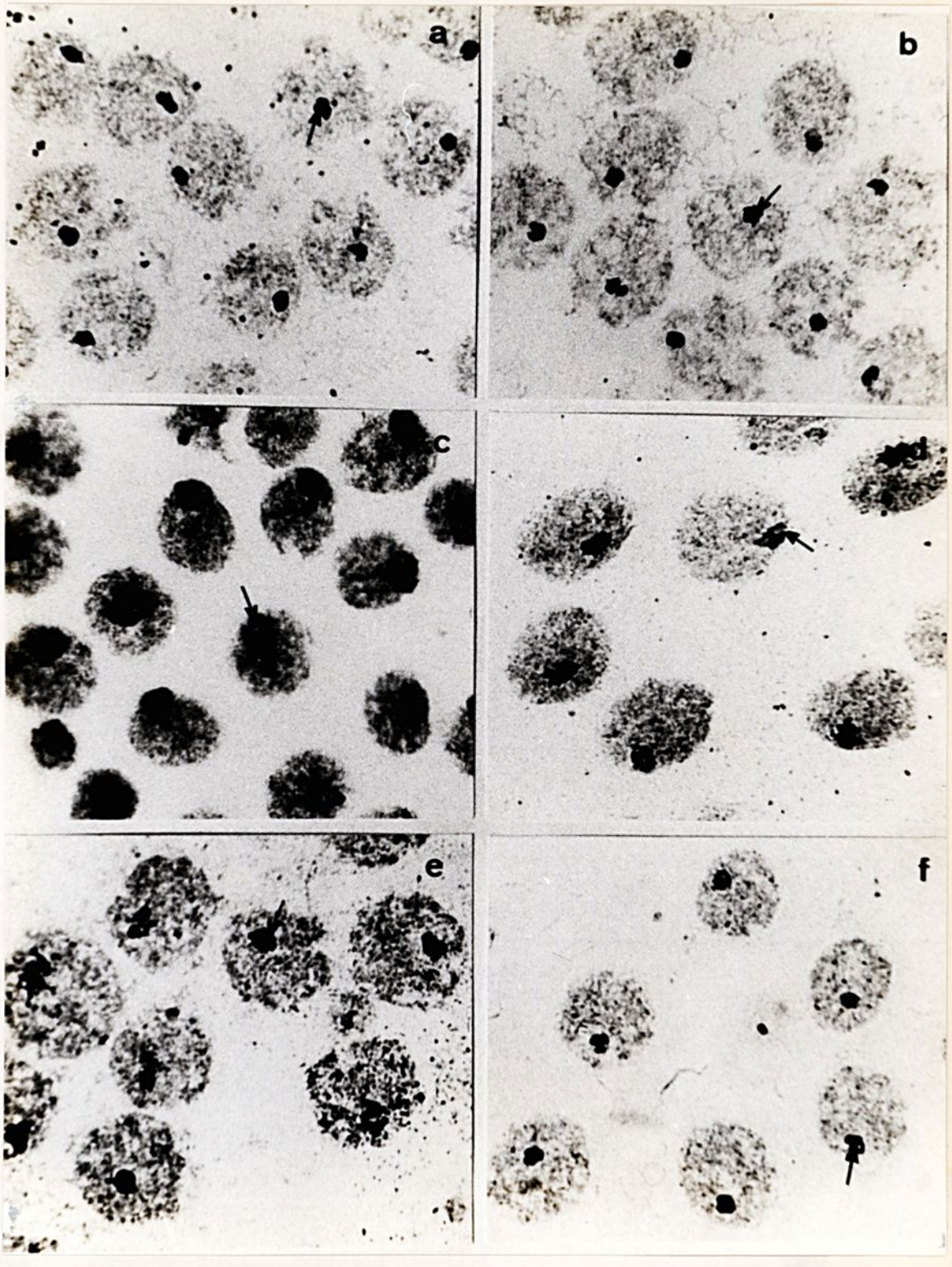


Fig. 30, **a-f**. Núcleos das células dos túbulos testiculares, submetidos à coloração com nitrato de prata. a-f - Núcleos interfásicos espermatogoniais de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), com uma única marcação nucleolar com vesículas no seu interior (setas).

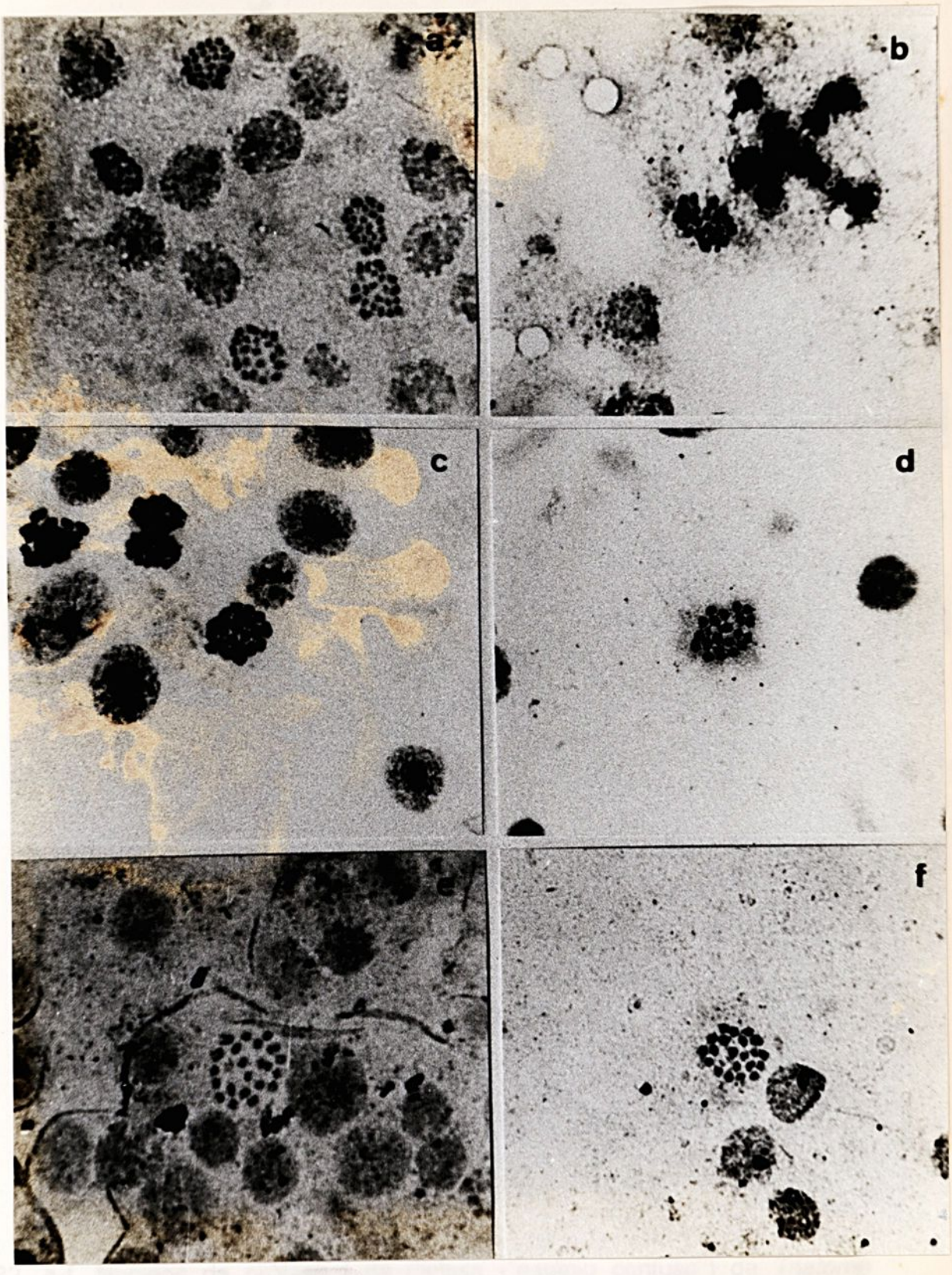


Fig. 31, **a-f** Metáfases espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a**), *T. delpontei* (**b**), *T. lecticularia* (**c,d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com nitrato de prata. Observar a ausência de marcações nucleolares.

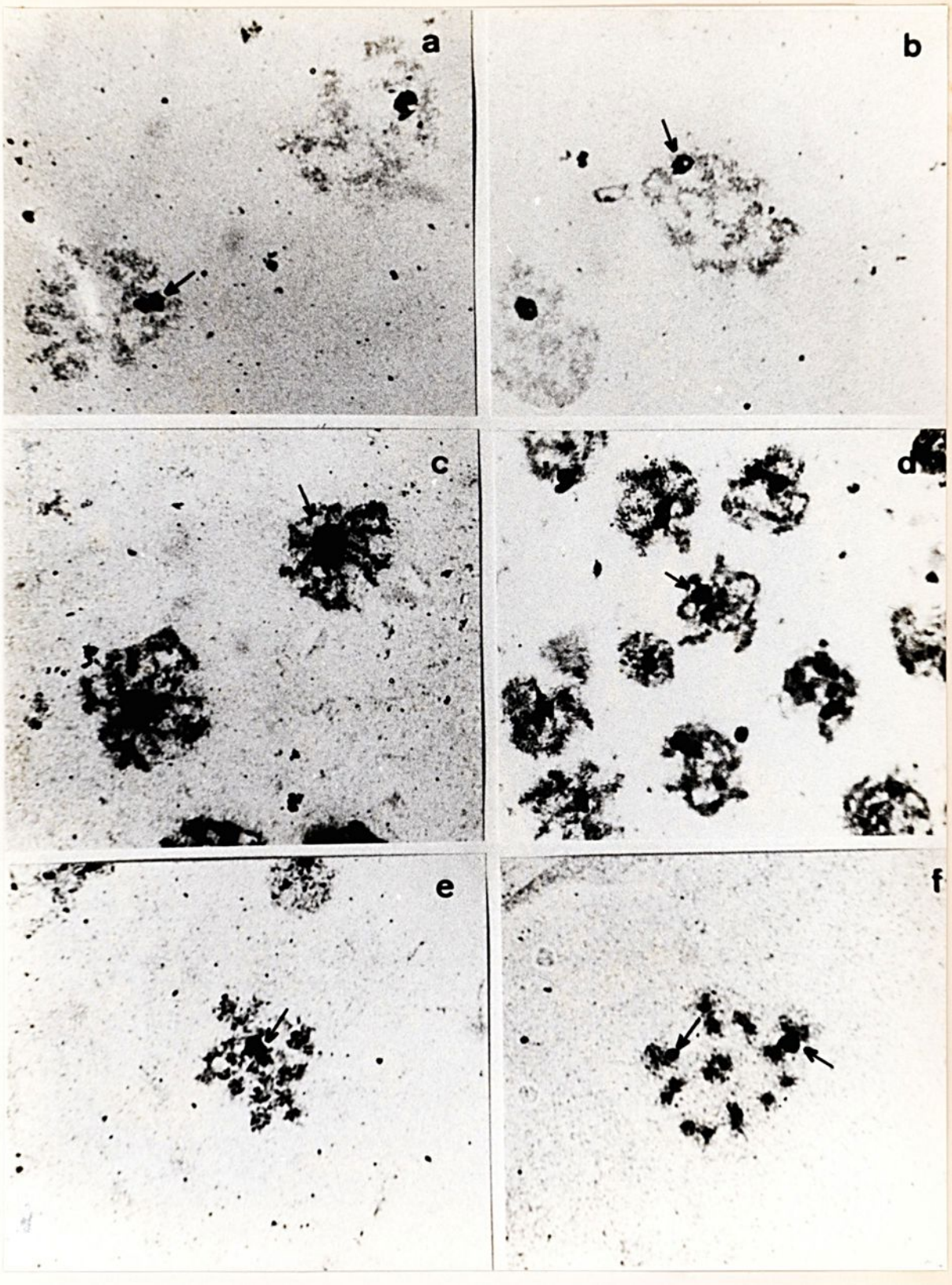


Fig. 32, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose ("estágio confuso") de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), corados com nitrato de prata. As setas indicam o bloco cromossômico marcado, correspondente aos cromossomos sexuais. Em *T. sordida*, (**e**), observar 02 blocos marcados.

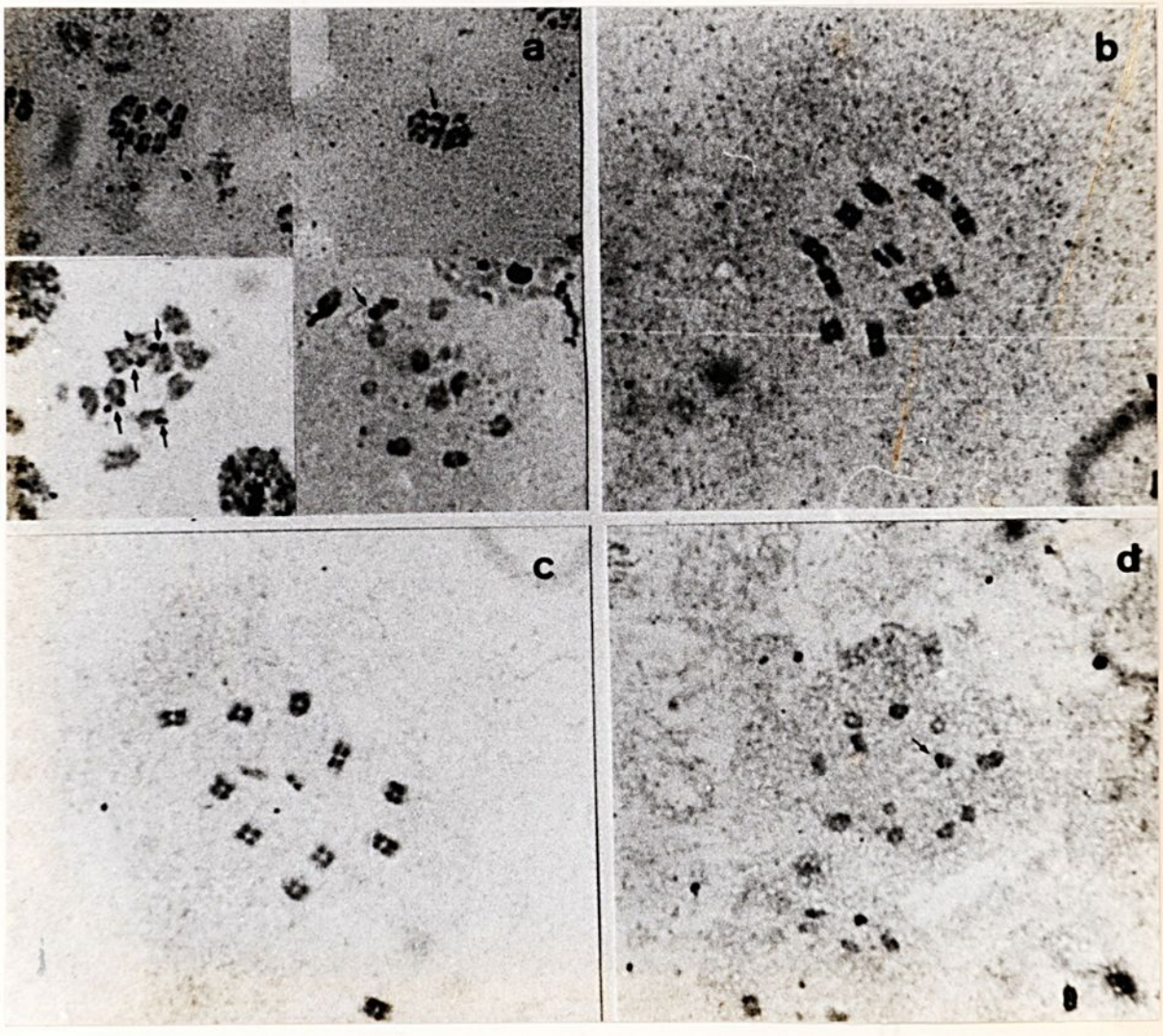


Fig. 33, **a-d**. Metáfases da 1ª divisão meiótica coradas com nitrato de prata. **a** - *Triatoma brasiliensis*. As setas indicam pequenas marcações nucleolares, sugerindo RONs. **b,c** - *T. delpontei.* Observar a ausência de marcações nucleolares. **d** - *T. sordida*. Um dos cromossomos possui uma evidente marcação (seta).

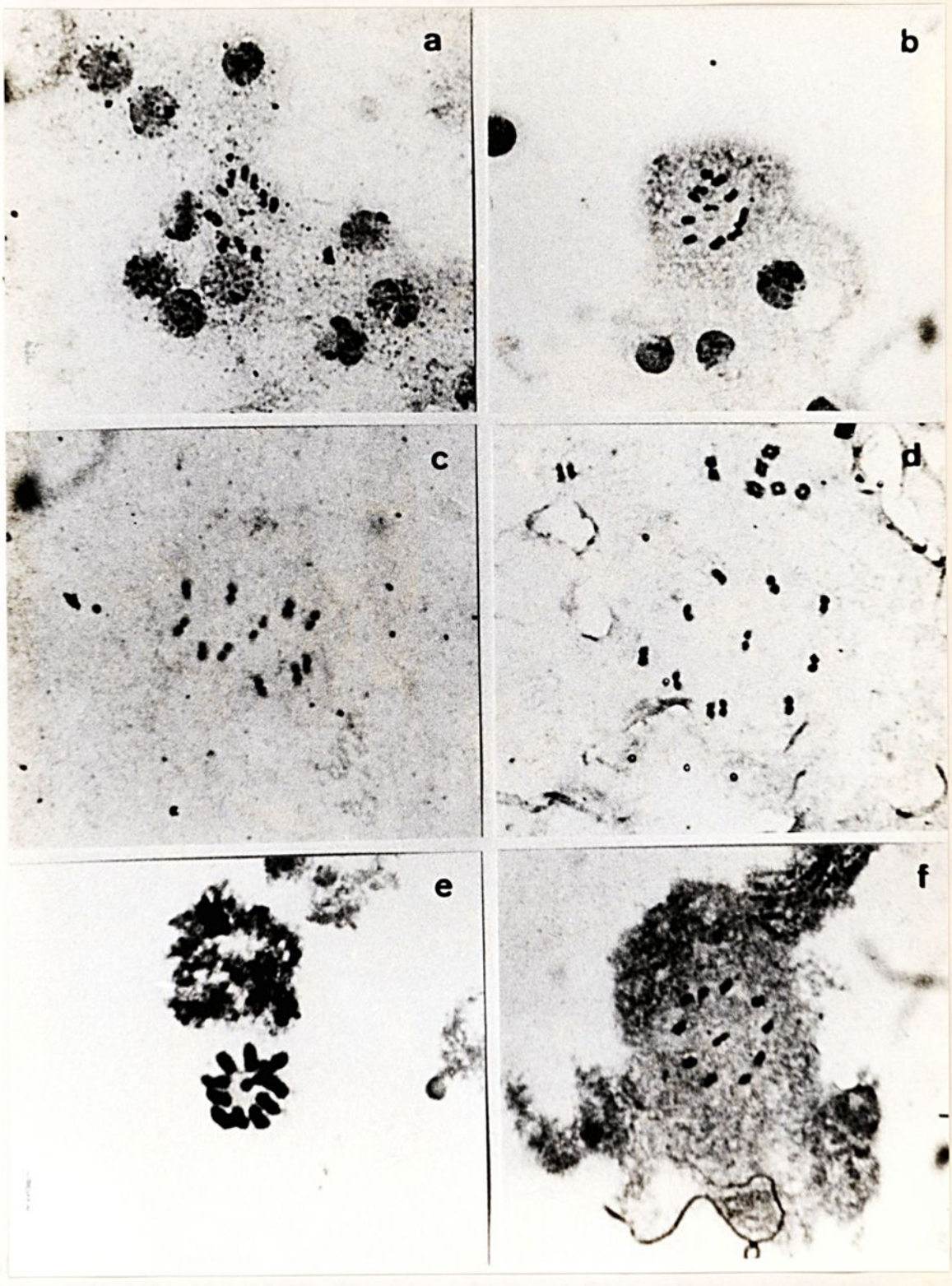


Fig. 34, **a-f**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c,d**), *T. lecticularia* (**e**) e *T. sordida* (**f**), coradas com nitrato de prata. Não se observa a presença de marcações nucleolares evidentes.

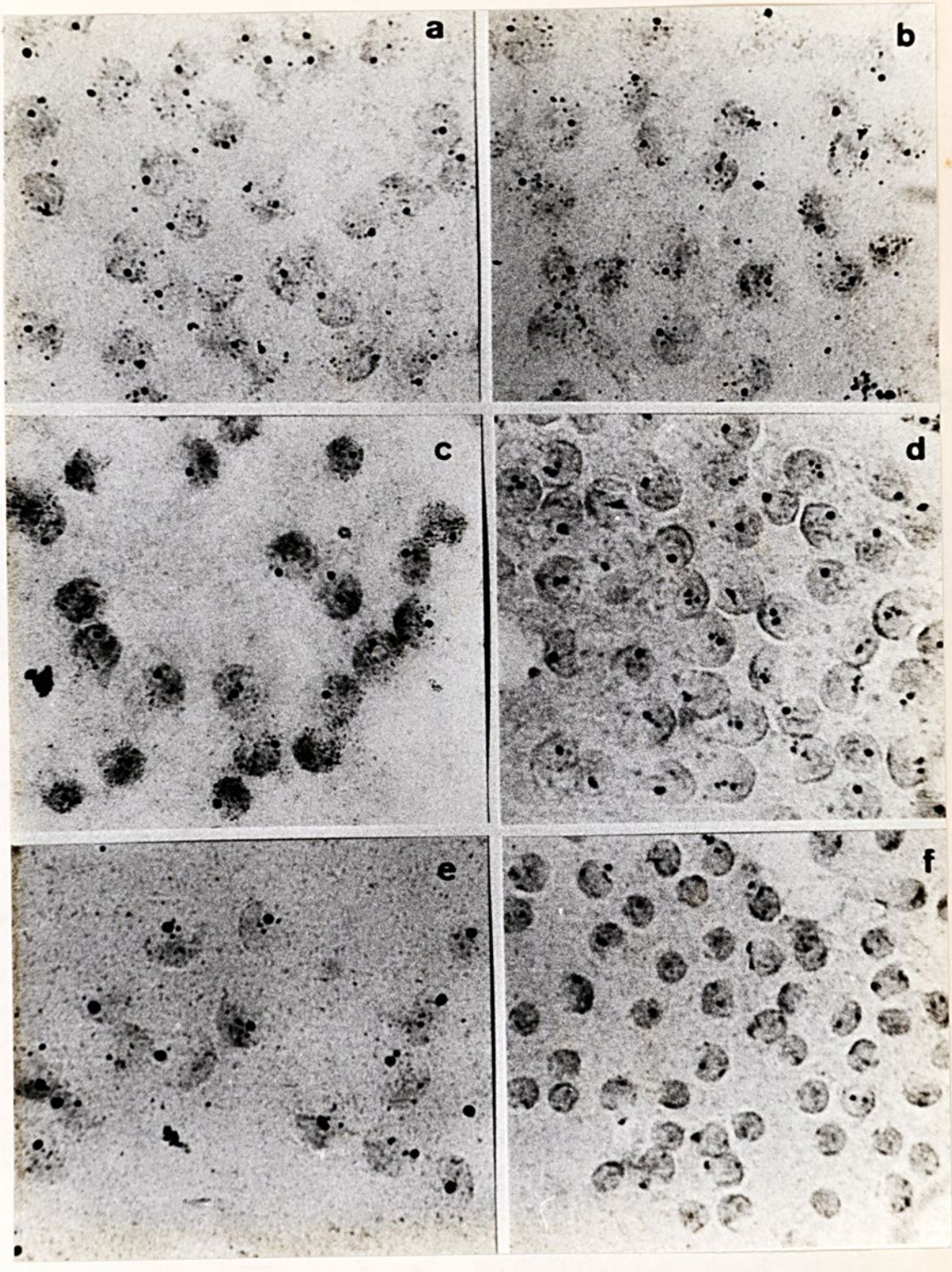


Fig. 35, **a-f**. Espermátides na fase inicial da espermiogênese, submetidas à coloração com nitrato de prata. **a-b**; **c**; **e** - Espermátides de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei* e *T. rubrovaria*, respectivamente, com 01 ou 02 evidentes marcações. **d** - *T. lecticularia*. Observar a presença de 01, 02 ou 03 marcações nucleolares. **f** - Espermátides de *T. sordida*, onde predominam marcações duplas.

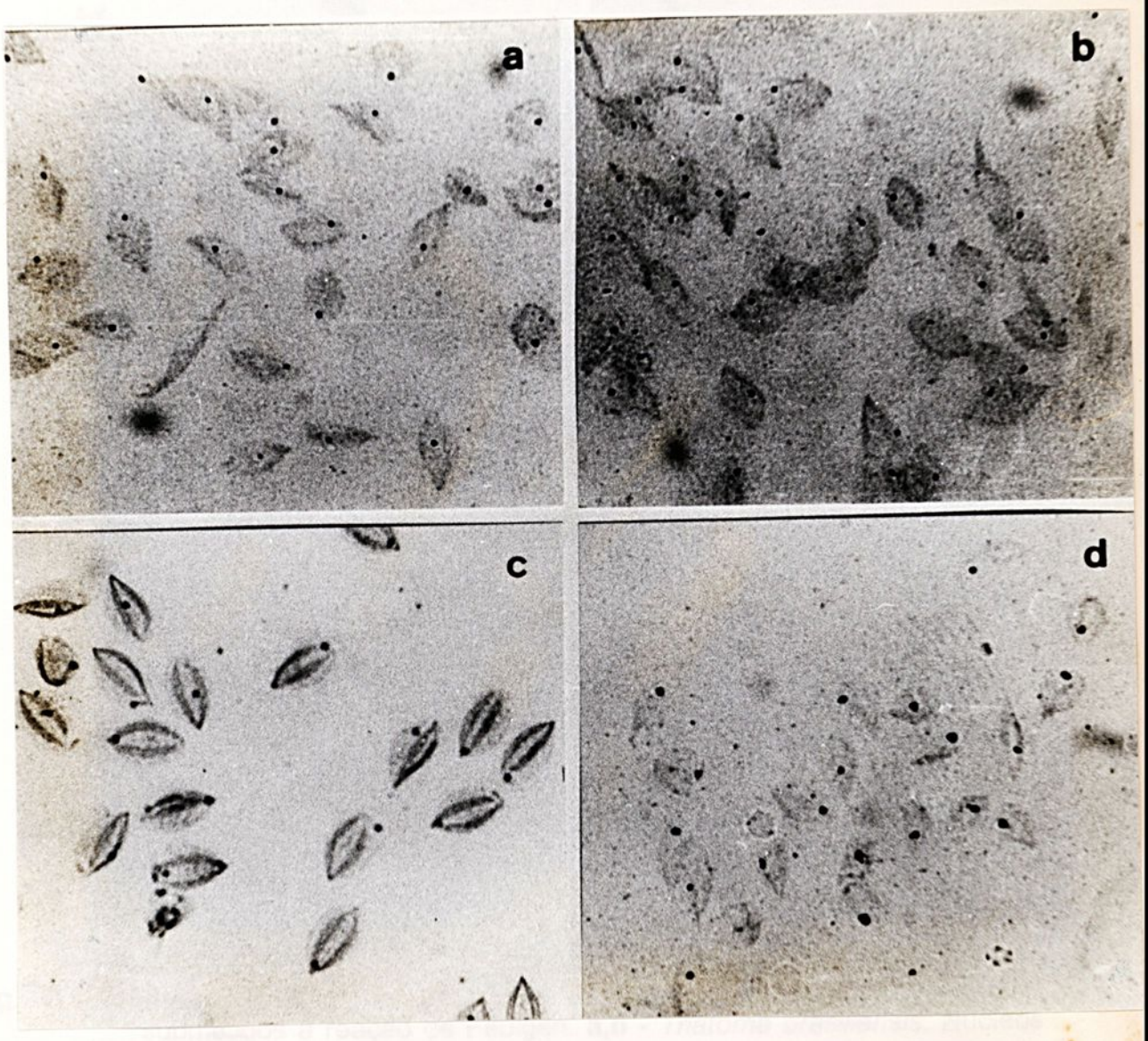


Fig. 36, **a-d**. Espermátides em fase mais adiantada da espermiogênese, coradas com nitrato de prata. **a,b** - *Triatoma brasiliensis,* **c** - *T. delpontei*, **d** - *T. sordida*. Observar a única massa pequena corada.

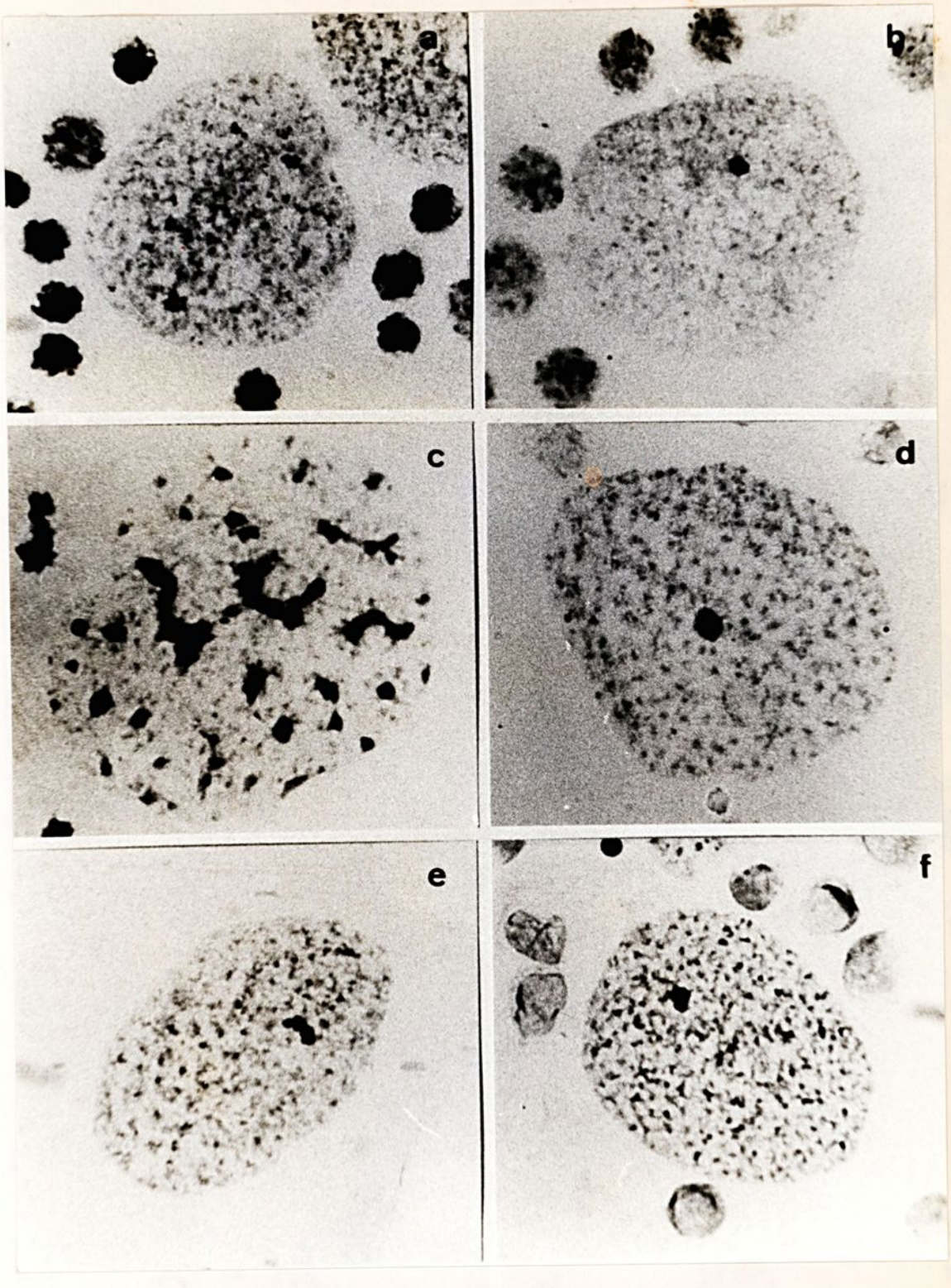


Fig. 37, **a-f**. Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede do túbulo testicular, submetidos à reação de Feulgen. **a,b** - *Triatoma brasiliensis*. Núcleos com várias e uma marcação respectivamente. **c** - *Triatoma delpontei* - Núcleos com várias marcações. **d-f** - Núcleos de *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* respectivamente, mostrando apenas uma marcação heterocromática.

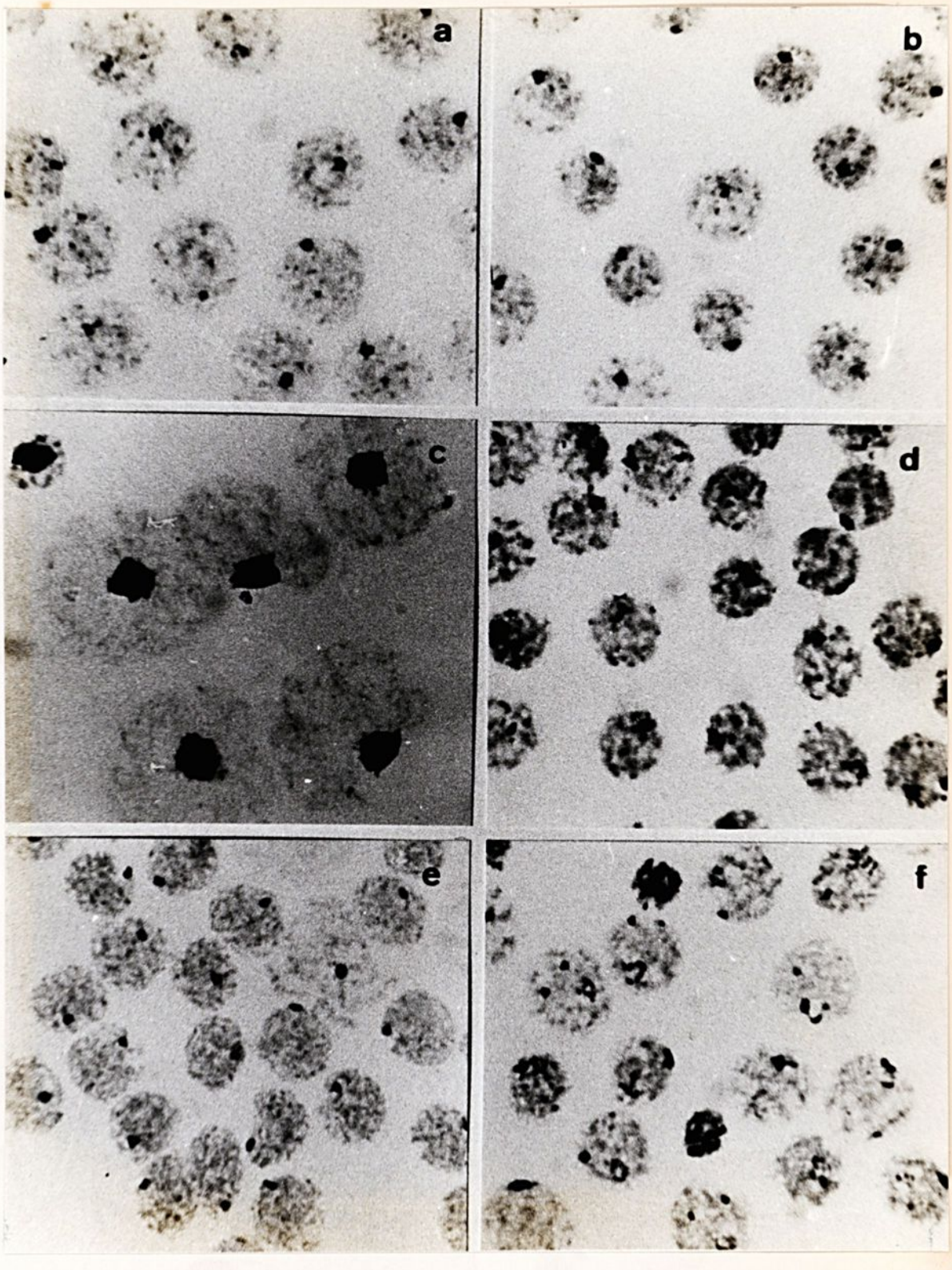


Fig. 38, **a-f**. Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares submetidos à reação de Feulgen. Observar a marcação única no caso de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**) e *T. rubrovaria* (**e**), ao passo que *T. sordida* (**f**) apresenta 02 ou mais marcações.

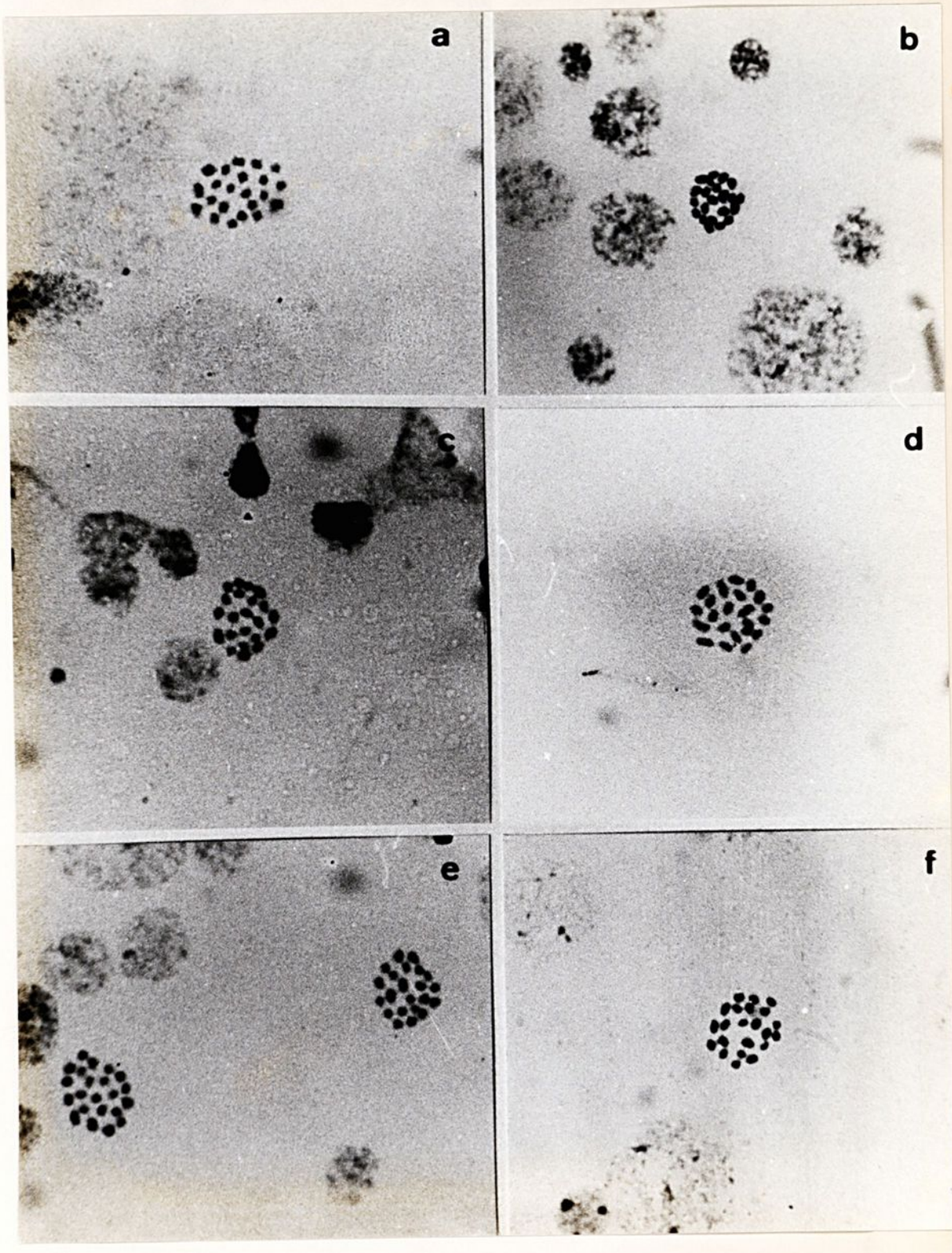


Fig. 39, **a-f**. Metáfases espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidas à reação de Feulgen. Observar a presença de filamentos unindo os cromossomos.

unesp

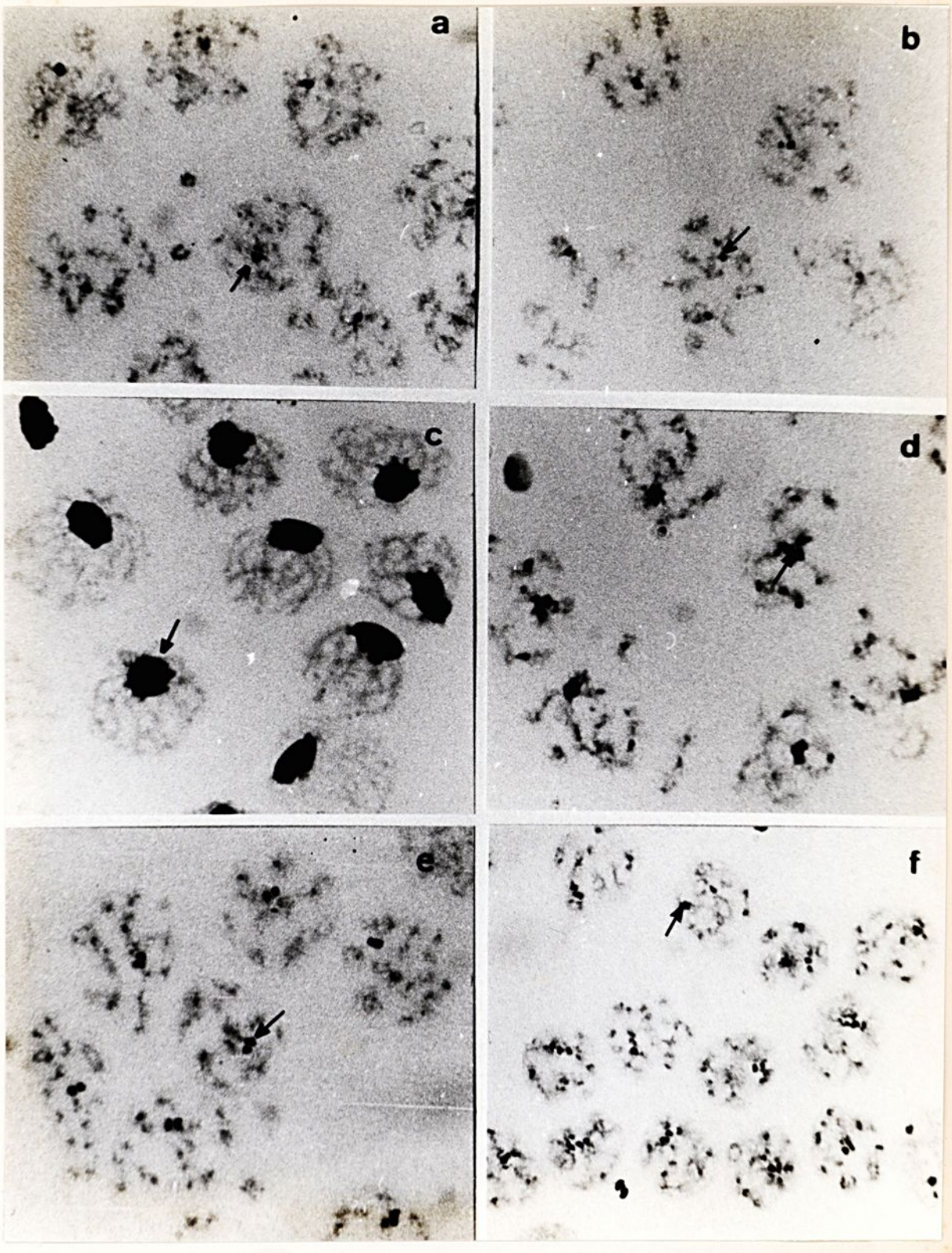


Fig. 40, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose ("estágio confuso") de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos à reação de Feulgen. As setas indicam um corpúsculo fortemente marcado, formado pelos cromossomos sexuais.

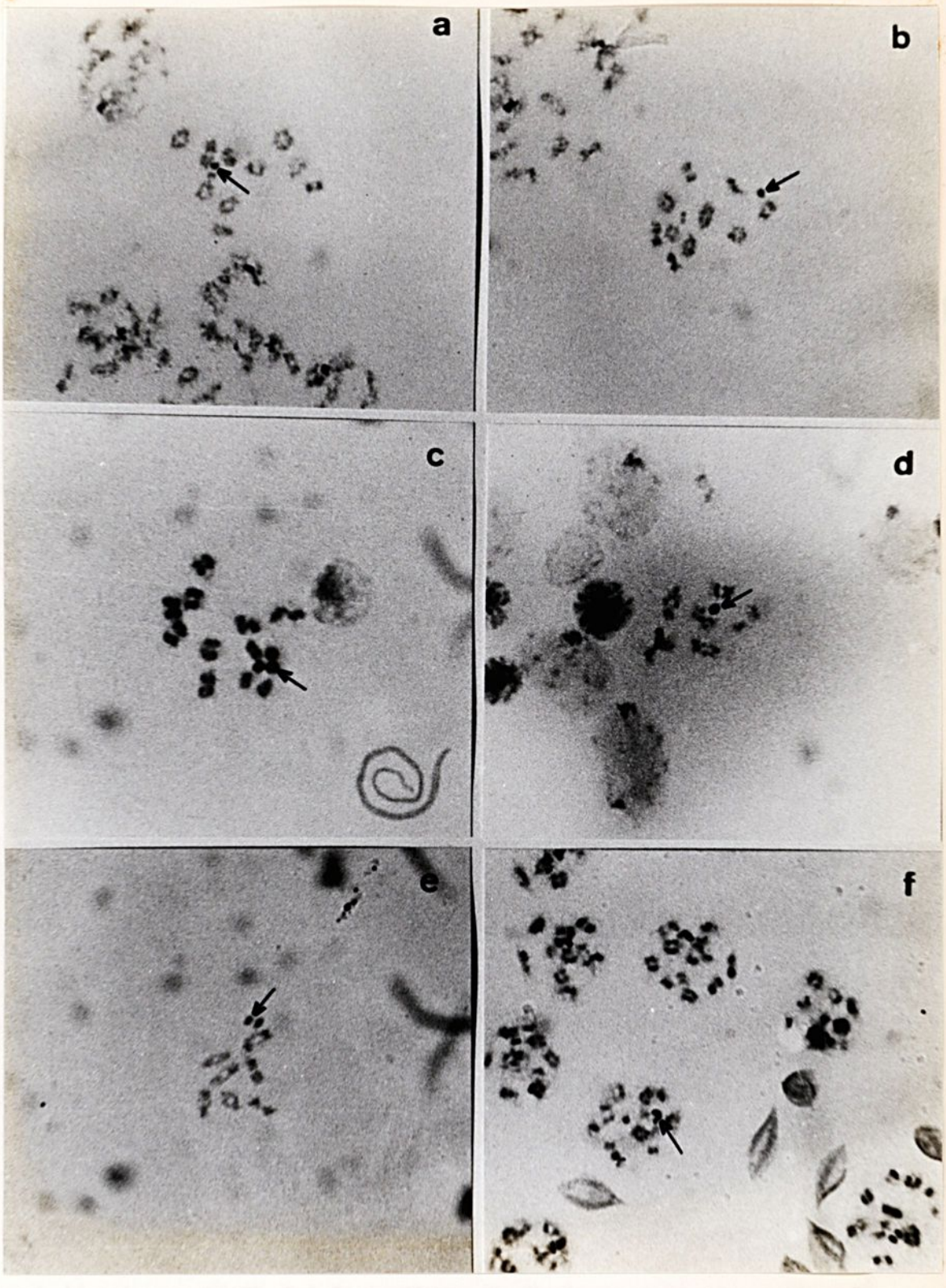


Fig. 41, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno) de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos à reação de Feulgen. As setas indicam a forte marcação do corpo compacto formado pelos cromossomos sexuais.

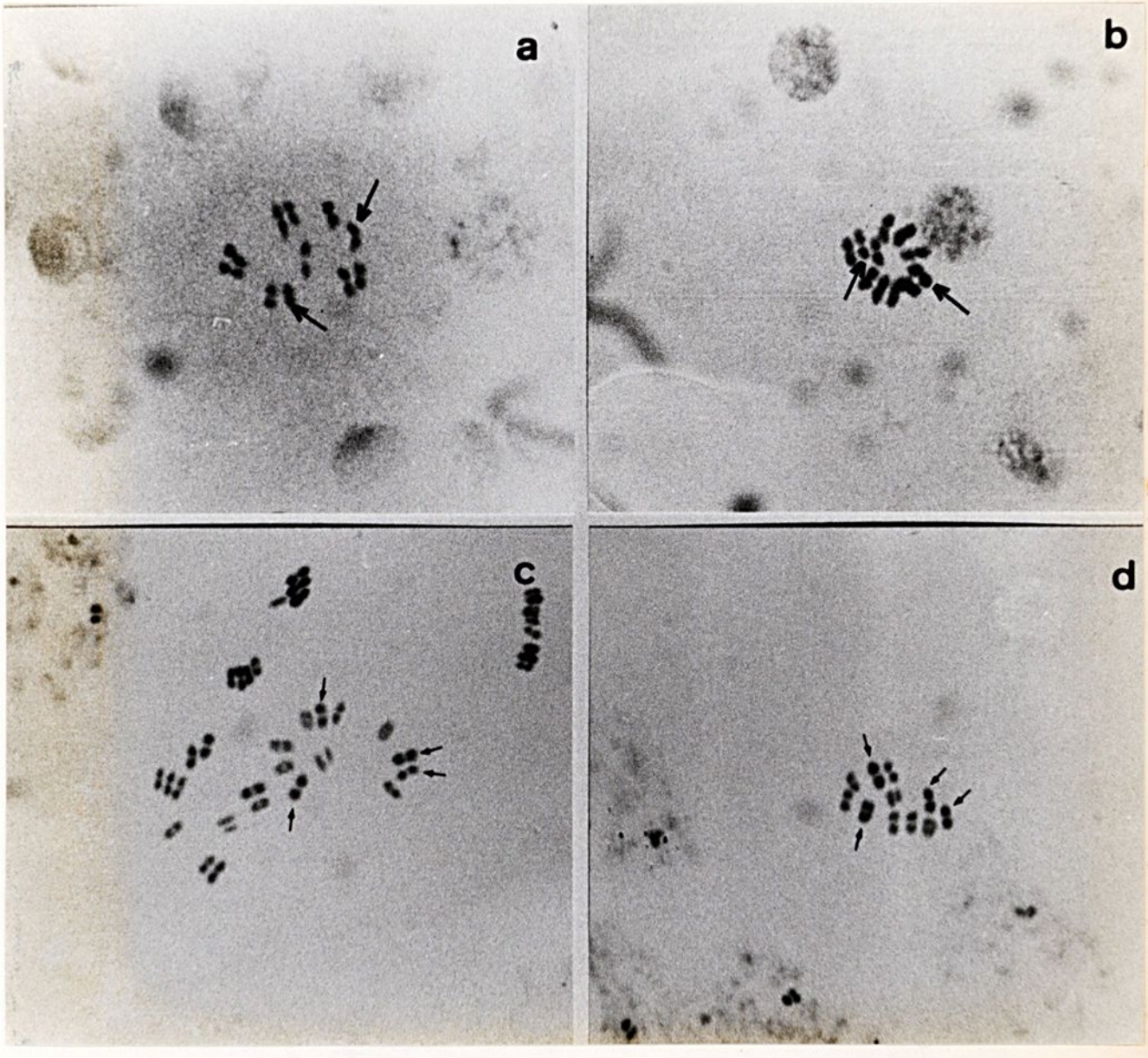


Fig. 42, **a-d**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma delpontei* (**a,b**) e *T. rubrovaria* (**c,d**), submetidas à reação de Feulgen. Notar que *T. delpontei* apresenta as extremidades de alguns cromossomos destacadas (setas), enquanto que *T. rubrovaria*, possui 04 cromossomos mais fortemente corados (setas menores).

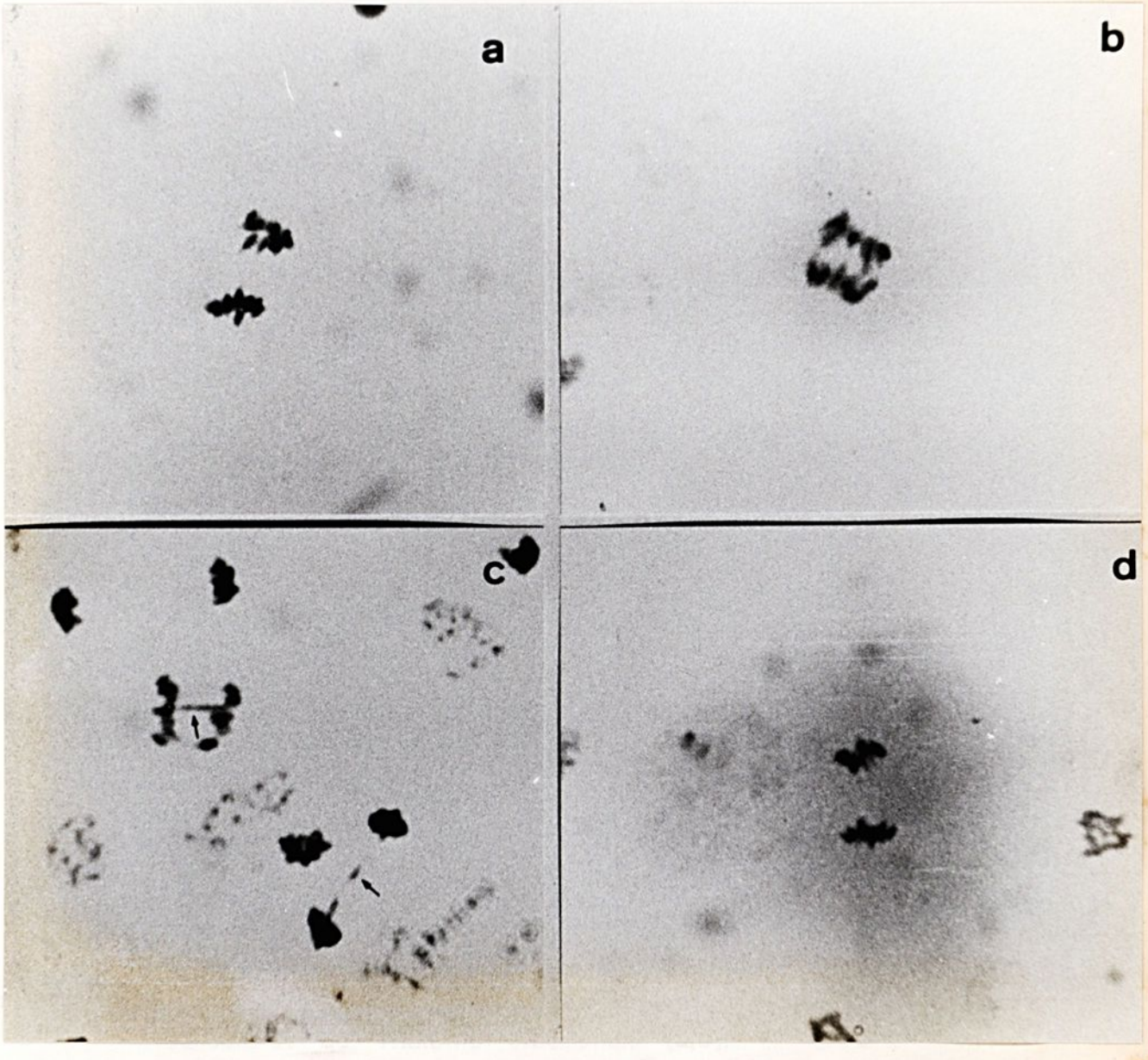


Fig. 43, **a-d**. Anáfases meióticas da 1ª divisão de *Triatoma delpontei* (**a-b**), *T. lecticularia* (**c**) e *T. rubrovaria* (**d**), submetidas à reação de Feulgen. As setas indicam cromossomos migrando tardiamente.

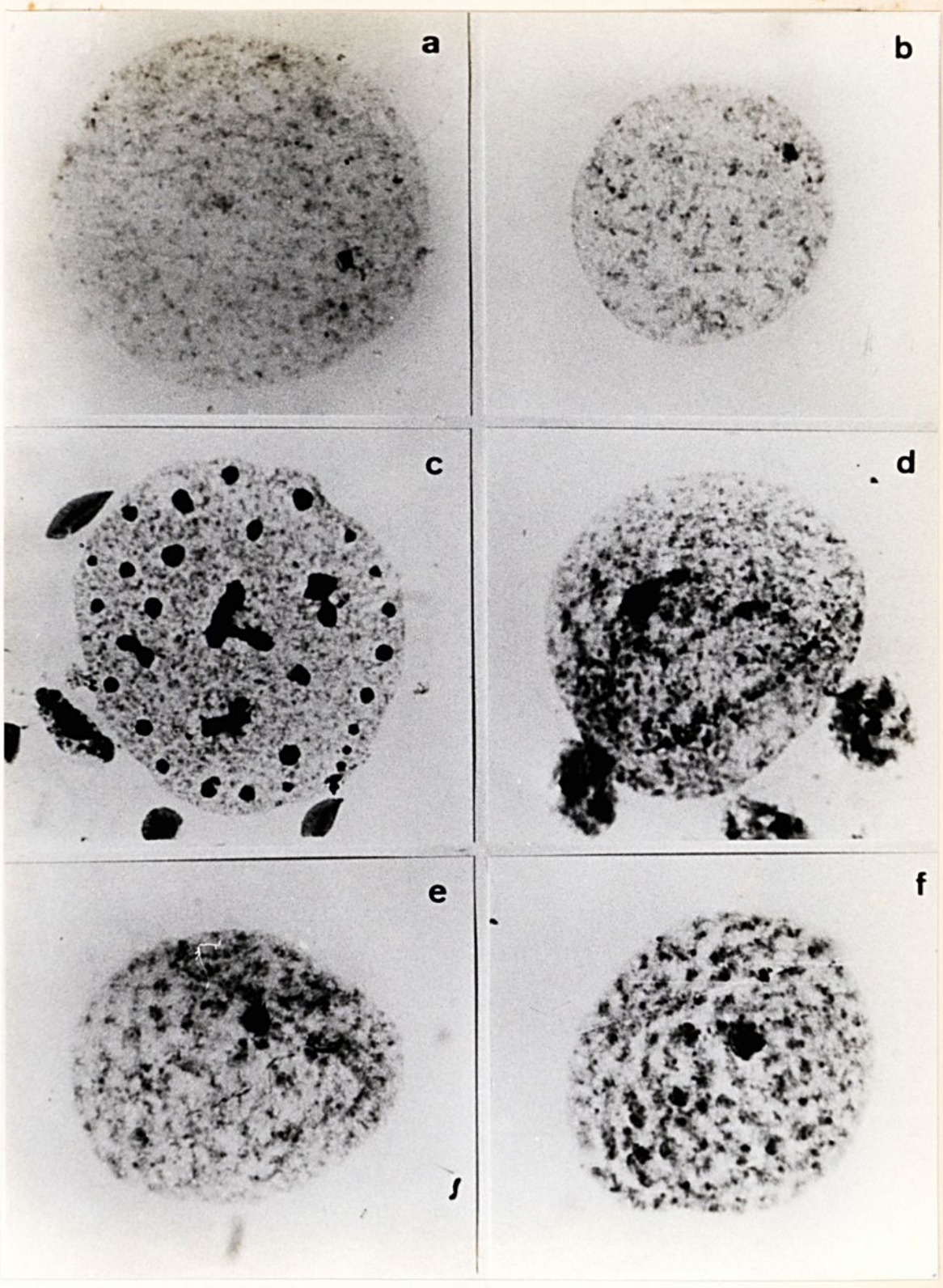


Fig. 44, **a-f.** Núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos ao bandamento C. Observar a presença de um único corpúsculo heterocromático em todas as espécies, exceto *T. delpontei* (**c**), onde se observa vários corpúsculos.

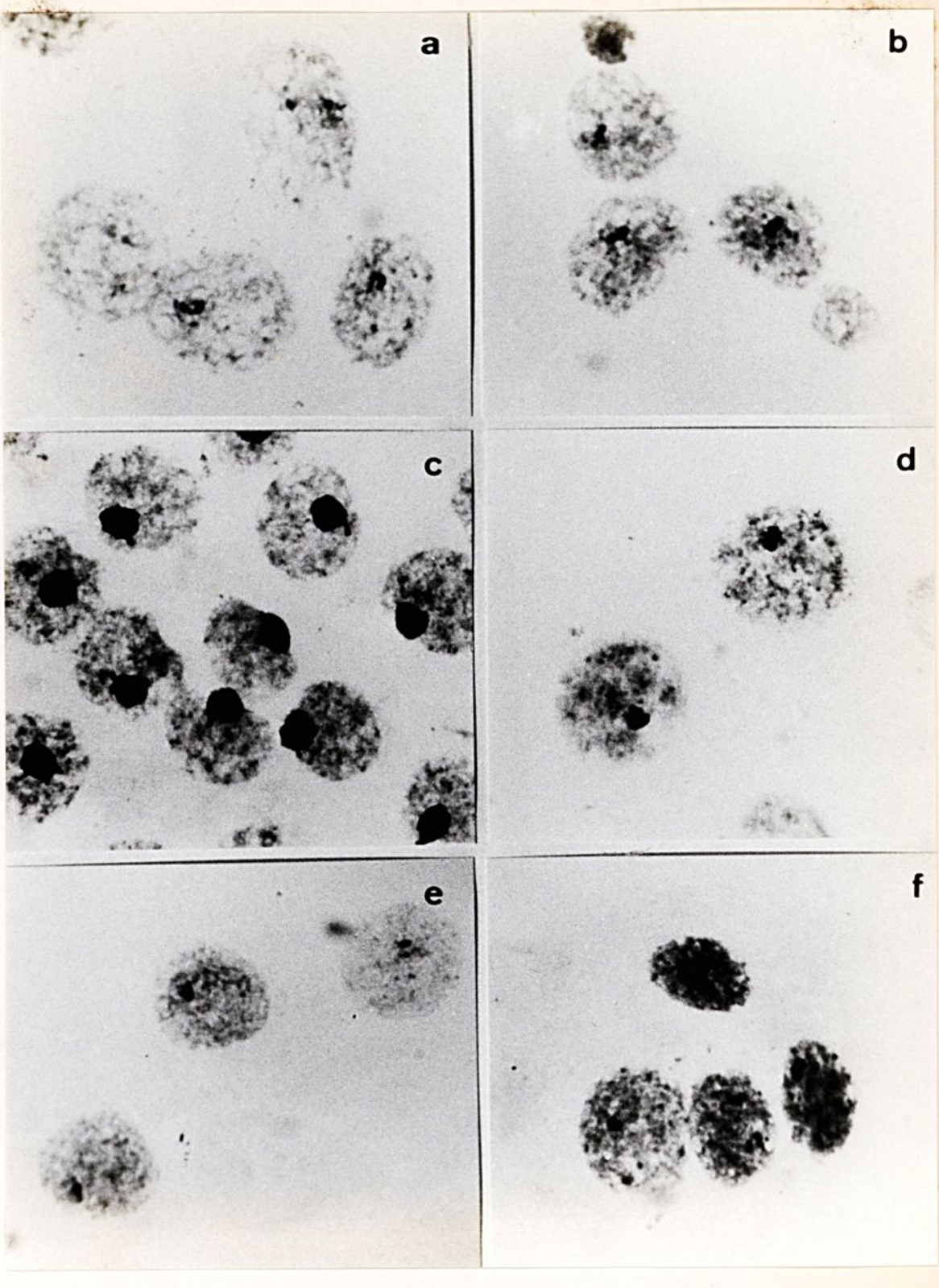


Fig. 45, **a-f**. Núcleos interfásicos das células espermatogoniais dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos ao bandamento C, mostrando a presença de um único corpúsculo heterocromático em todas as espécies

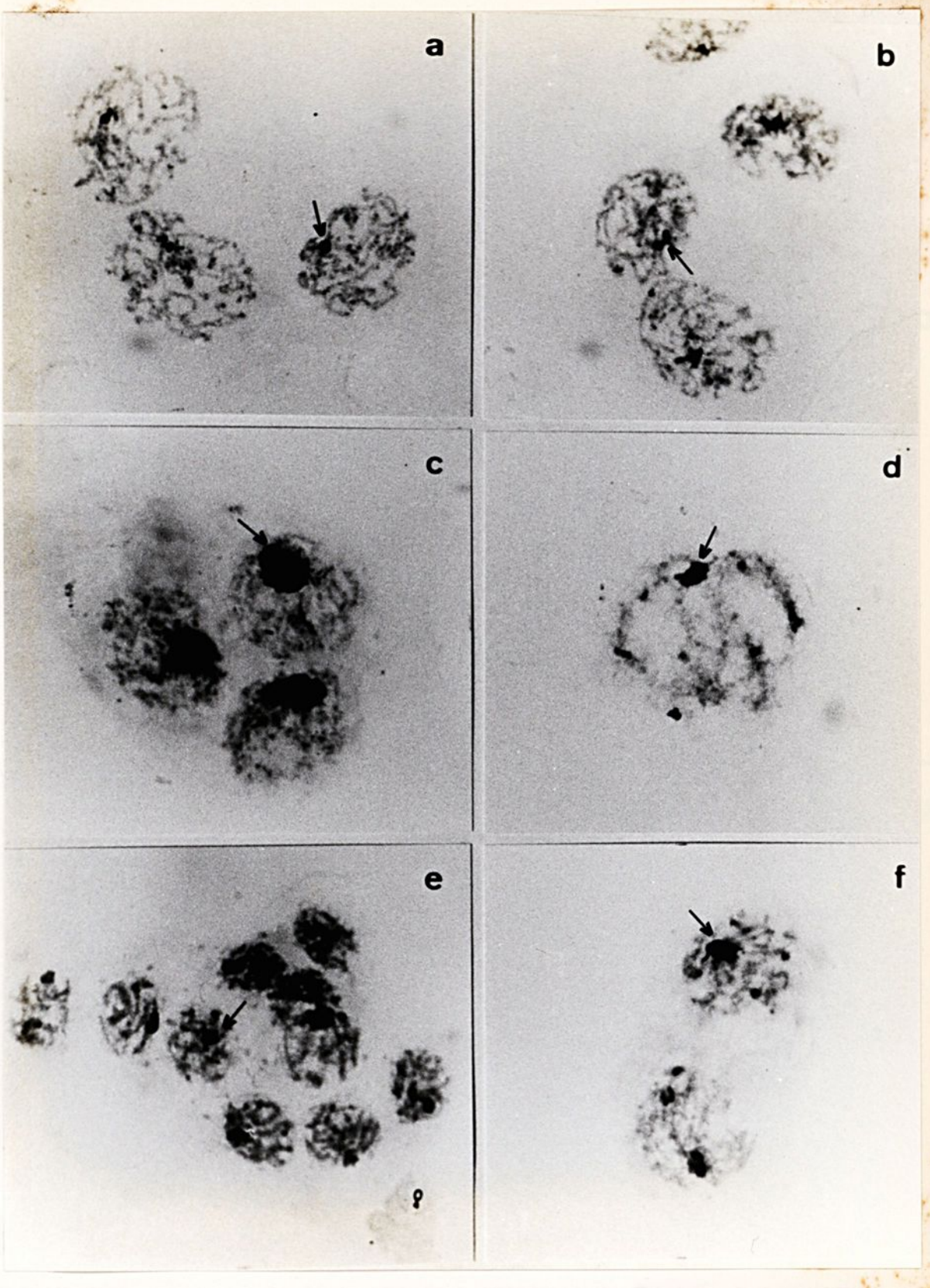


Fig. 46, **a-f**. Núcleos da prófase I da meiose ("estágio confuso") de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. delpontei* (**c**), *T. lecticularia* (**d**), *T. rubrovaria* (**e**) e *T. sordida* (**f**), submetidos ao bandamento C. As setas indicam a presença de um único cromocentro em todas as espécies.

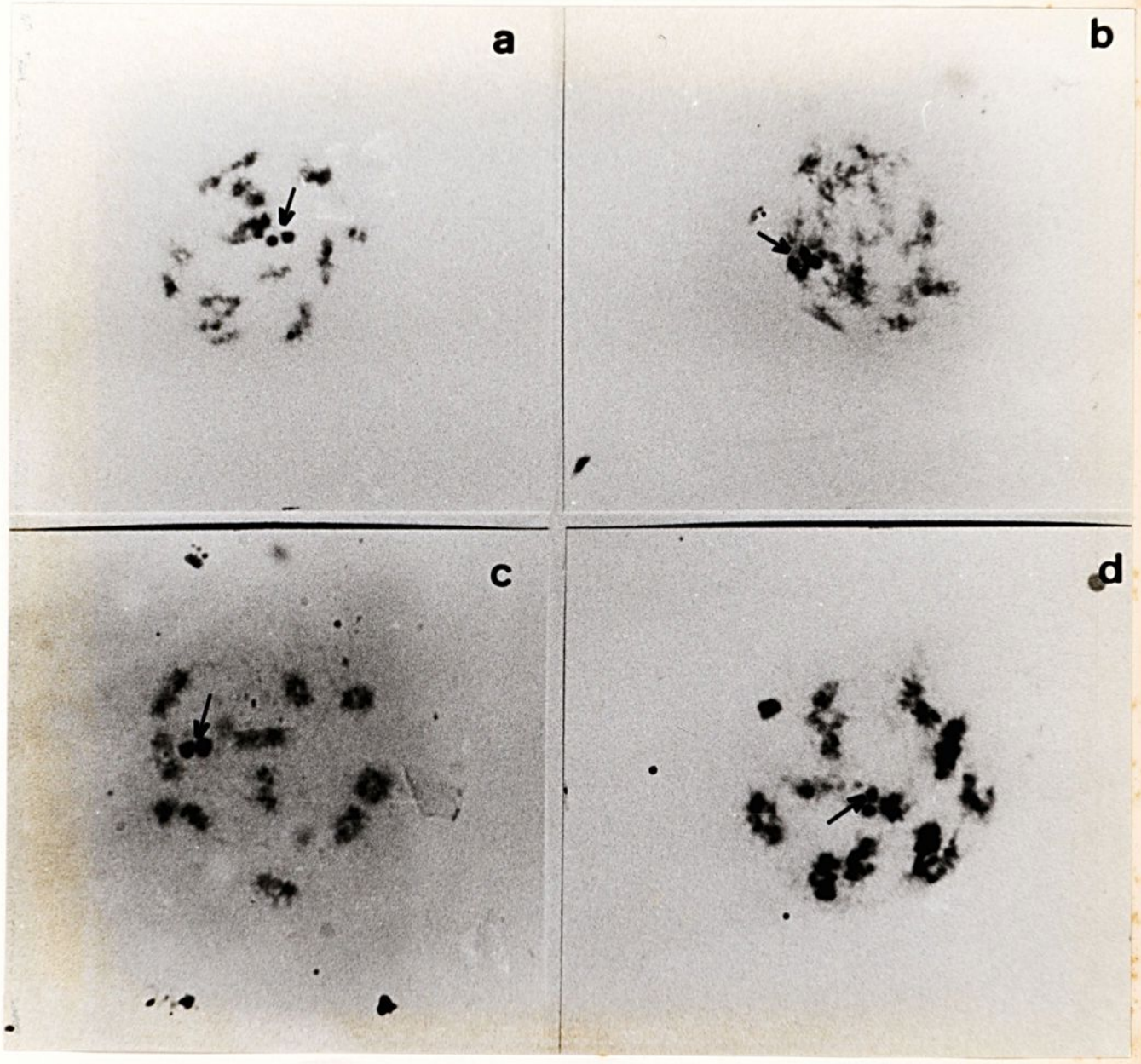


Fig. 47. **a-d.** Núcleos da prófase I da meiose (diplóteno) de *Triatoma brasiliensis* (**a,b**), *T. rubrovaria* (**c**) e *T. lecticularia* (**d**), submetidos ao bandamento C. Nota-se a presença dos cromossomos sexuais heterocromáticos (setas), destacando-se dos demais cromossomos.

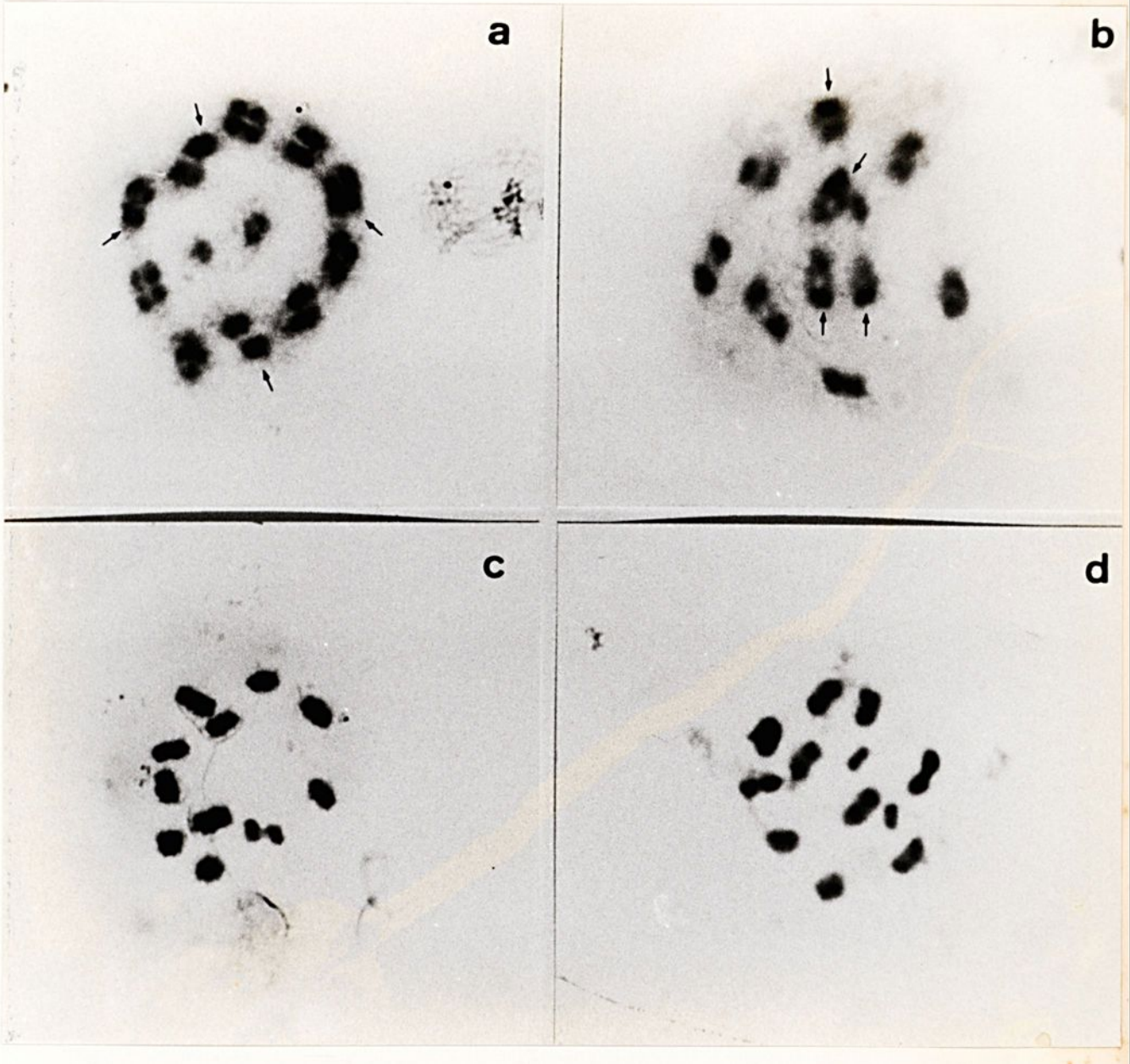


Fig. 48, **a-d**. Metáfases da 1ª divisão meiótica de *Triatoma delpontei* (**a,b**) e *T. lecticularia* (**c,d**), submetidas à técnica do bandamento C. As setas indicam algumas marcações evidenciadas nos cromossomos da espécies *T. delpontei*. Em *T. lecticularia*, as marcações não foram tão evidenciadas.

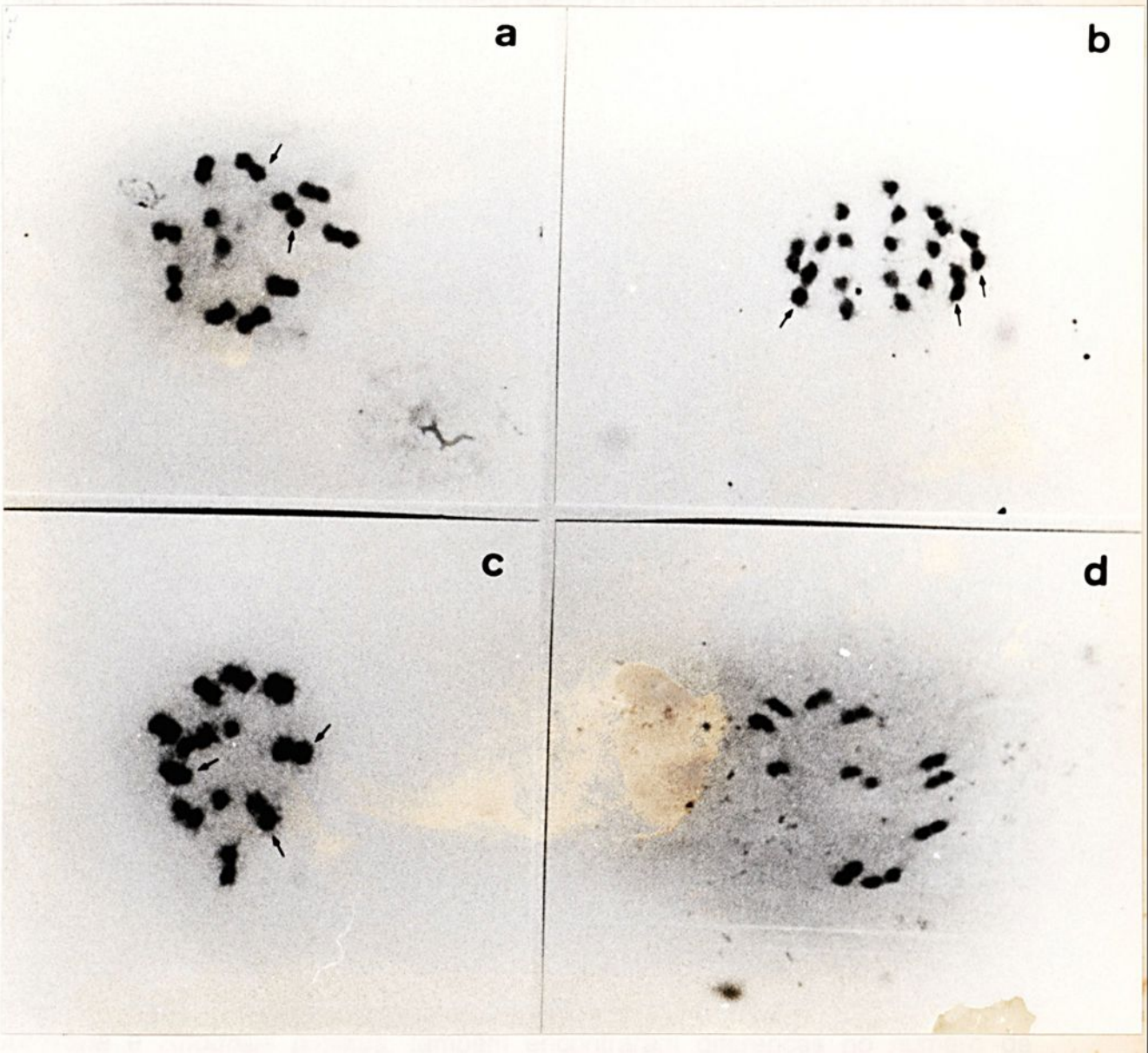


Fig. 49, **a-d**. Metáfases da 2ª divisão meiótica de *Triatoma delpontei* (**a,b**), *T. lecticularia* (**c**) e *T. rubrovaria* (**d**), submetidas à técnica do bandamento C. Observa-se algumas marcações nos cromossomos de *T. delpontei* e *T. lecticularia* (setas).

IV - DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisados, ao nível de microscopia óptica, aspectos da meiose, do comportamento nucleolar e do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em machos de *Triatoma brasiliensis, T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, visando a uma comparação entre essas espécies.

Como já estabelecido nos Resultados, os dados obtidos serão discutidos separadamente, estabelecendo-se sempre que necessário as devidas correlações. Pretende-se nesta discussão, traçar um perfil das principais características do ciclo meiótico destes insetos, as quais poderão servir de base para estudos futuros, além de fornecerem importantes evidências do processo evolutivo pelo qual passaram estes insetos. Para tanto, analisaremos seqüencialmente aspectos nucleares (núcleos poliplóides da parede dos túbulos testiculares, núcleos espermatogoniais); metáfases espermatogoniais (número cromossômico diplóide, tamanho dos cromossomos, mecanismo cromossômico sexual); prófase I inicial ("estágio confuso", diplóteno); metáfases I e II (disposição dos cromossomos sexuais em relação aos autossomos) ; anáfases (cromossomos retardatários), telófases e espermátides.

1. Coloração com orceína lacto-acética e Giemsa

Os resultados obtidos no presente trabalho, através da coloração dos testículos com orceína lacto-acética, mostram que os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares das cinco espécies analisadas, apresentam massas heterocromáticas destacadas e que, a heterocromatina, nos núcleos poliplóides de *Triatoma brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, aparecem sob a forma de um corpúsculo ovalado ou irregular, predominantemente único. Entretanto, em *T. delpontei*, foi observada uma variação no número, forma e localização destes corpúsculos heterocromáticos, o que pode estar associado aos diferentes padrões de heterocromatinização dos núcleos poliplóides desta espécie.

De Vaio **et alii** (1985), analisando a meiose de *Triatoma infestans, T. rubrovaria* e *Rhodnius prolixus*, também encontraram diferenças no número de cromocentros que os núcleos poliplóides das células nutritivas destas espécies apresentavam. Verificaram que *R. prolixus* apresentou um único cromocentro compacto, ao passo que dois elementos mais heteropicnóticos foram observados em *T. rubrovaria*. No caso de *T. infestans*, os vários cromocentros observados,

puderam ser relacionados com a presença de regiões heterocromáticas em alguns dos cromossomos desta espécie. Este fato sugere que um número variável de autossomos pode participar da formação destes cromocentros, afetando obviamente o tamanho destes. Este número é espécie-específico e, depende do número de pares de autossomos que contém blocos heterocromáticos.

Variações no número de cromocentros presentes nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma vitticeps*, *T. pallidipennis*, *T. infestans* e *T. maculata*, também foram encontradas por Azeredo-Oliveira (1990).

Nossos resultados demonstram ainda que, os núcleos espermatogoniais em intérfase de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei* e *T. rubrovaria*, apresentam um único corpúsculo heterocromático, sendo que este corpúsculo chama a atenção em *T. delpontei,* devido ao seu tamanho. De acordo com Panzera **et alii** (1995), em *T. delpontei*, este cromocentro é formado pela associação heteróloga das regiões heterocromáticas de todos os bivalentes autossômicos e dos cromossomos sexuais. Já *T. sordida* e *T lecticularia* possuem um corpúsculo heterocromático maior e vários pequenos pontos destacados. Nota-se ainda, que estes corpúsculos apresentam-se com um aspecto vesiculoso, o mesmo acontecendo nos núcleos espermatogoniais de *T. brasiliensis*.

Mais uma vez, as observações do presente trabalho, corroboram os achados de Azeredo-Oliveira (1990), que encontrou, nos núcleos espermatogoniais de três das quatro espécies estudadas, apenas um corpúsculo heterocromático. Entretanto, este número pode chegar a cinco em *T. pallidipennis*.

Aceita-se que os núcleos com múltiplos cromocentros resultaram de núcleos que apresentavam um único cromocentro, o qual sofreu fragmentação. Esta fragmentação pode estar associada com a expressão de "genes silenciosos" da heterocromatina do cromocentro (Mello, 1980). Além disso, verifica-se nos trabalhos citados, e nos resultados por nós apresentados, algumas diferenças em relação ao tamanho destes cromocentros, as quais também podem ser relacionadas à atividade celular. Desta forma, núcleos com áreas heterocromáticas menores, podem ser interpretados como núcleos de maior atividade celular, se for considerado que uma das características principais da heterocromatina é sua inatividade gênica.

O fato de que este tipo de cromatina se encontra constantemente condensado e de que o estado condensado se encontra comumente associado ao bloqueio da transcrição, sugere que mesmo que ocorram genes na heterocromatina, estes estejam bloqueados (Guerra, 1988).

De acordo com Brown (1966), vários aspectos apoiam esta importante característica atribuída à heterocromatina: ausência de mutantes detectáveis na maior parte dos genes do cromossomo Y; ausência de mutantes detectáveis na

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

maior parte das regiões próximas ao centrômero, supressão de função dos cromossomo X de mamíferos XX; supressão de função no conjunto paterno dos cromossomos de pulgões; segmento do cromossomos X de *Drosophila*, compatível ao Y heterocromático e geneticamente inativo.

Entretanto, na literatura, há diversos trabalhos cujos achados contrariam a inatividade gênica da heterocromatina, ponto que será discutido oportunamente ainda neste trabalho.

Apesar disto, essas variações, presentes nos núcleos poliplóides das células nutritivas e nos núcleos espermatogoniais destas espécies, podem estar relacionadas às diferenças nucleares fenotípicas dos indivíduos, induzidas por variações individuais, genéticas e ambientais, acumuladas ao longo de seus processos evolutivos.

Uma outra observação do presente trabalho, é que o complemento cromossômico diplóide das cinco espécies estudadas, é constituído por 22 cromossomos, sendo 20 autossomos e 02 sexuais em todas elas.

Analisando-se a Tab. 01, verifica-se que, pelo menos 36 espécies (representando 06 gêneros) de cerca de 100 espécies de triatomíneos já foram investigadas citogeneticamente. Porém, segundo Ueshima (1966), o gênero que é considerado mais primitivo, ainda não foi investigado, devido à sua raridade e, portanto, quando se avalia o significado evolutivo dos caracteres cromossômicos dos triatomíneos, deve-se considerar este fato. Além disso, as informações sobre a evolução cromossômica nos triatomíneos são bastante limitadas devido à dificuldade de se detectar variações estruturais nos cromossomos dos mesmos. Isto é devido à falta de um centrômero diferenciado morfologicamente e também, de diferenciação longitudinal dos seus cromossomos holocêntricos.

Apesar destas limitações, os dados citogenéticos disponíveis até o momento, nos permitem algumas conclusões em relação à evolução cromossômica ao nível de subfamília.

De acordo com revisão efetuada, a amplitude de variação do número cromossômico nos machos da subfamília Triatominae é de 21 a 25 (Tab. 01, Fig. 01), sendo que cerca de 60% das espécies apresentam número diplóide igual a 22.

Ueshima (1966) já havia sugerido que o número modal nesta subfamília é 22 (20A + XY no macho). Desta forma, o valor diplóide encontrado nas espécies por nós analisadas, são coincidentes com os dados existentes em literatura e, confirmam os achados de Schreiber e Pellegrino (1950); Barth (1956b) e Ueshima (1966).

Porém, em todas as discussões sobre o número modal, deve-se ter em mente o fato de que as espécies estudadas citologicamente podem não representar uma amostra casual, desde que alguns grupos são estudados mais extensivamente que outros (Ueshima, 1966). Deve-se questionar ainda, qual o significado da existência

de um complemento cromossômico típico num grupo de insetos. Alguns citogeneticistas o consideram como o cariótipo ancestral (Ueshima, 1966; White, 1973), mas outros, entre eles Smith e Virkki (1978) e Perez **et alii** (1992), questionam esta interpretação e tentam explicá-la como uma situação citológica ideal em cada grupo, sendo o produto de seleção natural, mais do que o cariótipo ancestral do grupo. Nós, particularmente, preferimos a segunda explicação para a existência de um complemento cromossômico mais freqüente num grupo de insetos.

Deve-se considerar, entretanto, que os dados cromossômicos acima são bastante limitantes, uma vez que a subfamília Triatominae é bem numerosa e oferece apenas algumas indicações preliminares, pois somente metade dos gêneros foram investigados citogeneticamente até agora. Estes dados poderão sofrer alterações, ou serem realmente confirmados, com o aumento do número de espécies analisadas.

O mecanismo dos cromossomos sexuais nesta sub-família varia de XY a $X_1X_2X_3Y$ (Tab. 01). A análise da Tab. 01 nos indica também, que a maioria dos desvios do número cariotípico mais freqüente desta subfamília, é devida aos cromossomos sexuais compostos e que nenhum sistema XO foi descoberto nos triatomíneos até agora. Portanto, este grupo se comporta diferentemente dos outros Heteroptera.

Nos Heteroptera, os cromossomos sexuais compostos têm sido descritos nas famílias Gelastocoridae, Nepidae, Coreidae, Pentatomidae, Cimicidae e Reduviidae. Nos Nabidae, Plastapidae e Tingidae não foram encontrados ainda. Quando os cromossomos sexuais compostos ocorrem em insetos, tais como os Orthoptera e Diptera, há uma tendência para diminuição do número de autossomos, à medida que o número de cromossomos sexuais aumenta (White, 1954), mas, nos Heteroptera, não existe essa relação (Schrader, 1947). Isto também é verificado nos Triatominae.

A observação destas mesmas placas metafásicas nos leva a concluir que existem pequenas diferenças nos tamanhos dos autossomos das espécies por nós analisadas, apesar de *T. delpontei* apresentar uma nítida diferenciação estrutural em seus cromossomos, isto é, a presença de uma região heteropicnótica em apenas uma extremidade cromossômica.

Schreiber e Pellegrino (1950) já apontavam que havia pequenas variações no tamanho dos autossomos das espécies de triatomíneos. As únicas exceções relatadas são *T. infestans* e *T. platensis*, que possuem três longos pares de autossomos (Barth, 1956a; Ueshima, 1966; Solari, 1979). Provavelmente, o aumento no tamanho dos autossomos em *T. infestans* tem a ver com a presença de heterocromatina constitutiva nestes três pares, como demonstrado por Solari (1979).

As diferenças no tamanho dos cromossomos entre as espécies são mais evidentes do que aquelas entre os autossomos do mesmo cariótipo, com exceção de *T. infestans*. De acordo com Barth (1956b), *T. sordida* apresenta três pares grandes de autossomos, três pares intermediários e três pares pequenos, sendo o X e o Y de tamanhos quase iguais. Este autor nos fornece ainda, um quadro comparativo dos cromossomos de *Triatoma maculata, T. vitticeps, T. infestans, Panstrongylus megistus, Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*, de acordo com o tamanho relativo dos mesmos. Fica claro, através de seu trabalho, que o cromossomo Y é o maior cromossomo do par sexual.

Dentre as várias espécies estudadas por Ueshima (1966), encontramos *T. lecticularia,* espécie também analisada no presente trabalho. O referido autor estabeleceu que os dez pares de autossomos, na metáfase espermatogonial de *T. lecticularia* consistem de quatro pares grandes, três pares intermediários e três pares pequenos e, apesar de não apresentar uma classificação geral para as espécies por ele analisadas, deixa claro, através de fotomicrografias, que em algumas espécies, existem poucas diferenças de tamanho entre os cromossomos sexuais, enquanto que em outras, esta é marcante. Esta última característica parece ocorrer principalmente em espécies que possuem cromossomos sexuais múltiplos.

Esta mesma característica pode ser observada no trabalho de Schreiber, Bogliolo e De Pinho (1972), para as espécies *Triatoma vitticeps* e *Panstrongylus herreri,* onde o X é maior que o cromossomo Y, sendo que o inverso se observa em *P. megistus*. Contudo, estes autores encontraram dificuldades em distinguir os cromossomos sexuais em *T. pseudomaculata* e em *R. prolixus*.

De Vaio **et alii** (1985) ressaltaram que é muito difícil saber precisamente qual é o cromossomo sexual X e qual é o Y. Estes autores verificaram que há pouca diferença no tamanho entre os cromossomos sexuais de *T. infestans*, mas uma notável diferença ocorre em *T. rubrovaria*, que também possui dois pares de autossomos um pouco maiores que o restante do complemento. Já em *R. prolixus,* puderam estabelecer uma mudança na relação de tamanho dos cromossomos sexuais, ou seja, o cromossomo X maior, é similar aos autossomos em tamanho, enquanto o cromossomo Y é o menor elemento do complemento.

Este aspecto da meiose foi posteriormente estudado em quatro espécies de triatomíneos por Azeredo-Oliveira (1990). A autora verificou que nas espécies com cromossomos sexuais compostos, o cromossomo Y era maior e os cromossomos Xs menores. *T. infestans* apresentou o cromossomo Y maior, mas às vezes ele era quase indistinguível do cromossomo X.

Pelo que foi exposto acima, conclui-se que até agora, os cromossomos sexuais têm sido identificados arbitrariamente de acordo com seu tamanho relativo. A identificação dos cromossomos sexuais se torna difícil porque eles são heteropicnóticos e indistinguíveis um do outro através de colorações convencionais.

unesp

Mas, baseados em estudos de machos e fêmeas de três espécies de triatomíneos, Panzera **et alii** (1992) propuseram uma maneira de se identificar os cromossomos sexuais de acordo com seu conteúdo de heterocromatina constitutiva, segundo a qual, o Y é o cromossomo sexual heterocromático.

Usando este novo critério, Perez **et alii** (1992) verificaram que em *R. pictipes* e *R. nasutus*, o cromossomo Y era o menor dos cromossomos sexuais, enquanto que em *R. robustus*, este era o maior. Assim, a nomenclatura usando diferenças de tamanho poderia estar errada neste caso. Observaram também, que *T. pseudomaculata* e *T. matogrossensis* têm um grande cromossomo heterocromático.

Outra característica distinta do processo meiótico dos triatomíneos é que a prófase da primeira divisão meiótica destes insetos não aparece com as subfases características. Ao contrário, os estágios leptóteno, zigóteno e paquíteno, são denominados de "estágio confuso" e a estrutura do núcleo parece ser tipicamente interfásica, sendo visíveis apenas o nucléolo e os cromossomos sexuais heterocromáticos.

Podemos interpretar este estágio como uma fase metabolicamente ativa, onde ainda ocorre transcrição, pois a cromatina está descondensada, semelhantemente às suas características da intérfase.

Neste estágio, a célula e especialmente o núcleo sofrem um crescimento rápido e intenso. Os cromossomos sexuais são vistos associados ou separados e, mais heteropicnóticos, formando um ou dois cromocentros.

Schreiber e Pellegrino (1950) e Barth (1956a) apontaram que os três maiores autossomos participavam da formação do cromocentro em *T. infestans.* Posteriormente, demonstrou-se através do bandamento C, que este cromocentro era formado pelo cromossomo Y, em associação com as bandas C-terminais e subterminais dos três maiores bivalentes autossomos (Solari, 1979).

Num abrangente trabalho sobre a citotaxonomia dos triatomíneos, Ueshima (1966) estabeleceu que a maioria dos gêneros e espécies de triatomíneos mostram uma tendência dos cromossomos sexuais se manterem juntos no "estágio confuso" e, desta associação persistir até a diacinese. Este dado foi confirmado pelo trabalho de De Vaio **et alii** (1985) em três espécies de triatomíneos.

A presença deste cromocentro também foi verificada nas quatro espécies analisadas por Azeredo-Oliveira (1990). Em três delas, *T. vitticeps, T. maculata* e *T. pallidipennis*, pode-se observar que os cromossomos sexuais se uniam para formar um nítido bloco heterocromático no "estágio confuso" da prófase inicial, enquanto que em *T. infestans,* este bloco era formado pelos autossomos A, B, C e pelo cromossomo Y, dado que confirma os achados de Solari (1979). Azeredo-Oliveira (1990) pode observar ainda, uma clara associação entre o bloco heterocromático dos cromossomos sexuais destas espécies e a marcação pelo nitrato de prata.

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

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

Como Solari (1979), Perez **et alii** (1992) e Panzera **et alii** (1995) também analisaram a presença e composição destes cromocentros durante o "estágio confuso" em várias espécies de triatomíneos, utilizando a técnica do bandamento C. Porém, para a manutenção da seqüência já estabelecida aqui, estes resultados serão discutidos posteriormente.

Os resultados obtidos no presente trabalho, através da coloração dos testículos com orceína lacto-acética e com Giemsa, foram semelhantes aos dos autores citados. Pudemos verificar que no "estágio confuso", os cromossomos sexuais de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, uniam-se para formar o cromocentro que caracteriza esta fase, e que, muitas vezes, podia-se visualizar até mesmo a individualização dos cromossomos que compõem este cromocentro.

No diplóteno, esta separação, entre os cromossomos sexuais, torna-se muito mais nítida, tornando difícil a distinção entre a existência de dois cromocentros ou de um cromocentro bipartido.

Em algumas espécies de triatomíneos, outras massas heteropicnóticas aparecem neste estágio. Schreiber e Pellegrino (1950) descreveram estes fatos e classificaram as espécies estudadas como segue:

Grupo A: espécies sem autossomos heteropicnóticos;

Grupo B: espécies com heteropicnose menos evidente;

Grupo C: espécies com heteropicnose bem evidente;

Grupo D: espécies nas quais os autossomos são visíveis durante o "estágio confuso".

O Grupo A é representado por *Rhodnius prolixus*, *Psammolestes coreodes*, *Panstrongylus megistus, Triatoma brasiliensis, T. vitticeps, T. maculata, T. dimidiata* e *T. rubrovaria*, nas quais, durante todo o período de crescimento auxocitário, somente os cromossomos sexuais são claramente heteropicnóticos.

O Grupo B é representado por *T. sordida*, nos quais três massas globulares heteropicnóticas são vistas, geralmente bem isoladas dentro do núcleo, mas, às vezes, aderem-se aos cromossomos sexuais.

O Grupo C , representado por *T. infestans, T. platensis* e *T. nitida* é muito similar sistematicamente e mostram três bivalentes heteropicnóticos no último período do "estágio confuso".

No Grupo D, representado por *T. pallidipennis, P. megistus* e, num grau menor por *R. prolixus*, os cromossomos são menos coráveis e visíveis do que em outras espécies no final do paquíteno.

Pode-se supor que as três massas heteropicnóticas globulares de *T. sordida* sejam homólogas aos cromossomos A, B, C de *T. infestans*, embora nenhuma

diferença em tamanho apareça entre os cromossomos de *T. sordida* na metáfase. Por outro lado, *T. rubrovaria* não tem nenhum autossomo heteropicnótico, apesar de notar-se a presença de dois pares de autossomos que são um pouco maiores, como assinalado por De Vaio **et alii** (1985).

Como mencionado anteriormente, na maioria dos gêneros e espécies de triatomíneos investigados citologicamente, os cromossomos sexuais tendem a ficar juntos no "estágio confuso", sendo que esta associação persiste até a diacinese. Já na metáfase I, os cromossomos sexuais destes insetos, podem apresentar dois tipos de comportamento. O primeiro ocorre quando os cromossomos sexuais permanecem numa posição central, ou seja, os cromossomos sexuais permanecem no centro do anel formado pelos autossomos, como em *Triatoma infestans*, enquanto no outro, uma posição periférica é assumida pelos cromossomos sexuais, que permanecem na periferia da região equatorial do fuso como em *T. protracta*. Ueshima (l966), estabeleceu que, no gênero *Triatoma*, as espécies que têm cromossomos sexuais compostos, mostram o comportamento periférico, enquanto aquelas que têm um mecanismo simples, do tipo XY, apresentam a posição central, embora um caso excepcional seja encontrado em *T. rubrovaria*. Essa diferença no comportamento dos cromossomos sexuais pode indicar relações filogenéticas no gênero *Triatoma*.

No trabalho de Schreiber e Pellegrino (1950) nenhuma menção foi feita a este respeito, mas, revisando as fotomicrografias originais, parece que outras exceções podem ser encontradas. Ueshima (1966) encontrou *T. vitticeps* com $X_1X_2X_3Y$ na posição central e *T. nitida* e *P. megistus*, ambos com X_1X_2Y também centrais. As fotomicrografias de Barth (1956b) de *P. megistus* na metáfase I mostram entretanto, os cromossomos X_1X_2 numa posição periférica. Por causa destes dados, este problema permanece em aberto.

Além desses exemplos, no Homoptera *Auchenorryncha*, Halkka (1959), descreveu os cromossomos Xs como localizados normalmente no centro do anel, na periferia ou, num nível diferente daquele dos autossomos. Das observações de Parshad (1957), parece deduzir-se que a posição dos cromossomos sexuais pode variar; entretanto, em algumas espécies, a posição do X parece ser uma característica regular.

Num extenso trabalho sobre a cariologia dos Pentatomidae e Coreidae (Heteroptera), Marques (1945) observou uma grande variação no comportamento dos cromossomos X e Y na primeira e segunda metáfases. Na maioria dos casos, os cromossomos sexuais estavam situados no centro do anel formado pelos autossomos, mas eles também foram observados numa posição periférica. Em alguns casos, os cromossomos sexuais ficavam junto com os autossomos para formar o anel; quando isto ocorria, um dos autossomos tomava uma posição central.

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

Assim, devido à falta de conhecimento do mecanismo que distribui os cromossomos sexuais para uma posição ou outra, relativos aos autossomos, pode-se supor que a posição dos cromossomos sexuais pode variar não apenas entre as espécies, mas também entre os indivíduos, e os folículos ou os cistos do mesmo indivíduo.

Sabe-se que a orientação dos cromossomos na metáfase I, via de regra, é irregular, porém, notou-se no presente trabalho, uma certa tendência dos dois heterocromossomos colocarem-se no centro de um anel formado pelos autossomos, em todas as espécies analisadas. Deve-se destacar ainda, o fato de que, juntamente com os cromossomos sexuais, um dos bivalentes autossômicos de *Triatoma lecticularia*, tende a tomar uma posição mais central na metáfase I. Do mesmo modo, na metáfase II, o X e o Y ficam no centro do anel formado pelos autossomos, como é típico neste grupo, e passam para polos opostos na anáfase II.

Entretanto, Ueshima (1966), ressaltou que em *Triatoma rubrovaria*, os cromossomos X e Y, usualmente ficam na região periférica do arranjo cromossômico na metáfase I, ao invés da posição central. Contrariamente à este resultado, e de acordo com o encontrado no presente trabalho, De Vaio **et alii** (1985), apresentaram a fotomicrografia de uma metáfase I de *T. rubrovaria*, onde verificou-se a presença de cromossomos sexuais no centro do anel formado pelos autossomos. Apesar destes autores não discutirem o fato, este serve de suporte aos nossos achados, e então, *T. rubrovaria* deixaria de constituir uma exceção quanto à disposição dos cromossomos sexuais na placa metafásica da primeira divisão meiótica, como era considerado até então.

De Vaio **et alii** (1985), também puderam verificar em seu trabalho, que *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, apresentavam os cromossomos sexuais no centro do anel formado pelos autossomos na metáfase I e metáfase II.

Ainda em relação a orientação dos cromossomos sexuais na metáfase I, Azeredo-Oliveira (1990), observou que não há ordenação na disposição dos cromossomos sexuais de *Triatoma vitticeps*, *T. pallidipennis*, *T. infestans* e *T. maculata* na metáfase I, sendo que os cromossomos sexuais apareciam no centro ou na periferia do anel formado pelos autossomos. Entretanto, em *T. maculata*, eles geralmente apareciam na periferia.

A orientação e o número desses cromossomos também podem estar relacionados com a distribuição geográfica destes insetos, desde que todas as espécies Norte Americanas, exceto *T. lecticularia*, têm 20 autossomos mais X_1X_2Y em seu complemento cromossômico diplóide e seus cromossomos sexuais apresentam o mesmo comportamento, colocando-se na periferia do anel formado pelos autossomos. *T. lecticularia*, entretanto, difere das outras espécies Norte Americanas nestes dois aspectos. Por outro lado, todas as espécies Sul Americanas, têm 22 cromossomos (20A + XY no macho), exceto *T. vitticeps* e *T.*

eratyrusiforme, que possuem 24 cromossomos em seu cariótipo, sendo 20 autossomos mais $X_1X_2X_3Y$.

Além disso, os cromossomos sexuais nos triatomíneos possuem um padrão não comum de meiose (John e Lewis, 1965). Este fato foi confirmado pelo trabalho de Solari (1979) com *Triatoma infestans.* Nessa espécie, os cromossomos sexuais, como em outros Heteroptera mostraram um padrão definido de segregação na primeira metáfase meiótica, pois enquanto os autossomos são quiasmáticos e segregam regularmente, os cromossomos X e Y não são quiasmáticos e dividem-se equacionalmente, adiando a segregação à segunda divisão meiótica (Schreiber e Pellegrino, 1950; Barth, 1956a; Ueshima, 1966).

Através do bandamento C em *T. infestans*, foi verificado que o cromossomo Y possui um grande bloco heterocromático, enquanto o X não mostra nenhuma banda C. Foi possível seguir os cromossomos e verificar realmente que os cromossomos sexuais se dividem equacionalmente na primeira anáfase e reducionalmente na anáfase II. Além disso, através de uma técnica especial de microespalhamento dos cromossomos e observação ao microscópio eletrônico (Solari, 1979; Solari e Counce, 1977), determinou-se que os cromossomos sexuais (XY) não possuem sinapses, não formam complexos sinaptonêmicos e conseqüentemente não formam quiasmas. Como resultado, as duas cromátides dos cromossomos X e do cromossomo Y se dividem e vão para polos opostos na anáfase I. O que assegura a segregação (redução na primeira divisão meiótica) é a associação entre os cromossomos. Os quiasmas possuem um papel importante na segregação independente dos cromossomos homólogos durante a prófase I da meiose, pois esses seguram os cromossomos maternos e paternos juntos até a anáfase I, fazendo, em parte, o papel do centrômero durante a mitose. Nos organismos com cromossomos deficientes em quiasmas, como os triatomíneos, não há segregação normal desses cromossomos (Solari, 1979; Alberts **et alii**, 1994).

Solari (1979) concluiu que a perda dos quiasmas, a perda das sinapses e a inexistência do complexo sinaptonêmico, têm somente a aparente função de regular a separação das cromátides irmãs dos cromossomos X e Y na anáfase I.

No presente trabalho, pode-se verificar também, várias vezes e, em todas as espécies, a presença de cromossomos retardatários durante a anáfase.

Azeredo-Oliveira (1990), também encontrou o fenômeno da "cromátide retardatária" nas espécies *Triatoma vitticeps* e *T. maculata*, durante a anáfase e a telófase.

Cromátide retardatária é o fenômeno mais freqüente em meiose, como um mecanismo de eliminação cromossômica geneticamente determinado. Em muitos insetos, as células somáticas têm, caracteristicamente, um número cromossômico menor que o das células da linhagem germinativa. Por exemplo, Koshy (1979c) estabeleceu o cariótipo de 20A + XY para *Triatoma pallidipennis,* enquanto vários

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

outros trabalhos (Schreiber e Pellegrino, 1950; Ueshima, 1966; Azeredo-Oliveira, 1990), mostram que a espécie possui 20A + X_1X_2Y nos machos. Entretanto, Koshy (1979c), estudou tecidos embrionários de machos (XY) e fêmeas (XX), portanto, metáfases mitóticas, enquanto que nos outros trabalhos, foram estudadas metáfases meióticas através do esmagamento dos testículos. Nesse caso, a redução poderia ser devida ao retardo anafásico que, provavelmente, levou à perda de um dos cromossomos X nas metáfases mitóticas.

Igualmente, no ciclo parassexual dos fungos, a passagem do estado diplóide ao haplóide é feita por sucessivas eliminações cromossômicas devidas às cromátides retardatárias. Por outro lado, em tumores malígnos humanos é comum encontrar células com número cromossômico ligeiramente inferior ao diplóide (hipodiplóide). Nesse caso, trata-se provavelmente de um erro no mecanismo de divisão (variação não programada) que resulta igualmente em retardo e eliminação cromossômica (Guerra, 1988).

Já em 1961, o clássico trabalho de Hughes-Schrader e Schrader que confirmou a natureza difusa dos cinetócoros dos Heteroptera, mostrava mitoses espermatogoniais onde a freqüência de "blocos retardatários" e "pontes cromossômicas" era alta, em espécies irradiadas com raios-X.

O trabalho de Schreiber **et alii** (1977), também mostrou anáfases e telófases com pontes cromossômicas em testículos de *Triatoma infestans* expostos à irradiação de bomba de cobalto, com diferentes intensidades. O exame citológico destes testículos revelou dezenove anomalias no processo espermatogenético destes insetos, destacando-se o fenômeno da "migração tardia", formando pontes na anáfase e telófase. Novamente, este fato foi considerado como resultante da irradiação recebida e não como uma condição normal existente na meiose destes insetos.

Assim, não se encontrava na literatura, citações de ocorrência deste fenômeno na meiose normal de triatomíneos. Entretanto, o trabalho de Azeredo-Oliveira (1990), citado anteriormente, que não envolvia qualquer tipo de experimento radioativo, também demonstrou a presença de "cromátides retardatárias" em anáfases e telófases, fato este que pode ser confirmado no presente trabalho, que também não envolveu experimentos radioativos e, mesmo assim, pode constatar a presença deste fenômeno.

Outros autores também relatam a presença de cromossomos retardatários em anáfases de insetos. Em gafanhotos, vários trabalhos demonstraram a condição de retardo cromossômico na anáfase. Por exemplo, em *Dichroplus dubius* (X_1X_2Y) (Mesa e Mesa, 1967), ocorre alta porcentagem de assinapses (não pareamento) entre X_1 e Y e diversos casos de pontes cromatínicas entre esses dois cromossomos foram observados durante a primeira e segunda anáfases. Na primeira divisão, as pontes persistem até a telófase e algumas vezes sua quebra era observada nesse

período. As segundas metáfases diplóides podem ter os cromossomos X_1 e Y conectadas por uma ponte ou sem qualquer conexão. Nas segundas anáfases, foram observadas pontes no núcleo diplóide e, somente em dois casos foram vistas nas segundas anáfases haplóides. Mesa e Mesa (1967) estabeleceram que a presença de pontes anafásicas têm sido descritas em diversas espécies de plantas e animais. Elas podem aparecer espontâneamente ou como uma conseqüência da irradiação ou tratamento químico nos tecidos somáticos ou da linhagem germinativa. Elas são especialmente interessantes porque possuem um significado evolutivo e sua origem pode ser diversa. Algumas vezes aparecem como conseqüência de um "crossing-over" na alça de uma inversão paracêntrica. Outras vezes resultam de um "crossing-over" invertido ou quebra cromossômica com união das cromátides irmãs ou por algum tipo de troca entre metades de cromátides.

Em *Daguerreacris tandiliae* (Orthoptera), o mecanismo de determinação sexual é XO no macho e XX na fêmea (Mesa, 1984). Nesta espécie ocorre um cromossomo supernumerário metacêntrico, que é heterocromático na primeira prófase e, também foi observado um comportamento atípico do cromossomo X durante a metáfase e a anáfase I. Isto é, no lugar de se mover em direção a um dos pólos, o cromossomo permanece na placa equatorial com suas cromátides orientadas de maneira similar à observada na segunda metáfase. O cromossomo S comporta-se similarmente ao X. Quando o X fica na placa metafásica, ele mostra os dois centrômeros filhos puxados em direção a polos opostos, como uma característica orientação anfitélica. As cromátides irmãs não são facilmente separadas durante a primeira anáfase e permanecem paralelas uma a outra na placa equatorial, enquanto os autossomos movem-se aos polos. No final da anáfase, entretanto, as duas cromátides são finalmente separadas, embora ainda conectadas por uma ponte fina de cromatina que pode ser claramente observada até a telófase, com as cromátides irmãs sofrendo um atraso no núcleo filho.

Também na espécie *Anophophilus acuticercus* (Mesa e Goñi, 1987), cromossomos X e supernumerários associam-se formando uma massa cromatínica que permanece na placa equatorial até o início da telófase. No entanto, no último momento, os cromossomos S e X, movem-se rapidamente em direção à uma das células filhas, sendo aparentemente incorporados normalmente no núcleo, ao invés de serem eliminados no citoplasma.

Essas freqüentes divisões equacionais do X e do S na primeira divisão lembram o comportamento dos cromossomos sexuais dos triatomíneos. Pode-se assim, fazer uma relação entre este exemplo e as espécies estudadas no presente trabalho, sugerindo-se que os cromossomos retardatários, observados na anáfase, são cromossomos sexuais. Portanto, essa migração tardia seria conseqüência da divisão equacional dos cromossomos sexuais dos triatomíneos, como sugerido por Azeredo-Oliveira (1990).

unesp

Portanto, sugerimos que, as diferenças do padrão de heterocromatinização e outras diferenças detectadas no comportamento meiótico entre as cinco espécies estudadas, devem constituir parte das diferenças interespecíficas acumuladas no processo evolutivo.

2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

No presente trabalho, a técnica de coloração com nitrato de prata corou os nucléolos fortemente, destacando-os e permitindo uma análise mais detalhada dos mesmos, abrangendo o tamanho e outros aspectos morfológicos.

A observação de que os nucléolos geralmente se associam à regiões cromossômicas, visíveis nos cromossomos metafásicos, como constrições secundárias, fez com que estas passassem a ser conhecidas como regiões organizadoras nucleolares (Hsu **et alii**, 1975; Pardue e Hsu, 1975). Os resultados de hibridização com RNAr confirmaram que as constrições secundárias são realmente os sítios de DNAr, em muitos organismos. Essa confirmação ocorreu, por exemplo, nos cariótipos de *Drosophila* (Schäfer e Kunz, 1975); homem (Henderson **et alii**, 1972; Evans **et alii**, 1974), chimpanzé (Henderson **et alii**, 1974) e em Sciaridae (Crousse **et alii**, 1977).

Entretanto, nem sempre as constrições secundárias observadas nos cromossomos metafásicos constituem organizadores nucleolares inequívocos. Entre os exemplos contidos na literatura, pode-se mencionar o mamífero *Cricetulus griseus* (Hamster chinês), portador de uma única constrição secundária localizada no cromossomo X. Esse mamífero mostrou, em experimentos de hibridização, que seus genes ribossômicos estão localizados nas regiões teloméricas de vários autossomos; a constrição secundária do cromossomo X, porém, apresentou uma marcação tão fraca que os autores admitiram que essa região não constitui um organizador nucleolar (Hsu **et alii**, 1975).

Assim, a simples detecção de constrições secundárias nos cromossomos metafásicos não constitui uma forma segura de localizar os organizadores nucleolares. Já a hibridização "in situ", permitindo situar, nas preparações citológicas os cístrons ribossômicos, é considerado o processo mais seguro para esse fim. Entretanto, essa técnica exige condições que não estão ao alcance de qualquer laboratório, razão pela qual tem havido uma crescente utilização de métodos de coloração específicos para o organizador nucleolar.

Dois métodos de coloração vêm sendo empregados na detecção das regiões organizadoras nucleolares: o método da banda-N (Matsui e Sasaki, 1973; Funaki **et**

alii, 1975) e o da impregnação pela prata (Goodpasture e Bloom, 1975; Howell **et alii**, 1975; Bloom e Goodpasture, 1976).

A técnica da banda N envolve a extração seletiva de DNA, RNA e histonas das preparações citológicas e posterior coloração com Giemsa. Como apenas proteínas não-histônicas permanecem, a coloração específica foi atribuída à atuação do corante sobre proteínas residuais ligadas ao organizador nucleolar (Matsui e Sasaki, 1973).

Entretanto, a especificidade dessa técnica como marcadora das regiões organizadoras nucleolares foi posta em dúvida, tendo sido levantada a possibilidade de que as bandas N correspondem não ao próprio organizador nucleolar, mas à heterocromatina adjacente a ele (Faust e Vogel, 1974).

A técnica de coloração pela prata para regiões organizadoras nucleolares apresenta várias modalidades que receberam nomes diferentes: Ag-SAT (Howell **et alii**, 1975), AG-AS (Goodpasture e Bloom, 1975) e AG-I (Bloom e Goodpasture, 1976). A especificidade da técnica foi demonstrada pela sua aplicação em nove espécies de mamíferos anteriormente submetidos à hibridização "in situ", tendo-se verificado a marcação das mesmas regiões cromossômicas pelas duas técnicas (Goodpasture e Bloom, 1975). Além desse trabalho, vários outros, empregaram a técnica com sucesso (por exemplo Tantravahi **et alii**, 1976; Varley, 1977). Essa técnica foi também aplicada aos cromossomos de outros organismos, como anfíbio (Ruiz **et alii**, 1978) e grilo (Howell, 1977).

O nucléolo, a característica mais proeminente do núcleo interfásico, está envolvido na biogênese de ribossomos (Warner, 1990). Nas células eucarióticas, o núcleolo é o local onde ocorre a transcrição dos genes ribossômicos e onde a maquinaria necessária para a produção das subunidades ribossômicas se encontra (Hadjiolov, 1985). Neste local, os RNAs 18S e 28S, são sintetizados e reunidos com proteínas e com o RNA 5S. Portanto, sua estrutura, tamanho e organização depende da biogênese ribossômica.

Os diferentes passos desta biogênese, ocorrem em domínios nucleolares que podem ser identificados por sua morfologia. Há três domínios nucleolares básicos além da cromatina: os centros fibrilares (CF); o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG). Dentro do nucléolo, os CFs estão, na maioria dos casos, situados na sua região central. Os CFDs formam um conjunto de fibrilas que circundam os CFs, mas também podem chegar até a periferia do nucléolo. Os CGs estão geralmente situado na região periférica do nucléolo. Tradicionalmente, os CFs são considerados os locais de estoque de genes ribossômicos não transcritos; o CFD é o local de transcrição destes genes e o CG é o local de maturação e estoque das unidades ribossômicas (Goessens, 1984; Hernandez-Verdum, 1986). Entretanto, os sítios reais de transcrição são extremamente controversos. Alguns autores acreditam que estes localizam se nos CFs (Scheer e

Benavente, 1990); outros na interface entre o CF e o CFD (Derenzini **et alii**, 1990; Thiry **et alii**, 1991) e outros ainda, somente no CFD (Hartung **et alii**, 1990; Wachtler **et alii**, 1989). Hoje, se considerarmos os resultados obtidos até agora, a interpretação mais razoável é propor que as unidades de transcrição ribossômica sejam compactadas no CFD, como concluído por Jordan (1991).

Apesar dos constituintes do nucléolo poderem variar em quantidade dependendo do tipo de célula e estado fisiológico da mesma, três componentes principais foram isolados das frações nucleolares: DNA (em pequena quantidade); RNA (3 a 15%) e proteínas histônicas, acídicas e enzimas (até 85%). O RNA encontra-se associado às proteínas formando RNP (ribonucleoproteínas). O DNA nucleolar é o DNAr, isto é, o DNA que serve como molde para transcrever RNAr, ou seja, RNA ribossômico (Alberts **et alii**, 1994).

Na maioria das células de plantas e animais, normalmente, um nucléolo está presente em cada genoma (Sybenga, 1972) e mais do que um tem sido relatado somente em poucos casos (Heitz, 1931; Marks, 1957; Fischberg e Wallace, 1960; Levin, 1973; Verma e Raina, 1981; Langer e Koul, 1983; Laksmi e Raghavaiah, 1984).

Quanto ao número de corpúsculos nucleolares, nossos estudos mostraram que os núcleos espermatogoniais em intérfase das cinco espécies de triatomíneos analisadas, apresentam apenas uma marcação nucleolar. Pode-se verificar também, que a massa nucleolar não é homogênea, apresentando um aspecto reticular ou vesiculoso e que o nucléolo presente no núcleo de *Triatoma delpontei*, é bem maior do que o das outras espécies. Esta aparência do nucléolo, às vezes vesiculosa pode corresponder aos vacúolos nucleolares, já observados em diversos organismos e principalmente nos vegetais, ou também, pode ser um artefato de técnica.

Por outro lado, os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares destas espécies, apresentaram várias marcações nucleolares, sem forma específica, distribuídas no interior do núcleo.

Semelhantemente aos resultados observados no presente trabalho, os núcleos espermatogoniais de *Triatoma vitticeps*, *T. pallidipennis* e *T. maculata*, apresentaram uma única marcação nucleolar (Azeredo-Oliveira, 1990) e, nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma infestans* e *T. maculata*, também foi demonstrada a presença de várias marcações nucleolares. Desta forma, a ocorrência de múltiplas marcações nucleolares nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares, parece ser bastante comum nos triatomíneos.

Segundo Maddrell **et alii** (1985), também as ninfas de quarto estádio de *Rhodnius prolixus*, quando não alimentadas, possuem diversos nucléolos evidentes nos núcleos das células dos túbulos de Malpighi. Esses nucléolos desaparecem

próximo ao sexto dia após a alimentação, justamente coincidindo com a replicação do DNA. Nesse período os cromossomos se condensam e ficam visíveis por curto período de tempo. No sétimo dia os cromossomos não são mais evidentes e os nucléolos novamente são visíveis. Os autores justificaram este fato explicando que cada um dos nucléolos visíveis é um agregado de RNA ribossômico e proteínas na forma de precurssores das subunidades ribossômicas e que a produção de RNAr cessa enquanto o DNA replica-se e os cromossomos condensam-se e dividem-se ocorrendo portanto, o desaparecimento do nucléolo. Os ribossomos e os RNAms produzidos no período antes da divisão cromossômica persistem em quantidades suficientes no citoplasma, permitindo à célula manter um funcionamento normal durante a replicação do DNA, condensação cromossômica e conseqüente expansão. Após o período de replicação do DNA, os nucléolos formam-se novamente.

Nos Orthoptera, este tipo de nucléolo múltiplo tem sido observado freqüentemente (Friedlander **et alii**, 1976; Allen e Cave, 1972, Fonzo, 1975). E ainda, nucléolos similares têm sido encontrados nos Blatoidea (Schmidt, 1979), Coleoptera (Dailey e Happ, 1982) e Hemiptera (Dolder e Mello, 1979; Unnithan e Nair, 1977; Norris **et alii**, 1983).

Não há regras gerais sobre uma morfologia nucleolar definitiva, embora seu estado metabólico pareça ser importante nesta observação. No fim do século passado já se sabia da relação entre o tamanho do nucléolo e a atividade sintética da célula. Em células com escassa síntese proteíca, como espermatozóides, blastômeros e células musculares, os nucléolos são pequenos ou ausentes; ao contrário, são volumosos em ovócitos, neurônios e células secretoras, nas quais a síntese proteica é importante. Portanto, o tamanho e número de nucléolos por célula depende do seu estado funcional, e assim, quanto maior a sobrecarga funcional das organelas citoplasmáticas (ou síntese proteica da célula), maior o nucléolo (revisão em Bicudo, 1979). Deste modo, nucléolos proeminentes, contendo um grande volume de grânulos aparecem em células muito ativas, sendo que, conforme a síntese de RNAr diminue, este dá lugar à forma segregada de nucléolos sem grânulos (Busch e Smetana, 1970).

Assim, podemos admitir que o aumento no número de corpúsculos nucleolares presentes nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, esteja, de alguma forma, relacionado com o aumento na síntese de RNAr por estes núcleos,

Além disso, o fato dos núcleos espermatogoniais possuirem apenas um corpúsculo nucleolar, enquanto os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares apresentam várias marcações evidenciadas no núcleo, pode refletir as diferenças funcionais e metabólicas existentes entre ambos,

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

sendo que no caso dos núcleos espermatogoniais, uma exigência metabólica menor, faz com que a presença de um único nucléolo seja suficiente para suprir suas necessidades.

As modificações morfológicas do nucléolo também acompanham o processo de desenvolvimento. Por exemplo, é sabido que a forma e a estrutura do nucléolo diferem em várias linhagens celulares sanguíneas e sofrem alterações durante a diferenciação celular (Busch e Smetana, 1970). Os nucléolos dos eritroblastos, durante sua maturação, mostram também modificações acentuadas em volume e número (Sasaki **et alii**, 1982, 1983).

Sasaki e Kendal (1985) também analisaram, as modificações nucleolares ocorridas nas células hematopoiéticas das ilhas de sangue do saco vitelino do rato, durante o desenvolvimento embrionário, e verificaram que aos sete-oito dias quando começa a hematopoiese naquele tecido, os angioblastos apresentam nucléolos grandes e reticulados, em conexão com a membrana nuclear, através de uma invaginação desta, ou diretamente. Nessas células em proliferação, o nucléolo apresenta o componente fibrilar, estando o granular ausente. No decorrer da eritropoiese o nucléolo mostra duas modificações variáveis em estrutura, em diferentes estágios da maturação eritróide, envolvendo o nucleolonema e as áreas fibrilares. O nucleolonema desaparece para formar o componente granular. Por outro lado, as áreas fibrilares em forma de anel desaparecem em estágios posteriores da maturação, sugerindo que a nucleologênese é inibida nos mesmos. Os eritroblastos maduros apresentam restos do nucléolo nas massas heterocromáticas. As modificações nucleolares são tão características que a estrutura nucleolar pode ser utilizada para reconhecimento dos estágios de diferenciação das células hematopoiéticas do saco vitelino.

As observações do presente trabalho, referentes as cinco espécies de triatomíneos estudadas, através da técnica de esmagamento dos testículos e posterior coloração pelo nitrato de prata, mostraram uma clara associação entre o bloco heterocromático dos cromossomos sexuais destas espécies e a marcação pelo nitrato de prata no "estágio confuso" da prófase I meiótica.

Em células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma infestans*, o nucléolo também acha-se intimamente associado ao corpo heterocromático, às vezes, formando um anel em torno dele (Mello e Dolder, 1978, 1980; Vidal e Mello, 1987). Trabalhando com esta mesma espécie, Mello e Recco-Pimentel (1987), verificaram que através do uso da técnica de banda N (Funaki **et alii**, 1975), os cromocentros praticamente não foram evidenciados e apresentaram um anel de material intensamente corado. Essa observação foi válida para núcleos com um ou diversos cromocentros, sendo que a detecção de um halo positivo de banda N ao redor dos cromocentros, também confirmou a concentração de proteínas não-histônicas específicas associadas aos núcleos.

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

Azeredo-Oliveira (1990), observou um halo claro, ao redor da heterocromatina nas células dos túbulos de Malpighi de *Triatoma vitticeps*, quando coradas com orceína lacto-acética e, essa mesma região fortemente marcada pela prata, o que seguramente lhe indicou que esta estutura era o nucléolo.

A literatura mostra que a heterocromatina constitutiva está freqüentemente associada com cístrons ribossômicos nas RONs dos cromossomos de muitas espécies de eucariotos.

Por exemplo, em *Sciara coprophila*, o organizador nucleolar está localizado na região proximal do cromossomo X formando o nucléolo principal (Gabrusewycz-Garcia, 1972). No final do quarto estágio do desenvolvimento, esse nucléolo se fragmenta e forma um agregado de micronucléolos. A RON aparece bastante ramificada, e os ramos abrangem grande parte da área nuclear. Ao nível da microscopia eletrônica é possível ver material nucleolar em associação com bandas cromossômicas densas e heterocromáticas, as quais poderiam, segundo a autora, constituir organizadores nucleolares secundários.

Também em *Rhynchosciara americana,* Simões **et alii** (1975), observaram que a RON compreende parte da heterocromatina telomérica do cromossomo X.

Em *Drosophila melanogaster* foi demonstrado que um gene na heterocromatina basal do cromossomo X regula os cístrons de DNAr também localizados no X. Esse fato foi descoberto porque as inversões que separam a RON unida ao telômero, levando-a para longe da heterocromatina basal, resultam na supressão do efeito de posição dos cístrons de RNAr (Baker, 1971)

Similarmente, núcleos de células nervosas de aves apresentam grandes cromocentros intimamente ligados à superfície nucleolar (Pessacq, 1969) e células hepáticas de ratos possuem diversos e proeminentes cromocentros relacionados aos nucléolos e à membrana nuclear (Frayssinet **et alii**, 1968).

Associações entre regiões heterocromáticas e RONs foram observadas em muitos outros organismos. Entre eles, 06 espécies de morcegos da família Phyllostomidae (Morielle, 1987), em *Bos indicus* (Mayr e Gruber, 1987), em 14 espécies de anura das subordens Amphicoela, Aglossa, Opisthocela e Anomocela (Schmid, 1982; Schmid **et alii**, 1987), em espécies de anfíbios do gênero *Odontophrynus* (Ruiz **et alii**, 1981; Almeida **et alii**, 1986), em espécies de peixes como *Apteronotus albifions* e *Apareidon piracicaba* (revisão em Toledo e Foresti, 1985) e outras espécies do gênero *Salvelinus* (Phillips e Ihssen, 1985), em roedores (Yonenaga-Yassuda, 1985), na cobra *Philodryas chamissonis* (Moreno **et alii**, 1987) e em tartarugas (Bickham e Rogers, 1985).

Esta associação visualizada citologicamente entre os nucléolos e a heterocromatina, assume uma maior importância nas células germinativas, pois pode levar à ocorrência de falhas nas disjunções, translocações e heteromorfismos, envolvendo as regiões heterocromáticas e de DNAr e portanto, atuam como fator de

unesp

evolução do cariótipo ao longo do processo de especiação (revisão em Morielle, 1987).

A partir de estudos sobre a localização de nucléolos e de RONs em núcleos e cromossomos metafásicos, tornou-se claro que a coloração pela prata não revela todos os locais que contém genes para DNAr. Estudos numa variedade de espécies mostraram que os locais de coloração pela prata nos cromossomos corresponde aos locais de genes ribossômicos identificados pela hibridização "in situ" (Goodpasture e Bloom, 1975; Tantravahi **et alii**, 1976; Warburton e Henderson, 1979; Schubert e Wobus, 1985). Entretanto, em humanos, por exemplo, é muito raro que todos os 10 sítios de DNAr estejam marcados pela prata, embora isto possa ser devido ao fato de alguns sítios conterem poucos genes de DNAr, isto é uma quantidade de genes abaixo da capacidade sensitiva da coloração pela prata. Evidências para a ausência de coloração pela prata, embora genes ribossômicos estejam presentes, vieram a partir de estudos de células somáticas híbridas homem-camundongo, nos quais a transcrição de genes humanos foi suprimida, e portanto, a coloração pela prata estava ausente nos cromossomos humanos (Miller **et alii**, 1976). Foi demonstrado que, os cromossomos humano acrocêntrico que não se coram pela prata nas células híbridas, apresentavam marcação pela prata nas células humanas parentais. O mesmo grupo também obteve evidências de que nas células híbridas, a impregnação pela prata era suprimida nos cromossomos da espécie cujos cromossomos tendiam a ser eliminados seletivamente da célula híbrida.

Muitos estudos sugerem ainda, que a coloração pela prata só cora aquelas RONs que estavam ativas na intérfase precedente. Assim, RONs inativas ou "dormentes" permanecem indetectáveis por este método. Resultados que são independentes do estado de atividade das RONs, somente são alcançados através de estudos de hibridização "in situ" com RNAr marcado.

Todas essas observações indicam que a coloração pela prata de cromossomos humanos é um indicador da atividade dos genes ribossômicos (Hubbell, 1985), e de fato, ela tem sido usada com esta finalidade.

Schwarzacher **et alii** (1978) claramente demonstraram que os locais de coloração pela prata, associados com os cromossomos não estão realmente na cromatina propriamente dita, mas sim ao redor desta. Na intérfase, a coloração pela prata ocorre nos centros fibrilares (Hernandez-Verdun **et alii**, 1980; Fernandez-Gomez **et alii**, 1983), embora a coloração do CFD possa aparentemente ocorrer (Ploton **et alii**, 1984; Fakan e Hernandez-Verdun, 1986). Assim, o material corável pela prata parece estar grandemente na parte transcricionalmente inativa do nucléolo (o CF), e menos regularmente no CFD, o qual parece ser o centro da transcrição. O sítio de impregnação pela prata foi investigado por Angelier **et alii** (1982), que usaram a coloração pela prata em espalhamento de unidades

transcricionais de nucléolos. Nestas preparações, a prata se depositou exclusivamente na parte transcrita do DNAr e não nos espaçadores não-transcritos. Dentro das regiões transcritas, a prata se localizou nos eixos de DNP mais do que nas fibrilas de RNP recém sintetizados. A marcação pela prata não ocorre nas unidades transcricionais não-nucleolares. Estes resultados claramente indicam uma associação entre as proteínas Ag-NOR e a transcrição do DNAr.

Trabalhos anteriores com coloração pela prata indicaram que a substância à que a prata ligava-se era uma proteína não-histônica. Isto parece verdade, apesar de existirem pontos discordantes (Clavaguerra **et alii**, 1983) e do conhecimento de que a prata pode ser usada para corar DNA bem como proteínas em géis de eletroforese (Sommerville e Wang, 1981). Tratamentos que extraem ácidos nucleicos dos cromossomos não têm efeitos na coloração pela prata, enquanto que tratamentos de preparações cromossômicas com proteases previne a coloração pela prata (Howell **et alii**, 1975; Goodpasture e Bloom, 1975; Schwarzacher **et alii**, 1978; Olert **et alii**, 1979; Buys e Osinga, 1980). Tentativas têm sido feitas para identificar e caracterizar essas proteínas nucleolares em gel, que então, são coradas com a prata. Lischwe **et alii** (1979) estudaram duas proteínas nucleolares, denominadas B23 e C23. Ambas coram-se pela prata e têm pesos moleculares de 37 e 100 KDa respectivamente. Anticorpos para estas proteínas foram preparados e usados para determinar os sítios das proteínas em preparações citológicas. A proteína C23 localizou-se no CF do nucléolo em intérfase e nas RONs metafásicas, enquanto a B23 localizou-se perifericamente no nucléolo (Lischwe **et alii**, 1981; Ochs **et alii**, 1983). Ochs e Busch (1984) mostraram que o anticorpo para a C23 poderia bloquear a coloração das RONs e do nucléolo pela prata, enquanto o anticorpo para a B23 não tem efeito na coloração pela prata. Este grupo portanto, acreditou que a C23 era a proteína Ag-NOR. Olson **et alii** (1983) relataram que a C23 parece ter uma preferência pela ligação ao DNA em regiões espaçadoras não transcritas de DNAr (uma observação não consistente com os resultados de Angelier **et alii**, 1982), enquanto Herrera e Olson (1986) encontraram que a C23 parece estar associada com o RNA pré-ribossômico nascente.

Deve ficar claro que, não há, até agora, unanimidade na identidade das proteínas coráveis pela prata. A proteína C23 e proteínas similares são fortes candidatas, mas, ao mesmo tempo, há várias outras possíveis proteínas, que até agora, não têm sido adequadamente caracterizadas. A proteína C23 tem a maioria das propriedades adequadas, exceto que ela parece estar associada com os espaçadores não transcritos, enquanto Angelier **et alii** (1982) encontraram depósitos de prata associados com as unidades transcritas. Aqui novamente, parece haver uma anomalia, desde que a coloração pela prata está associada com os centros fibrilares, transcricionalmente inativos, do nucléolo, regiões que mesmo assim, contém RNA pol I (Scheer e Rose, 1984).

Os grupos químicos responsáveis pela coloração pela prata ainda não foram identificados com certeza. A maioria das proteínas nucleolares consideradas como substrato para a coloração pela prata são fosfoproteínas (Lischwe **et alii**, 1979; Buys e Osinga, 1984; Pfeifle **et alii**, 1986). Esta idéia é suportada pela observação de que a coloração pela prata pode diminuir ou ser abolida pela digestão com fosfatases (Satoh e Busch, 1981; Hubbell, 1985). Inevitavelmente há pontos de vista discordantes. Olert **et alii** (1979) propuseram que a prata liga-se a grupos carboxil e não aos fosfatos. Outra possibilidade é que a coloração pela prata seja devida aos grupos sulfidril das proteínas. RONs certamente, contém alta concentração de proteínas sulfidril e dissulfitos (Buys e Osinga, 1980) e grupos sulfidril são capazes de se ligar à íons pratas e reduzí-los à prata metálica. De Capoa **et alii** (1982) afirmavam ter evidências de que a coloração pela prata era devida diretamente aos grupos sulfidril das proteínas. Entretanto, os resultados de Olert **et alii** (1979), Buys e Osinga (1984) e Hubbell (1985) não suportam o envolvimento de grupos SH na coloração pela prata. Claramente ainda não é possível estabelecer exatamente quais os grupos, de quais proteínas, são responsáveis pela coloração pela prata. Parece bem possível que diferentes grupos químicos nas proteínas Ag-NOR podem influenciar diferentes estágios do processo de coloração pela prata, embora a consistência com a qual a coloração pela prata pode ser obtida, aparentemente, em todos os eucariotos testados indica que um mecanismo comum está envolvido.

Qualquer que seja o mecanismo de coloração pela prata, a coloração das RONs se tornou um dos métodos de coloração padrão e a coloração pela prata é uma parte essencial na caracterização de cariótipos de espécies. Usando estes métodos, as RONs têm sido localizadas num grande número de espécies. O conhecimento da natureza citoquímica das RONs é importante não apenas pelo seu envolvimento na biossíntese de RNA, mas também, porque devido à sua alta atividade transcricional, elas fornecem um sistema adequado para a análise celular e molecular da expressão gênica.

Na literatura referente aos organizadores nucleolares de insetos, predominam informações sobre *Drosophila*, mas, há também dados sobre *Chironomus*, *Sciara*, *Rhynchosciara*, *Acheta*, *Cnephia*, *Bombyx* e outros.

Em *Drosophila*, três padrões básicos caracterizam a localização das RONs: a) RONs restritas aos cromossomos sexuais X e Y; b) RONs restritas ao cromossomo X e ao microcromossomo e c) RONs restritas ao microcromossomo (Bicudo, 1985).

Em *Rhynchosciara*, a hibridização "in situ" mostrou que, além da RON no cromossomo X, há outra no cromossomo C e permanece ainda a possibilidade de haver também DNAr nas regiões centroméricas dos cromossomos A e B (Long e David, 1980).

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

Em *Glyptotendipes barbipes*, Wen **et alii** (1974) verificaram, por hibridização "in situ", três RONs localizadas nos cromossomos IR, IIL e IIIL. Essas RONs formam pufes. RONs que pufam ocorrem também em *Chironomus tepperi*, em número de duas, localizadas nos cromossomos I e IV descritas por Eigenbrod (1978). O mesmo autor verificou por hibridização "in situ", que um estoque dessa espécie, portador de um só nucléolo no cromossomo I, não contém cístrons ribossômicos no cromossomo IV.

Gosálvez **et alii** (1986) analisaram a atividade nucleolar em células da linhagem somática e germinativa de *Arcyptera fusca* através da coloração com nitrato de prata com e sem pré-tratamento das lâminas com 2XSSC. Os resultados mostraram que nas células epiteliais do ovaríolo, quatro fêmeas apresentaram quatro marcações nucleolares na intérfase bem como quatro nucléolos ligados a quatro cromossomos diferentes na prófase. Quando os cromossomos meióticos foram corados pela prata, sem tratamento prévio com 2XSSC, eles mostraram RONs em dois pares de autossomos (M3 e S9), exclusivamente. Após o tratamento com 2XSSC, a visualização destes nucléolos foi bem mais fácil e pode-se encontrar de 20 a 27 micronucléolos ligados a diferentes regiões de vários cromossomos.

As diferenças no tamanho e no número de nucléolos e micronucléolos entre os diferentes tipos celulares analisados e, particularmente, a intensa presença de micronucléolos durante os estágios iniciais da prófase I meiótica sugeriram que seqüências de DNAr extra são diferentemente transcritas de acordo com as funções requeridas por um tecido particular. Embora seja possível que a amplificação do DNAr cause estas diferenças no tamanho do nucléolo observado em diferentes tecidos de *A. fusca*, a ativação de seqüências de DNAr presumivelmente silenciosas, mais do que a amplificação destas seqüências, foi escolhida para explicar os resultados obtidos nos espermatócitos deste gafanhoto. Estes nucléolos aumentados, poderiam estar relacionados com a alta quantidade de ribossomos necessária aos espermatócitos, dado que a síntese de RNAr não é retomada até a fertilização.

Várias técnicas têm sido usadas na tentativa de se localizar as RONs nos cromossomos de *Schistocerca gregaria* e *Locusta migratoria*. Rufas e Gosálvez (1982) relataram a presença de uma RON distal no cromossomo M6 e uma segunda RON no cromossomo S9 da primeira espécie. Os resultados de Fox e Santos (1985) e também os de John e Henderson (1962) e os de Jones, Croft e Wallace (1983, **apud** Fox e Santos, 1985), não concordam com o referido autor. De acordo com este grupo de autores, *S. gregaria* apresenta consistentes RONs intersticiais nos cromossomos L3 e M6. Duas possibilidades podem explicar essa diferença. Primeiro, pode haver um polimorfismo na localização das RONs nesta espécie. Contra esta explicação, existe o fato que Fox e Santos (1985) examinaram animais de três localidades diferentes e não encontraram tal variação. Segundo, Fox e

unesp

Santos (1985) demonstraram que o nucléolo pode se destacar dos bivalentes no diplóteno, formando corpos discretos no nucleoplasma, antes de se dispersarem. Tal destacamento poderia contribuir para a aparente localização de uma RON distal no bivalente M6 e uma RON secundária no bivalente S9, como relatado por Rufas e Gosálvez (1982).

Moens (1973) relatou que os bivalentes L1 e M8 de *Locusta migratoria* no paquíteno têm RONs teloméricas, enquanto o S9 tem uma RON próxima ao centrômero. Em contraste, Fox e Santos (1985), encontraram RONs terminais no L2 e M6 e uma RON proximal ao centrômero no bivalente S9 no diplóteno. Nos dois casos, a identificação de cromossoms longos e médios foi feita somente com base no comprimento e, os cromossomos L1 e L2 mitóticos e meióticos, são similares em comprimento, bem como o M6 e M8. Desde que as RONs encontradas pelos dois autores no grupo L e M são teloméricas, parece que leves diferenças no grau relativo de contração entre o paquíteno e o diplóteno são responsáveis por esta discordância.

Entretanto, a técnica de coloração pela prata, que tem sido muito eficiente para marcar regiões organizadoras nucleolares (RONs) em cromosomos de muitos organismos, não foi propriamente eficiente para marcar essas regiões nos cromossomos metafásicos das cinco espécies de triatomíneos analisadas no presente trabalho. A dificuldade na explicação para a obtenção das marcações pela prata nos cromossomos metafásicos dos triatomíneos, aumenta pelo fato de não se conhecer com certeza o mecanismo dessa coloração, o que já foi anteriormente abordado. Acreditamos também que o pequeno tamanho dos cromossomos e o alto grau de condensação dos mesmos, nesta fase, tenha dificultado o acesso do corante aos componentes cromossômicos específicos. Podemos afirmar, entretanto, que algumas vezes obtivemos marcações em metáfases da divisão celular em *T. brasiliensis* e *T. sordida*. No entanto, essas marcações foram tão ocasionais que, não podem ser consideradas precisas e, inclusive não se pode sugerir que tais marcações estejam presentes nos cromossomos sexuais, como em outras espécies de triatomíneos (Azeredo-Oliveira, 1990). Além disso, não se encontrou nas metáfases espermatogoniais e nas metáfases da 2ª divisão meiótica, marcações semelhantes que pudessem corroborar as marcações acima mencionadas.

A dificuldade na obtenção de marcação com nitrato de prata, em cromossomos metafásicos, ocorreu também no estudo de espécies de *Drosophila* do Complexo Mulleri, em várias tentativas, mesmo utilizando muitas variações da técnica original (Bicudo, 1972, 1982; Nanya, 1986). A técnica aplicada aos cromossomos mitóticos dos gânglios cerebrais, corou apenas a heterocromatina centromérica de todos os cromossomos, o Y e os microcromossomos em algumas células de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis*, e seus híbridos (Nanya, 1986). Essa autora discutiu a dificuldade em se saber por que as RONs das espécies do

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

Complexo Mulleri não se coram com estas técnicas específicas que usam prata, mesmo porque a obtenção da marcação foi mencionada em *D. nasuta*, utilizando tratamento ácido combinado com a coloração Ag-AS (Hägele e Ranganath, 1983). Essa modificação da técnica também foi utilizada no trabalho de Nanya (1986) sem sucesso.

Sabe-se que, a prata somente detecta RONs ativas (Miller **et alii**, 1976). RONs muito pequenas bem como RONs com pouca atividade, não são facilmente detectáveis quando a coloração pela prata é empregada. E ainda, o número de RONs registrado por este método está diretamente relacionado com a atividade das RONs e isto parece depender particularmente dos requerimentos metabólicos das células (Flavell e Martini, 1982).

Rufas **et alii** (1985), relatando a presença de RONs em 21 espécies de gafanhotos, fizeram observações similares, isto é, nem todas as RONs estão ativas numa dada célula. Esta expressão diferencial implica em que, até mesmo no mesmo cisto, os remanescentes nucleolares não estão sempre associados com os mesmos cromossomos. Este heteromorfismo de RON, reflete a ausência de atividade dos genes do RNAr na intérfase precedente, desde que Miller **et alii** (1976) e Schmid **et alii** (1977) postularam que a coloração pela prata da RON representa atividade transcricional prévia dos genes ribossômicos. Entretanto, porque a coloração pela prata é baseada na reação com proteínas mais do que com o DNA (Goodpasture e Bloom, 1975), a ausência da coloração pela prata poderia indicar que os genes para RNAr não estão presentes ou que eles estão inativos. Estudos de células somáticas híbridas (Dev **et alii**, 1977) também forneceram evidências de que nem todas as RONs são ativas e que as RONs inativas não são coradas pelo nitrato de prata.

Yadav e Yadav (1987) empregaram a técnica da prata para localizar as RONs em 6 espécies de gafanhotos. Verificaram que as RONs foram encontradas em apenas algumas das muitas metáfases espermatogoniais examinadas. As RONs ativas estavam localizadas em um dos homólogos ou em uma das cromátides dos homólogos, mostrando heteromorfismo e, as RONs localizavam-se na posição proximal, subproximal ou intersticial. Entretanto, em duas espécies (*Oedaleus abruptus* e *Parahieroghyphus biliniatus*) as RONs localizavam-se em duas posições.

Azeredo-Oliveira (1990), também teve dificuldades para obter marcações em cromossomos metafásicos em quatro espécies de triatomíneos. Entretanto, algumas vezes, esta autora obteve marcações em metáfases da divisão celular em *Triatoma vitticeps* e *T. infestans*. No entanto, apenas na primeira espécie houve alguma evidência de que as marcações estavam presentes nos cromossomos sexuais (X_1 X_2, X_3, Y), heterocromáticos, de metáfases mitóticas e meióticas. Em *T. infestans* os pequenos pontos tenuemente evidenciados que aparecem nos cromossomos não permitiram dizer com segurança que fossem RONs.

Assim, embora diferentes técnicas tenham sido utilizadas e repetidas tentativas da técnica com algumas modificações tenham sido feitas com o objetivo de se obter padrões nítidos de marcação pela prata nas RONs, entendemos que os resultados obtidos não podem ser considerados precisos.

Outro aspecto a ser considerado, é que a marcação com o nitrato de prata, encontra-se bem evidenciada nos núcleos das espermátides. Nas espermátides em fase inicial de desenvolvimento, pode-se verificar que *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei* e *T. rubrovaria*, apresentaram uma ou duas marcações nucleolares; *T. lecticularia* apresentou uma, duas ou três regiões impregnadas pela prata e *T. sordida* mostrou predominantemente, duas regiões destacadas. Por outro lado, apenas uma pequena marcação pode ser evidenciada nas espermátides de *T. brasiliensis*, *T. delpontei* e *T. sordida*, em estágio mais avançado, demonstrando a presença nucleolar.

Estas marcações nas espermátides, são bastante semelhantes às encontradas em outros vertebrados, onde as RONs são detectadas durante toda a prófase meiótica, até o paquíteno, estando completamente ausentes nas metáfases I e II e reaparecendo nos núcleos das espermátides, quando a célula retoma momentaneamente a síntese proteica.

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

Verifica-se, portanto, que os estudos da atividade organizadora nucleolar podem ser também, uma fonte importante de informação sobre os padrões de diferenciação e desenvolvimento das espécies.

unesp

3. BANDAMENTO C E REAÇÃO DE FEULGEN

Em 1928, Heitz demonstrou que alguns segmentos cromossômicos mantinham-se condensados durante todo o ciclo nuclear. Para este autor, isto não indicava apenas uma diferença de coloração ou de condensação, mas refletia a existência de dois tipos de cromatina: a heterocromatina, que se mantinha condensada durante todo o ciclo nuclear e a eucromatina, que apresentava um ciclo de condensação-descondensação paralelo ao ciclo nuclear.

Brown (1966), fez uma revisão do que se conhecia sobre heterocromatina e concluiu haver pelo menos dois tipos distintos, que ele chamou de heterocromatina constitutiva e heterocromatina facultativa.

A heterocromatina facultativa é, por definição, um tipo de cromatina que ora se comporta como heterocromatina (mantém-se condensada durante a intérfase, apresenta replicação tardia e ausência de expressão gênica), ora como uma típica eucromatina. Já a heterocromatina constitutiva, permanece condensada durante todo o ciclo celular e em todas as células do indivíduo.

O trabalho de Lima de Faria (1959 **apud**, Lima de Faria, 1969), demonstrou, pela primeira vez, que a heterocromatina replica seu DNA tardiamente em relação à eucromatina, mas segundo Bianchi (1978), a duplicação tardia é uma propriedade freqüente, porém não constante e nem exclusiva da heterocromatina.

Pode-se observar que a heterocromatina constitutiva geralmente concentra-se em blocos nos cromossomos. Estes distribuem-se preferencialmente nas regiões centroméricas e teloméricas, além das regiões organizadoras nucleolares, sendo também, algumas vezes intercaladas às outras regiões dos cromossomos. Yunis e Yasmineh (1971) sugeriram que a heterocromatina associada às regiões organizadoras de nucléolo, as protegeriam de mutações e permutações que poderiam acarretar alterações nos cístrons 18S e 28S do RNA ribossômico. Além disso, esses blocos heterocromáticos aparecem em ambos os homólogos, na mesma posição e com o mesmo tamanho, sendo utilizados na identificação dos cromossomos.

Uma característica marcante da banda heterocromática é sua ampla variabilidade de tamanho, posição, número, composição de DNA e reação a corantes entre as espécies (John e Miklos, 1979). Outra característica da heterocromatina constitutiva é a ausência de genes estruturais, ou o fato de só muito excepcionalmente terem sido localizado genes neste tipo de heterocromatina (Mello,1978).

Segundo Bostock (1980), a heterocromatina é geralmente considerada inativa na transcrição, mas o fato é que a transcrição é muito menor na heterocromatina do que na eucromatina e, sem considerar cada caso

individualmente, não é possível dizer que a transcrição não ocorre na heterocromatina.

Uma região pode, entretanto, ser inativa por uma de duas razões completamente diferentes:

a) Porque ela está em um estado reprimido, pelo fato de possuir DNA codificador que está temporariamente e reversivelmente inativado, ou,

b) Porque ela é composta de DNA não codificador e assim, permanentemente incapaz de transcrever.

Em relação a estas duas formas completamente diferentes de inatividade, atualmente é possível distinguir três formas de cromatina dentro do núcleo interfásico: eucromatina condensada tecido-específica; eucromatina facultativamente heterocromatinizada e regiões heterocromáticas constitutivas. Seguindo esta nova classificação, as características intrínsecas de cada tipo de cromatina podem ser assim resumidas, de acordo com John, (1988):

A - Eucromatina condensada tecido-específica

No desenvolvimento animal, embora os vários tipos celulares produzidos durante a diferenciação somática contenham as mesmas seqüências de DNA codificador, somente uma parte da informação disponível no genoma é expressa.

Esta transcrição seletiva depende de seções específicas do componente eucromático, e do genoma que tornou-se diferencialmente inativado em tecidos específicos seguido da perda de sua atividade mitótica. Em geral, células embriônicas e permanentemente proliferando, exibem uma estrutura cromatínica difusa, enquanto que uma porção particular da eucromatina se condensa diferencialmente, como parte de um sistema de controle da transcrição tecido-específica. O padrão de eucromatina condensada assim formado é altamente variável, qualitativa e quantitativamente de um tipo celular para outro e dentro de uma dada espécie.

Mesmo assim, é importante reconhecer que nem toda a cromatina dispersa automaticamente adota um estado ativo, portanto não podemos simplesmente igualar a eucromatina com cromatina transcricionalmente ativa. Embora a descondensação seja certamente um pré-requisito para a atividade gênica no caso da eucromatina, ela não é necessariamente suficiente para o início da transcrição.

unesp

B - Eucromatina Facultativamente Heterocromatinizada

Esta é uma forma de caracterizar a repressão da eucromatina na qual segmentos cromossômicos, cromossomos inteiros, ou algumas vezes conjuntos cromossômicos, tornam-se inativados e condensados durante o início do desenvolvimento e por isso, permanentemente inativados durante muitas gerações celulares em todos ou muitos tecidos somáticos.

Está também associada com um processo de "imprinting" cromossômico, no qual, somente um dos homólogos, como no caso de um único X reprimido das fêmeas de mamíferos (XX), ou conjuntos cromossômicos, como no caso do conjunto paterno reprimido em machos de coccídeos (besouros) são afetados, sendo que os homólogos correspondentes nos mesmos núcleos, continuam a codificar ativamente as proteínas. O material que é heterocromatinizado tem um complemento normal de genes e estes podem ser ativados nas gerações precedentes e sucessivas. Tais regiões podem também perder estas características heterocromáticas e, retomar a informação genética durante o processo da heterocromatinização.

C - Regiões Heterocromáticas Constitutivas

Estas são as regiões as quais Heitz originalmente deu o nome de heterocromatina. Elas diferem da eucromatina pela composição predominante de DNA não-codificador e altamente repetitivo. Ela está assim, permanentemente sem transcrever e não só simplesmente reprimida, e assim, representa uma espécie estrutural distinta da cromatina, melhor do que um estado da cromatina como em ambos os casos de eucromatina condensada tecido-específica e eucromatina facultativamente heterocromatinizada.

Existiu um tempo em que se argüia que a heterocromatina diferia da eucromatina em seu comportamento mas não na sua estrutura fundamental. Este tempo é agora passado. A heterocromatina constitutiva é realmente composta de sequências de DNA com características distintas. Além disso, não existem duas classes de heterocromatina, constitutiva e facultativa, como são ainda comumente denominadas. O uso do termo heterocromatina para descrever a eucromatina que é facultativamente inativada é enganoso e desnecessário. A heterocromatinização facultativa da eucromatina, em princípio, tem mais em comum com a condensação tecido-específica da eucromatina, embora ela ocorra em uma escala mais extensiva, temporariamente e especialmente, dentro de um indivíduo, e é usualmente restrita a somente um sexo (John, 1988).

unesp

Assim, a heterocromatina constitutiva se caracteriza, como já dito anteriormente, por ser o local onde se situa, se não todo, a maior parte do DNA satélite, embora esta não seja formada exclusivamente por DNA satélite.

Os experimentos de Pardue e Gall (1970) sobre hibridização "in situ", mostraram que o DNA satélite estava localizado no centrômero dos cromossomos que se coravam fortemente com Giemsa. Este e resultados similares, conduziram à hipótese de que a banda C pode ser considerada como consistindo de DNA satélite, ou pelo menos, alguma forma de DNA altamente repetitivo. Enquanto isto parece verdadeiro para rato e outros organismos, em certas espécies, não se mostrou ainda, a existência de qualquer tipo de DNA repetitivo nas regiões heterocromáticas. Conclui-se então, que nem todo DNA da heterocromatina constitutiva é satélite ou altamente repetitivo, como também nem todo DNA repetitivo se localiza na heterocromatina constitutiva. Assim, embora o DNA satélite esteja nela localizado, os termos DNA repetitivo e heterocromatina constitutiva não devem ser considerados como equivalentes (Mello, 1978).

Em 1971, Arrighi e Hsu aperfeiçoaram esta técnica de banda C desenvolvida por Pardue e Gall (1970) e esta passou a ser amplamente empregada no estudo de distintas espécies de animais e vegetais e, desde que cada espécie apresenta um padrão de bandamento característico, o emprego desta técnica contribui para uma melhor caracterização cariotípica das mesmas.

Até há alguns anos, todas as variações citogenéticas observadas em populações naturais de organismos, eram consideradas resultantes de rearranjos cromossômicos que podiam ser subdivididos em duas classes: Robertsonianos (fusão e fissão cêntrica) e não Robertsonianos (inversões e translocações) (Patton e Sherwood, 1982). O primeiro opera sobre o número diplóide, sem uma mudança concomitante no número fundamental, enquanto o último atua com efeito oposto. Foi Arrighi e Hsu (1971), estudando a distribuição da heterocromatina constitutiva em diferentes espécies de mamíferos e posteriormente Pathak **et alii** (1973), estudando o papel da heterocromatina na evolução cariotípica de *Peromyscus* (Rodentia), que concluiram que, ao lado dos rearranjos que atuam sobre o material genético existente, outros mecanismos podem estar operando e assim, um cromossomo pode ter seu número de braços alterado através de adição ou deleção de heterocromatina.

Portanto, uma mudança no número fundamental de um cariótipo, que normalmente é atribuída às translocações recíprocas desiguais e inversões pericêntricas, pode também ser devida a adição ou deleção de heterocromatina (Arrighi e Hsu, 1971). Conseqüentemente, esse mecanismo pode ser bastante importante para a diversificação de vários grupos de animais e plantas.

Por outro lado, a heterocromatina constitutiva também pode exercer significante papel na divergência evolutiva de um grupo de espécies relacionadas,

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

sem que se observe uma variação acentuada nos diferentes cariótipos deste grupo. É o caso observado por Sen e Sharma (1983) no complexo *Mus* , onde mudanças na quantidade e principalmente na qualidade da heterocromatina parecem ter sido o fator mais importante na diversificação cariotípica desse taxon.

Entretanto, o papel funcional da heterocromatina na evolução cariotípica para qualquer organismo, permanece um enigma.

Yunis e Yasmineh (1971) sugeriram que a heterocromatina tem funções estruturais vitais, tais como: proteção de regiões especializadas do genoma, tais como centrômeros e telômeros, de forças disruptivas externas; atração dos cromossomos homólogos para o alinhamento inicial na meiose e o estabelecimento de "barreiras de fertilidade", que fornecem meios para a diversidade evolutiva e a especiação.

Apesar de existirem várias explicações para sua origem e funções, há poucas evidências a favor de uma hipótese em particular (para revisão veja John e Miklos, 1979). Por exemplo, Patton e Sherwood (1982), analisando a distribuição de bandas-C em algumas espécies do gênero *Thomomys*, verificaram que nenhuma das funções sugeridas para a heterocromatina, como sumarizadas por John e Miklos (1979), são facilmente aplicáveis à este grupo. Eles também enfatizaram que as grandes diferenças na quantidade de banda-C positiva por si só no genoma, não interferem na fertilidade normal e no desenvolvimento destes insetos. Assim, não existem dados sugestivos de que a diferença na heterocromatina sirva como uma barreira de fertilidade, como sugerido originalmente por Yunis e Yasmineh (1971).

Outras evidências sugerem que a função da heterocromatina deve ser restrita principalmente à linhagem germinativa e não às células somáticas. A função que está melhor estabelecida na linhagem das células germinativas, é seu efeito na formação de quiasmas na meiose. Crossing-over raramente ocorre na heterocromatina (John, 1976), mas talvez, o fato de que blocos heterocromáticos afetem a formação de quiasmas nos segmentos eucromáticos adjacentes nos cromossomos, é de grande significado. Em *Atractomorpha* (gafanhoto) a freqüência de quiasmas está correlacionada com a quantidade de heterocromatina: quanto maior a quantidade de heterocromatina, menor o número de quiasmas (Miklos e Nankivell, 1976). Não apenas a freqüência de quiasmas é alterada, mas também sua posição, desde que a heterocromatina telomérica em particular, causa uma redução substancial na formação de quiasmas na eucromatina adjacente. O efeito das bandas-C ou da heterocromatina na recombinação meiótica á assim, a característica mais claramente estabelecida deste material.

Heitz (1933), propôs o conceito da distribuição equilocal da heterocromatina. Este conceito se baseia no fato de que em vários cariótipos de plantas, bem como de animais, a heterocromatina de cromossomos não homólogos tende a se localizar em regiões similares, com considerável regularidade.

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

Em organismos com cromossomos holocêntricos, os estudos de banda C fornecem evidências de que em geral, apenas uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva está localizada preferencialmente na região telomérica dos cromossomos.

Papeschi (1988) aplicou a banda C em *Belostoma elegans*, *B. micantulum* e *B. oxyurum*, verificando sempre, uma localização telomérica destas. Posteriormente, este mesmo autor analisou o complemento cromossômico de *Belostoma bifoveolatum*, *B. dentatum* e *B. martini*, também através do bandamento C (Papeschi, 1991). Novamente, as três espécies apresentaram uma distribuição equilocal das bandas C nas regiões teloméricas.

O conceito de equilocalidade também se aplica aos triatomíneos. Vários autores aplicaram a técnica da banda C em *Triatoma infestans* (Solari, 1979; Mello e Recco-Pimentel, 1987; Solari e Agopian, 1987; Azeredo-Oliveira, 1990; Panzera **et alii**, 1992, 1995), verificando que, nesta espécie, os blocos heterocromáticos são vistos nos três maiores pares de autossomos, em uma ou ambas as extremidades dos cromossomos. Já o cromossomos Y é totalmente ou parcialmente heteropicnótico, enquanto o cromossomo X é C-negativo.

Posteriormente, Panzera **et alii** (1995), comparando o padrão de distribuição de bandas-C de *Triatoma platensis* e *T. delpontei* ao de *T. infestans*, verificaram que *T. platensis* apresenta três ou quatro pares de autossomos com blocos heterocromáticos terminais localizados em um ou em ambos os telômeros; o cromossomo Y é totalmente heteropicnótico e o X apresenta uma região C-positiva e outra C-negativa. Já em *T. delpontei*, pode-se verificar que todos os autossomos e o cromossomo X sempre apresentavam uma região heteropicnótica em apenas uma extremidade, enquanto o Y era totalmente C-positivo.

No presente trabalho, pode-se verificar marcações heterocromáticas nas regiões teloméricas de alguns cromossomos da espécie *Triatoma delpontei* e, *T. lecticularia*, sendo que estas marcações, eram menos evidentes nesta última. Já em *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, não se verificou a presença de tais marcações, quer em metáfases I ou metáfases II. Fato semelhante foi observado por Perez **et alii** (1992) em cinco espécies de triatomíneos. Destas, *Rhodnius pictipes*, *R. robustus* e *T. matogrossensis*, não apresentaram blocos heterocromáticos nos autossomos, sendo que em *R. nasutus* e *T. pseudomaculata*, vários autossomos apresentaram pontos de heterocromatina constitutiva terminais.

A condensação cromatínica pode ser a responsável pela dificuldade de se detectar bandas C nos cromossomos metafásicos de animais com cromossomos holocêntricos. Por exemplo, os blocos teloméricos e intersticiais de heterocromatina visíveis durante a prófase meiótica de *Labidura truncata* não são mais encontrados na metáfase meiótica (Giles e Webb, 1972). Similarmente, Munisch (1973) relatou a presença de heterocromatina intersticial e telomérica através da prófase meiótica de

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

Oncopeltus fasciatus; entretanto, estas bandas C não eram detectáveis nos cromossomos metafásicos fortemente corados.

De acordo com Panzera **et alii** (1995), das quatorze espécies de triatomíneos até agora estudadas com a técnica do bandamento C, somente três, *Triatoma infestans*, *T. platensis* e *T. delpontei*, apresentavam blocos heterocromáticos em vários pares de autossomos. A partir do presente trabalho entretanto, podemos ampliar esta lista, com os dados da espécies *T. lecticularia*, que apesar de não serem totalmente conclusivos, sugerem a presença de blocos heterocromáticos em vários cromossomos.

Verifica-se portanto, que em todas as espécies de triatomíneos que apresentam blocos heterocromáticos destacados, a heterocromatina tende a localizar-se em locais similares nas extremidades dos cromossomos homólogos e não-homólogos, seguindo a distribuição equilocal de Heitz (1933) e que, esta distribuição está de acordo com aquela observada em outros insetos com cromossomos holocêntricos (Camacho **et alii**, 1985; Papeschi, 1988; Dey e Wandgi, 1990).

Este conceito de equilocalidade das bandas C em um complemento, "leva a aceitação de que deve existir um mecanismo ou mecanismos, que induzem a formação ou distribuição das bandas C para locais específicos dentro de um genoma" (John **et alii**, 1985). Entretanto, King e John (1980) sugeriram que ainda podem existir regiões, ou cromossomos inteiros, que retém independência estrutural, como é o caso de alguns cromossomos megaméricos e supranumerários nos gafanhotos.

Dentro do gênero *Belostoma,* certas exceções ao conceito de equilocalidade podem ser encontradas. Primeiro, o cromossomo Y é completamente C-negativo em *B. bifoveolatum*, *B. dentetum* e *B. elegans*, ou C-positivo em *B. martini*, *B. micentulum* e *B. oxyurum*, mas nunca mostra as bandas teloméricas dos autossomos e dos cromossomos Xs. Por outro lado, o menor bivalente de *B. martini* e *B. bifoveolatum* mostra poucas ou nenhuma banda C telomérica, respectivamente. Finalmente, o padrão de bandamento de *B. martini* é particularmente diferente, desde que existem bivalentes que tem bandas nos dois telômeros, em apenas um, ou são completamente C-negativos.

Em contraste, a banda C em *Luzula* (Ray e Venketesvaran, 1978), revelou numerosas e pequenas bandas C distribuídas ao longo dos cromossomos profásicos, as quais se fundiam em bandas maiores, conforme a cromatina se condensava. De acordo com estes autores, a diferença no padrão de bandamento poderia estar relacionada com a natureza do centrômero em *Luzula* (policêntrico, Bokhari e Godward, 1980) e nos Heteroptera (holocêntrico, Comings e Okada, 1972). O único exemplo em insetos holocêntricos onde bandas intersticiais estão presentes é *Nezara viridula* (Camacho **et alii**, 1985), onde a RON mostrou banda C

positiva. Nesta espécie, as bandas intersticiais são C-positivas, enquanto as teloméricas são levemente marcadas.

Em *Luzula flaccida*, Collet e Westerman (1984) verificaram regiões C-positivas no núcleo interfásico, enquanto blocos heterocromáticos foram encontrados nas metáfases. A distribuição da banda C, pode ser considerada similar à de *L. purpurea* e *L. multiflora* (Ray e Venketesvaran, 1978). Em contraste aos cromossomos metafásicos, as bandas C dos cromossomos profásicos revelaram múltiplas regiões C-positivas ao longo dos cromossomos, mas a sobreposição e a condensação diferencial tornou difícil a identificação de cromossomos individuais. Estas bandas C profásicas entretanto, parecem se fundir durante a condensação e originam as bandas C vistas nas metáfases.

Uma das características mais marcantes do sistema meiótico dos triatomíneos, é a existência de associações heteropicnóticas durante a prófase. A maioria das espécies que não apresentam bandas C nos cromossomos autossômicos, apresentam este cromocentro constituído apenas pela associação dos cromossomos sexuais. Entretanto, nas espécies que apresentam blocos heterocromáticos nos cromossomos, um número variável de autossomos participam da formação deste. Este número é espécie-específico e depende do número de pares de autossomos que possuem bandas C (Panzera **et alii,** 1995).

A formação do cromocentro leva à uma proximidade espacial dos pares de autossomos que possuem blocos heterocromáticos durante a prófase meiótica e mitótica. Esta associação heteróloga, poderia facilitar a troca de heterocromatina constitutiva entre cromossomos homólogos e não-homólogos, como sugerido para cromossomos com centrômero localizado por Schweizer e Loidl (1987). Em *Triatoma infestans*, por exemplo, como um resultado da proximidade dos três maiores pares de autossomos, a heterocromatina constitutiva poderia ser transferida de um cromossomo para outro, ou para sítios próximos do mesmo cromossomo. Esta característica e a localização preferencialmente telomérica deste material em outras espécies de Heteroptera, faz com que a idéia de Schweizer e Loidl também possa ser aplicada aos cromossomos holocêntricos, como admitido por Panzera **et alii** (1992, 1995).

A constituição destes cromocentros, foi uma das sete características usadas por Perez **et alii** (1992) para o diagnóstico de espécies de triatomíneos. Neste estudo, verificou-se que o cromocentro das espécies *Rhodnius pictipes*, *R. nasutus*, *R. robustus* e *Triatoma matogrossensis* era constituído apenas pelos cromossomos sexuais, ao passo que em *T. pseudomaculata*, havia um cromossomo autossomo que se associava aos cromossomos sexuais para formar este cromocentro, sendo portanto responsável pela diversidade encontrada na configuração (tamanho, aspecto) e número de cromocentros meióticos nestas cinco espécies.

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

Em outras três espécies de triatomíneos, *Triatoma infestans*, *T. platensis* e *T. delpontei*, os cromocentros meióticos e mitóticos também eram formados pela associação dos cromossomos sexuais a um número variável de bandas C dos autossomos (Solari, 1979; Panzera **et alii**, 1992).

No presente estudo, pode-se verificar nos núcleos da prófase I meiótica, no "estágio confuso", a presença de um único cromocentro, que provavelmente é constituído apenas pelos cromossomos sexuais heterocromáticos nas espécies *Triatoma brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, sendo que na espécie *T. delpontei*, o único cromocentro presente, o qual destaca-se pelo seu tamanho, pode ter se originado pela fusão das regiões heterocromáticas de todos os autossomos, com os cromossomos sexuais, como já mencionado por Panzera **et alii** (1992). No diplóteno, também pode-se observar a presença dos cromossomos sexuais destacados, formando dois corpúsculos densos nas espécies *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. lecticularia*.

Outra característica observada no presente trabalho, foi que os núcleos espermatogoniais em intérfase, de todas as espécies analisadas, apresentaram apenas um cromocentro destacado, sendo que na espécie *T. delpontei*, também nesta fase, este cromocentro era bem maior. Semelhantemente, os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de todas as espécies, apresentaram apenas um cromocentro após o bandamento C, exceto *T. delpontei*, onde pode-se verificar a presença de múltiplos cromocentros, de diferentes tamanhos, distribuídos no interior do núcleo.

Todos os dados obtidos no presente trabalho, através do bandamento C, foram também reforçados, a partir da análise de lâminas submetidas à reação de Feulgen.

Como já mencionado, a técnica da reação de Feulgen foi aplicada somente com o objetivo de se confirmar os dados obtidos através de outras colorações, não se pretendendo realizar um estudo de mensuração do conteúdo de DNA através de métodos citofotométricos. Deste modo, pode-se verificar uma correlação entre os dados obtidos através da coloração com orceína lacto-acética, Giemsa, bandaC e reação de Feulgen.

Quanto à reação de Feulgen, deve-se destacar ainda a presença de quatro cromossomos mais heteropicnóticos nas metáfases II de *Triatoma rubrovaria*. Este achado merece ser analisado com atenção, pois além de não se encontrar na literatura dados que corroborem-no, não se verificou tal heteropicnose em lâminas submetidas às outras colorações. Contrariamente, Schreiber e Pellegrino (1950) que propuseram uma classificação para as espécies de triatomíneos, baseada na presença de massas heteropicnóticas durante o "estágio confuso" da prófase I, relataram que *T. rubrovaria* pertenceria ao Grupo A, juntamente com *Rhodnius prolixus*, *Psammolestes coreodes*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *T.*

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

vitticeps, *T. maculata* e *T. dimidiata*, por apresentar somente os cromossomos sexuais heteropicnóticos durante todo o período de crescimento auxocitário. Adicionalmente, Panzera **et alii** (1995), não verificaram qualquer indicação da presença de bandas C nesta espécie, dado que também foi verificado no presente trabalho.

A falta de concordância entre estes achados, no entanto, não os invalida, mas, ao contrário, torna claro que outras análises, envolvendo inclusive a análise citofotométrica desta e de outras espécies de triatomíneos, devem ser realizadas, a fim de que se chegue a uma conclusão definitiva.

4. RELAÇÕES EVOLUTIVAS ENTRE OS TRIATOMÍNEOS

O gênero *Triatoma* é o maior gênero da família Triatomidae. As cinco espécies de triatomíneos analisadas no presente trabalho, apresentam um cariótipo homogêneo, constituído por 22 cromossomos, sendo 20 autossomos mais dois cromossomos sexuais. Este é também, o número cromossômico mais freqüente na subfamília Triatominae.

Ueshima (1966) estabeleceu que "no mecanismo dos cromossomos sexuais, os triatomíneos parecem ser uniformes na maioria dos gêneros, mas no gênero *Triatoma*, ele é complexo. Neste gênero, três mecanismos sexuais se formam: XY; X_1X_2Y e $X_1X_2X_3Y$. Geralmente não há dúvidas de que os cromossomos sexuais compostos são de origem mais recente do que o sistema XY (Schrader, 1947; White, 1954).

Infelizmente, o processo de evolução cromossômica nos Heteroptera não é tão fácil de se analisar. Não apenas os cromossomos são muito pequenos, mas em adição a este fato, eles estão altamente condensados na mitose e na meiose, de modo que é impossível determinar as posições das ligações das fibras do fuso.

Na evolução dos mecanismos dos cromossomos sexuais, o papel da fragmentação foi enfatizado por Troedson (1944), que sugeriu que a fragmentação é a principal causa dos cromossomos sexuais compostos nos Heteroptera, baseando seus estudos em *Gelastocoris* . Segundo White (1954, 1957), é provável que os mecanismos dos cromossomos sexuais múltiplos tenham surgido através de três processos evolutivos diferentes: (1) fusões cêntricas entre um cromossomo sexual pré-existente e um autossomo, (2) translocações recíprocas entre um cromossomo sexual metacêntrico e um autossomo e (3) dissociação dos cromossomos sexuais pré-existentes. O trabalho de Hughes-Schrader e Schrader (1961) também apoiou a idéia de que a simples fragmentação estava envolvida na evolução dos cromossomos sexuais compostos.

A hipótese da fragmentação realmente parece ser a mais provável neste grupo, porque os múltiplos Xs podem ser relacionados com uma diminuição no número de autossomos em apenas duas espécies (*Triatoma nitida e Panstrongylus megistus*). Outras espécies têm múltiplos Xs com 10 autossomos, enquanto uma espécie tem 11 (*Triatoma rubrofasciata*). Os Xs múltiplos parecem portanto serem independentes da variabilidade dos autossomos.

Assim, fica claro que o mecanismo "múltiplo" nos Reduviidae é fundamentalmente diferente em natureza daquele encontrado nos Orthoptera, que é o resultado de translocações mútuas entre o X e um autossomo. O tipo de mecanismo "múltiplo" dos Reduviidae poderia provavelmente não existir numa espécie onde os cromossomos sexuais formassem quiasmas no sexo heterogamético. Se ele existisse, $X_1X_2X_3$... sendo homólogos pelos menos em parte, poderiam se parear e formar quiasmas, de modo que esses cromossomos poderiam ir para polos opostos na primeira divisão meiótica.

Além disso, nos Heteroptera, embora o quiasma se forme entre os autossomos, ele não se forma entre os cromossomos X e Y, que nunca segregam regularmente para polos opostos (usualmente isto ocorre na segunda divisão nos Heteroptera, ao invés da primeira, como em outros organismos).

Que os cromossomos dos Heteroptera e Homoptera possuem cinetócoro difuso, já foi estabelecido, e, estudos sobre o comportamento destes cromossomos durante a mitose e meiose (Schrader, 1935) bem como as análises experimentais de Hughes-Schrader e Ris, 1941 e Ris (1942) não permitem outras conclusões.

Assim, em espécies com cinetócoro difuso, o processo da fragmentação é simples e direcionado e, estas espécies podem originar cromossomos compostos muito mais freqüentemente.

A presença de um cinetócoro difuso poderia então, estar relacionada com uma maior variação na estrutura e no número cromossômico e, a variedade no comportamento cromossômico de algumas famílias, por exemplo, na Coccidae, justificaria este fato. Mas, nem todas as famílias de Heteroptera ou Homoptera apresentam tal variabilidade cromossômica e, em algumas como a Corixidae, as condições cromossômicas são muito uniformes e não há cromossomos sexuais compostos. Tal conservadorismo implica em algum fator presente para contra-agir com a potencialidade de variação que é inerente ao cinetócoro difuso. Uma possível explicação pode ser pensada na variação no grau de heteropicnose, pois algumas evidências sugerem que um cromossomo ou região cromossômica heteropicnótica é mais facilmente quebrada que uma região eucromática. Isto também pode contribuir para uma fragmentação mais freqüente dos cromossomos sexuais do que dos autossomos, pois deve ser lembrado que na maioria destas espécies, os cromossomos sexuais são persistentemente heteropicnóticos por toda a prófase meiótica no macho.

Entretanto, o fator controlador mais importante para o estabelecimento dos cromossomos sexuais compostos surge na hora da divisão reducional no macho. Qualquer fragmento ou supranumerário pode ir para qualquer polo e os cromossomos compostos se alteram rapidamente por perdas. Mas, como se sabe, nos casos já estabelecidos, todos os componentes do X ou do Y vão juntos para um pólo, embora não sejam visíveis pontes ou interconexões entre eles para explicar tal unanimidade de ação. Certamente algum mecanismo deve dirigir este movimento unificado dos fragmentos cromossômicos na redução do macho. Este mecanismo não deve estar baseado em interações com o cromossomo Y, como sugerido em anos anteriores, porque os componentes do X em espécies como *Syromastes* e *Matsucoccus* regularmente apresentam tal movimento na ausência do Y. Quando o mecanismo está ausente ou é imperfeito, como parece ocorrer nos supranumerários de *Cimex* (Slack, 1939, Darlington, 1939), as conseqüências são irregularidades de distribuição. Isto significa que até mesmo em espécies com cinetócoro difuso, uma simples fragmentação não é suficiente para estabelecer um cromossomo sexual composto. Deve haver em adição, algum mecanismo para dirigir sua segregação na meiose (Schrader, 1947).

Consideremos também, a ocorrência dos cromossomos sexuais compostos em outros animais. Na ordem Araneida, todas as 13 espécies investigadas (White, 1940), apresentam um cromossomo X composto. Ele sempre existe como um X de dois componentes, cujo comportamento meiótico é bem uniforme. Desde que se trata de representantes de 11 famílias diferentes de aranhas, nós estamos obviamente trabalhando não apenas com um mecanismo cromossômico sexual de ocorrência geral na ordem, mas também, com um mecanismo de grande estabilidade.

Outro exemplo é encontrado na família Mantidae, onde pelo menos 6 espécies apresentam a condição X_1X_2Y. Isto indica que, em tais casos, o mecanismo de cromossomos sexuais compostos surgiram numa forma ancestral e tem sido transmitido com pequenas ou nenhuma alteração para as novas espécies que surgiram a partir das originais.

Porém, os Heteroptera-Homoptera, são bem contrastantes, pois toda esta uniformidade está faltando. Cromossomos sexuais compostos podem ser de ocorrência comum em uma família e raros ou ausentes em famílias próximas. Assim, eles são encontrados nos Mesoviliidae e nos Reduviidae e, ausentes nos Nabidae e Corixidae. Nos Reduviidae, espécies com um mecanismo XY comum, existem lado a lado com espécies que apresentam dois, três, quatro ou cinco Xs compostos. E ainda, há muita variação entre as diferentes espécies de Heteroptera com respeito a formação detalhada e comportamento de tais cromossomos sexuais. Em resumo, as evidências sugerem que, muitas destas formas de cromossomos sexuais compostos são de origem recente e provavelmente ainda estão num estado de fluxo evolutivo.

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

Apesar do pequeno número de casos de cromossomos sexuais compostos entre os Homoptera, eles constituem juntamente com os Heteroptera, um grupo no qual tais cromossomos são encontrados com excepcional freqüência. Mas, esta alta incidência não é tão significativa como é a grande variação na sua forma e manifestação, bem como o fato das espécies que mostram extrema modificação na configuração dos cromossomos sexuais poderem existir lado a lado com espécies que mostram a configuração XY ortodoxa. São nestes aspectos que uma explicação para a diferença na evolução entre os Heteroptera e o Araneida devem ser pensadas.

Entretanto, uma classificação dos mecanismos múltiplos somente de acordo com o número de X ou Y presentes é superficial, porque não nos dá informação sobre a origem evolutiva dos diferentes tipos. Assim, uma análise detalhada e, se possível, uma comparação cuidadosa com espécies XY ou X0 relacionadas é necessário em cada caso (White, 1940).

Ainda em relação aos cromossomos sexuais, foi sugerido que uma fragmentação ocorreu no gênero *Triatoma* no curso da evolução entre as espécies da América do Norte e do Sul, de modo que, todas as espécies Norte Americanas de *Triatoma*, exceto *T. lecticularia,* são X_1X_2Y e, as espécies Sul Americanas podem ser XY ou $X_1X_2X_3Y$.

Além disto, pode-se observar dois tipos de comportamento cromossômico na metáfase I dos Triatominae. No gênero *Triatoma*, as espécies que tem cromossomos sexuais compostos apresentam um arranjo periférico, enquanto aquelas com um mecanismo XY apresentam uma posição central. Essas diferenças no comportamento dos cromossomos sexuais podem indicar relações filogenéticas no gênero *Triatoma*.

No presente trabalho, analisaram-se cinco espécies de triatomíneos, sendo que apenas uma delas era Norte Americana. Coincidentemente, esta espécie Norte Americana era *T. lecticularia* e, conseqüentemente, ela apresentou um sistema sexual simples (XY) e, seus cromossomos sexuais localizavam-se no centro do anel formado pelos autossomos na metáfase I e na metáfase II. Percebe-se então, que *T. lecticularia* difere das outras espécies Norte Americanas no complemento cromossômico e no comportamento dos cromossomos sexuais.

Outra observação interessante, diz respeito à espécie *T. rubrovaria*. Esta espécie era considerada também, uma exceção em relação as outras espécies Sul Americanas, por não apresentar os cromossomos sexuais localizados no centro do anel formado pelos autossomos na metáfase I, apesar de possuir apenas dois cromossomos sexuais (XY). No entanto, neste trabalho, pode-se observar uma localização central destes cromossomos na metáfase I, de modo que, esta espécie deixa de constituir uma exceção, como vinha sendo postulado até então. Desta forma, percebe-se claramente que a presença de cromossomos sexuais múltiplos

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

pode estar correlacionada com a distribuição geográfica destes insetos e que eles exercem certa influência na configuração das placas metafásicas, com a única exceção a este respeito, sendo a espécie *T. lecticularia*.

Por outro lado, o conteúdo de DNA do núcleo, tem sido usado por muitos autores como uma ferramenta para pesquisas citotaxonômicas. Entre eles, Schrader (1953) estudou o conteúdo de DNA do gênero *Liturgosa* (Orthoptera), tendo encontrado diferenças no conteúdo de DNA das espécies sem variação no número cromossômico. Em 1956, Hughes-Schrader e Schrader verificaram o mesmo fato nos Pentatomidae.

A diferença no conteúdo de DNA sem diferenças no número cromossômico foi explicada por Schrader como resultante da endomitose, justamente como ocorre em muitas espécies de plantas e animais. Se a endomitose ocorre nas células germinativas, este caráter pode se estabilizar como uma característica da espécie. O tamanho dos cromossomos está geralmente relacionado com seu conteúdo de DNA, mas em alguns casos, este fato não é tão óbvio.

Através de medidas citofotométricas, Schreiber **et alii** (1972), determinaram o conteúdo de DNA nas espermátides e espermatogonias em sete espécies de triatomíneos. Foi possível dividir as espécies em três grupos de acordo com seu conteúdo de DNA. O valor mais baixo foi encontrado em *Rhodnius prolixus*. O segundo grupo foi formado por *Triatoma platensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *P. herreri*. O conteúdo de DNA deste grupo é quase o dobro do anterior. O terceiro grupo foi constituído por *T. infestans* e *T. vitticeps*, e apresentou o triplo de DNA do primeiro grupo.

O baixo valor de DNA do gênero *Rhodnius*, comparado com o dos outros gêneros, é consistente com sua posição evolutiva que, dentro da árvore filogenética dada por Usinger (1944) está situada num nível mais baixo do que o gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* (Fig. 50). Assim, parece provável que uma duplicação de DNA ocorreu na evolução entre os Rhodini e os Triatomini.

Como uma correlação, pode-se admitir que os Triatominae se comportam exatamente como os Pentatomidae e que sua especiação provavelmente está relacionada à endomitose diferencial de todo ou de parte de seu genoma.

Tem sido postulado também, que a quantidade de heterocromatina e o tamanho do genoma são características adaptativas, principalmente porque suas conseqüências fenotípicas produzem diferenças entre os indivíduos e as populações (Schweizer e Loidl, 1987). A variação quantitativa da heterocromatina e do conteúdo de DNA nuclear entre muitas espécies, populações e indivíduos (revisão em Kurnit, 1978), pode ser explicada pela origem de DNA suplementar, não-codificador.

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

Tal cromatina freqüentemente, mas não sempre, corresponde ao DNA satélite altamente repetitivo e, a técnica de banda C, parece ser seletivamente aplicável à um tipo de DNA com algum grau de repetição.

Apesar do pequeno tamanho dos cromossomos, as bandas C nos triatomíneos, quando presentes, localizam-se principalmente na região telomérica. Em algumas espécies, entretanto, a heterocromatina constitutiva não foi observada, mas esta situação não é única, desde que, a ausência de bandas C também foi mencionada em algumas espécies de animais (Hsu **et alii**, 1975). Isto sugere que, qualquer que seja a função deste material, somente quantidades mínimas podem ser necessárias para desempenhá-la.

Além da observação da pequena quantidade de heterocromatina em algumas espécies de triatomíneos, grandes quantidades de material heterocromático tem sido verificadas em outras espécies, como por exemplo, *Triatoma infestans* (Solari, 1979; Azeredo-Oliveira, 1990; Panzera **et alii**, 1992), *T. platensis* (Panzera **et alii**, 1995) e *T. delpontei* (Panzera **et alii**, 1995). Tais quantidades de heterocromatina, podem ter surgido considerando-se que elas teriam uma função específica numa região cromossômica particular de uma dada espécie.

Os dados existentes na literatura sobre *Triatoma infestans* e *T. platensis*, mostram bandas C em três ou quatro pares de autossomos, além de marcações nos cromossomos sexuais, mas estas espécies não foram estudadas neste projeto.

No presente trabalho, *Triatoma delpontei* mostrou uma proliferação do cromocentro formado na prófase I da meiose, sendo que este, nos núcleos espermatogoniais em intérfase, chamou a atenção devido ao seu tamanho, independentemente da coloração empregada. Caracteristicamente, os núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares desta espécie, mostraram várias marcações heterocromáticas. Adicionalmente, nos cromossomos metafásicos, *T. delpontei* mostrou bandas C nas extremidades de alguns cromossomos e, de acordo com Panzera **et alii** (1995), estas marcações estariam presentes nos telômeros de todos os autossomos.

Ainda neste trabalho, algumas marcações heterocromáticas nos telômeros de alguns cromossomos de *T. lecticularia* também puderam ser verificadas, indicando que esta espécie também tem uma quantidade diferente de heterocromatina. Por outro lado, *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, não apresentaram tais marcações. Assim, maiores informações sobre estas e outras espécies de triatomíneos, poderiam contribuir para nosso conhecimento sobre o papel funcional da heterocromatina neste, e em outros grupos de organismos.

Talvez estas espécies atingiram um equilíbrio entre o seu cariótipo, sua fisiologia e o ambiente em que elas vivem, o que poderia agir seletivamente contra algumas mudanças causadas pela adição de heterocromatina.

Diferenças na quantidade de DNA satélite, que são aparentes com a técnica de banda C empregada no presente trabalho, não estão bem relacionadas com o grau de separação das espécies. Para se obter maiores informações sobre as relações filogenéticas, através do conteúdo de heterocromatina destas espécies, seria necessário comparar a quantidade e o conteúdo de bases de DNA contidas em cada banda C.

Panzera **et alii** (1995) realizaram um estudo sobre a evolução cariotípica dos cromossomos holocêntricos de três espécies de triatomíneos, empregando justamente a técnica de banda C e de mensuração do conteúdo de DNA. Neste trabalho, verificou-se que *Triatoma infestans*, que possui três ou quatro pares de autossomos com bandas C, mostra um conteúdo de DNA (1C) de 1,03 ± 0,13 pg, dos quais 23,7 a 29,6% era constituído por heterocromatina constitutiva. Já *T. platensis*, que também possui três ou quatro pares de autossomos com bandas C, apresenta um conteúdo de DNA de 0,87 ± 0,12 pg, dos quais 12,2% é heterocromatina constitutiva. *T. delpontei*, também analisada no presente trabalho, apresentou, de acordo com este autor, dez pares de autossomos com bandas C, do que deriva um conteúdo de DNA de 1,80 ± 0,17 pg, sendo que 44,8% deste total é constituído por heterocromatina constitutiva. No outro extremo, somente a título de comparação, tem-se *T. rubrovaria*, que não apresenta banda C em nenhum autossomo, não tendo portanto heterocromatina constitutiva. O conteúdo de DNA desta espécies é de 0,54 ± 0,08 pg.

Verifica-se então, que quando um trabalho deste tipo é realizado, fica mais fácil e seguro estabelecer as relações filogenéticas existentes entre as espécies de determinado grupo. Ainda no trabalho de Panzera **et alii** (1995), é possível verificar que as três espécies estudadas têm quantidades similares de DNA nuclear, com leves diferenças, facilmente explicáveis pela perda ou ganho de heterocromatina constitutiva, embora outros processos possam estar envolvidos. Este processo de perda ou ganho de heterocromatina constitutiva pode ser facilitado pela proximidade cromossômica no cromocentro, durante a prófase meiótica e mitótica, como já mencionado anteriormente.

Percebe-se deste modo, que as três espécies, *Triatoma infestans*, *T. platensis* e *T. delpontei* constituem um grupo de espécies intimamente relacionadas, sendo que através de seus estudos, Panzera **et alii** (1995) puderam estabelecer que *T. infestans* e *T. platensis* são espécies mais relacionadas uma a outra do que com *T. delpontei*.

Apesar disto, a existência de polimorfismos de bandas C em populações naturais de *T. infestans* (Panzera **et alii**, 1992), bem como a existência de indivíduos híbridos férteis entre *T. infestans* e *T. platensis* (Abalos, 1948), que tem diferentes quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva, não afetam o processo meiótico normal. Portanto, embora as mudanças na quantidade e

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

distribuição de heterocromatina constitutiva representem uma das causas de diferenciação cariotípica entre as espécies de triatomíneos, elas não parecem ter um papel direto no processo de especiação.

A endomitose, por sua vez, tem sido proposta como o principal mecanismo que opera na evolução cariotípica dos Triatomini (Schreiber **et alli**, 1972). O presente trabalho sugere entretanto, que variações paralelas e independentes na heterocromatina constitutiva também agem na produção dos cariótipos das espécies e nas suas características biológicas.

unesp

V - RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho, pretendeu-se basicamente: 1) traçar um perfil das principais características do ciclo meiótico de cinco espécies do gênero *Triatoma*, 2) ampliar os conhecimentos relativos à atividade organizadora nucleolar de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, através do estudo das células dos túbulos testiculares, 3) detectar a localização da heterocromatina constitutiva, bem como as possíveis diferenciações cromossômicas entre as cinco espécies, através do bandamento C e 4) analisar os principais eventos responsáveis pela evolução deste grupo de espécies.

Os resultados obtidos foram fundamentalmente, os apresentados a seguir:

1. O complemento cromossômico e o ciclo meiótico de cinco espécies de triatomíneos foram investigados. Os dados citogenéticos sugerem um cariótipo composto por 22 cromossomos (20A + XY) em todas as espécies analisadas, o que está de acordo com o número modal da subfamília Triatominae.

2. No gênero *Triatoma*, encontram-se três mecanismos de cromossomos sexuais - XY; X_1X_2Y e $X_1X_2X_3Y$, todos eles relacionados com a distribuição geográfica destes insetos, de modo que, todas as espécies Norte Americanas são X_1X_2Y, exceto *Triatoma lecticularia* e, as espécies Sul Americanas podem ser XY ou $X_1X_2X_3Y$. Como no presente trabalho, foram analisadas quatro espécies Sul Americanas (*T. brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*) e apenas uma espécie Norte Americana (*T. lecticularia*), que por acaso, constitui a exceção acima citada, verificou-se a presença de apenas dois cromossomos sexuais (XY), em todas as placas metafásicas analisadas. Deve-se destacar também, que a fragmentação é o principal mecanismo sugerido para a evolução dos cromossomos sexuais compostos.

3. Nos Triatominae, dois tipos de comportamento podem ser encontrados nos cromossomos sexuais na metáfase I. Primeiro, os cromossomos sexuais localizam-se no centro de um anel formado pelos autossomos; isto ocorre em espécies com sistema sexual simples, XY. Segundo, os cromossomos sexuais localizam-se na região periférica do anel formado pelos autossomos, nas espécies com cromossomos sexuais compostos. Como todas as espécies analisadas no presente trabalho apresentavam apenas dois cromossomos sexuais (XY), a localização destes na placa metafásica da primeira divisão meiótica, foi preferencialmente, no centro do anel formado pelos autossomos.

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

4. A análise dos fenótipos nucleares das cinco espécies estudadas no presente trabalho, revelou a presença de um único corpúsculo heterocromático nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *T. brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, enquanto *T. delpontei*, apresentou várias marcações heterocromáticas distribuídas pela cromatina. Este achado pode estar ligado à diferenciação evolutiva desta espécie. O significado dessa diferença é difícil deduzir a partir das observações realizadas, mas, pode-se admitir que *T. delpontei,* que apresenta grandes blocos heterocromáticos, possa conter uma baixa taxa de atividade cromatínica ou que esses grandes blocos exerceriam efeitos protetores sobre as regiões eucromáticas adjacentes, suprimindo a recombinação e promovendo a manutenção de um conjunto de genes particularmente bem adaptados. Já nos núcleos espermatogoniais em intérfase, apenas uma marcação heterocromática (cromocentro) estava presente em cada espécie. Também no "estágio confuso" e no diplóteno, pode-se verificar a presença constante de um cromocentro, o qual é formado pela união dos cromossomos sexuais, mais destacado que os demais cromossomos do complemento.

5. A análise do ciclo meiótico destas espécies, destacou também, a presença de cromossomos retardatários nas fases iniciais da anáfase. Admite-se que tal mecanismo seja o responsável pela redução no número cromossômico observada nas células somáticas de alguns organismos, quando comparadas com as células da linhagem germinativa. Foi sugerido que estes cromossomos retardatários sejam cromossomos sexuais.

6. As técnicas de coloração pela prata, utilizadas em muitos organismos para marcar RONs ativa, mais uma vez, não foram eficientes nos cromossomos meióticos dos triatomíneos. Esta dificuldade em se obter marcações nas RONs destes insetos, deve-se, provavelmente, ao pequeno tamanho de seus cromossomos e também, ao alto grau de compactação dos mesmos na metáfase. Com essas técnicas, conseguiu-se entretanto, verificar que os núcleos poliplóides das células nutritivas apresentaram várias marcações nucleolares, enquanto os núcleos espermatogoniais por sua vez, apresentaram apenas um nucléolo. Esta diferença observada entre os núcleos poliplóides e os núcleos espermatogoniais pode ser o resultado da atividade metabólica diferencial existente entre estes dois tipos celulares. Assim, podemos admitir que o aumento no número de corpúsculos nucleolares presentes nos núcleos poliplóides das células nutritivas da parede dos túbulos testiculares de *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, esteja, de alguma forma, relacionado com o aumento na síntese de RNAr por estes núcleos.

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

7. A técnica de coloração pela prata, também evidenciou a presença de marcações nucleolares no "estágio confuso" da prófase I meiótica e nas espermátides. Nas espermátides, a presença de tais marcações, pode estar relacionada com a retomada da síntese proteica neste estágio inicial da espermiogênese. .

8. Analisando-se as metáfases com padrões de banda C, verificou-se que a heterocromatina constitutiva apresentou uma distribuição variável, dependendo da espécie, com relação à sua presença ou não, na região telomérica dos cromossomos, o que conseqüentemente, determina um conteúdo específico de heterocromatina constitutiva para cada espécie. Com relação ao conteúdo heterocromático, é possível distinguir as espécies do gênero *Triatoma* em três grupos distintos: (a) espécies com blocos heterocromáticos em todos os pares de autossomos; (b) espécies com blocos heterocromáticos em alguns pares de autossomos e (c) espécies com ausência de blocos heterocromáticos nos autossomos.

9. Através dos dados obtidos no presente estudo, e da revisão efetuada na literatura, admite-se que a endomitose, juntamente com a variação na quantidade de heterocromatina, são os principais fatores atuantes na evolução das espécies da subfamilia Triatominae.

VI - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The fundamental aims of the present study were (1) to delineate the main characteristics of the meiotic cycle of five species of the genus *Triatoma*, (2) to enlarge knowledge about the nucleolar organizer regions in *Triatoma brasiliensis*, *T. delpontei, T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*., by means of the study of the testis tubule cells, (3) to detect the position of constitutive heterochromatin, as well as possible chromosomic differentiations among the five cited species, through C-banding and, (4) to analyse the main events in the evolution in this group of species.

The results were basically the following:

1. The chromosome complement and meiotic cycle of five species of Triatominae were investigated. The cytogenetic data suggest a karyotype with 22 chromosomes (20A + XY) in the five species analysed, which is in agreement with the modal number of the subfamily.

2. In *Triatoma* three sex chromosome mechanisms - XY, X_1X_2Y and $X_1X_2X_3Y$ - are found, and these are correlated with geographical distribution. All North american species, except *Triatoma lecticularia*, have 20A + X_1X_2Y and all South American species have 20A + XY ou 20A + $X_1X_2X_3Y$ in the diploid complement. Although we studied four South American and one North American species, the presence of only two sex chromosomes was verified on the metaphase plates analysed. Fragmentation is suggested as the evolutionary mechanism of the compound sex chromosomes.

3. Two types of behaviour are found in sex chromosomes at first metaphase in the Triatominae. First, sex chromosomes lie in the center of a ring formed by the autosomes, such as *Triatoma* with XY mechanism. Second, sex chromosomes lie in the periferal region of the ring, such as *Triatoma* with compound mechanism. As all the species analysed here showed only two sex chromosomes, their position at first metaphase was preferentially in the center of the ring formed by the autosomes.

4. Nuclear phenotypes of the five species analysed in the present study revealed a single heterochomatic body in polyploid nuclei of nutritive cells of testicular tubules of *Triatoma brasiliensis*, *T. lecticularia*, *T. rubrovaria* e *T. sordida*, while *T. delpontei* showed several heterochromatic blocks dispersed throughout the chromatin. This finding may be connected with the evolutionary differentiation of this species. The means of this difference is unknown, but one can suggest that *T. delpontei*, which posseses high quantities of heterochromatin, may have a low chromatinic activity rate or that the heterochromatic blocks have protecting effects

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

through adjacent euchromatic regions, supressing recombination and promoting the maintenance of a particular set of well adapted genes.

5. The meiotic cycle of these species also revealed the presence of "late chromosomes" at early anaphase. This may be the causative mechanism of reduction in chromosome number observed in the somatic cells of some organisms, as compared with meiotic cells. It is suggested that these "late chromosomes" could be sex chromosomes.

6. Ag staining techniques used in several organisms for detecting active RONs once again were not effective in meiotic chromosomes of *Triatoma* species. This difficulty may be due to the small length of the chromosomes as well as their high level of condensation at metaphase. Polyploid nuclei, nevertheless, showed several nucleolar blocks and the spermatogonial nuclei showed a single nucleolus. This difference indicates differential metabolic activity between these two cell types. Then, we can admit that the increase in the number of nucleolar bodies present in the poliploid nuclei is somehow connected with the increase in rRNA synthesis by these nuclei.

7. Ag staining techniques also made evident nucleolar blocks in the "confused stage" of meiotic prophase and in spermatids. The presence of such blocks in the spermatids may be acquainted with protein synthesis at the initial stages of spermiogenesis.

8. Constitutive heterochromatin showed variable distribution, depending on species, in relation to its position at the telomeric regions of the chromosomes. This determines a specific content of C-heterochromatin in each species. According to heterochromatic content, it is possible to separate *Triatoma* species in three distinct groups: (a) species with heterochromatic blocks in all the autosome pairs; (b) species with heterochromatic blocks in some autosome pairs and (c) species with no heterochromatic blocks in autosomes.

9. Through data obtained in the present study and the revision literature, it is reasonable to suppose that endomitosis, as well as variation in heterochromatin content, are the major factors acting in the evolution of Triatominae.

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

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, J. Sobre hibridos naturales y experimentales de *Triatoma*. **Rev. Inst. Med. Reg.**, 2: 209-223, 1948.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. New York, Garland Publishing, Inc. 3ª Ed, 1994. 1294 pp.

ALLEN, E.; CAVE, M. Nucleolar organization in oocytes of grillid crickets: subfamilies Gryllinae and Nemobiinae. **J. Morphol.**, 137: 433-448, 1972.

ALMEIDA, M.B.T.; RUIZ, I.R.G.; BEÇAK, W. Ribosomal gene activity detected by silver staining in two diploid populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from Southern Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, IX(3): 433-437, 1986.

AMATO NETO, V. Transmissão por transfusão de sangue. Congresso Internacional sobre a doença de Chagas. RJ. **Anais**. Fundação Osw. Cruz, p. H 20 - H 23, 1979.

ANGELIER, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; BOUTEILLE, M. Vizualization of Ag-NOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecular spreads. **Chromosoma**, 86: 661-672,1982.

ARRIGHI, F.E.; HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. **Cytogenetics**, 10: 81-86, 1971.

AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). São José do Rio Preto,1990. 250 p. Tese de Doutorado, IBILCE/UNESP.

BAKER, W.K. Evidence for position-effect supression of the ribosomal RNA cistrons in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 68: 2472-2476, 1971.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). V parte: Anatomia do testículo e espermiocitogênese do *Triatoma infestans*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 54 (1): 135-184, 1956a.

BARTH, R. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). VI parte: Estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 54 (3): 599-620, 1956b.

BIANCHI, N.O. **Duplicacion cromossomica y heterocromatina a nível molecular y citológico**. Organizacion de los Estados Americanos, 1978. 93pp.

BICKHAM, J.W.; ROGERS, D.S. Structure and variation of the nucleolus region in turtles. **Genetica**, 67: 171-184, 1985.

BICUDO, H.E.M.C. Cytological observations of salivary chromosomes of *Drosophila parasaltans* (Saltans group). **Cytologia**, 37: 549-553, 1972.

BICUDO, H.E.M.C. Estudo citogenético de espécies de *Drosophila* do complexo mulleri (grupo repleta), com ênfase à regulação da atividade organizadora nucleolar. Tese de Livre-Docência, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, 209 p., 1979.

BICUDO, H.E.M.C. Regulação da atividade organizadora nucleolar em *Drosophila*. **Ciênc. e Cult.**,34 (4): 465-469,1982.

BICUDO, H.E.M.C. Organizadores de nucléolos em insetos. **Ciênc. e Cult.**, 37 (3): 430-439, 1985.

BLOOM, S. E.; GOODPASTURE, C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. **Human Genetics**, 34:199-206,1976.

BOKHARI, F.S.; GODWARD, M.B.E. The ultrastructure of the diffuse kinetochore in *Luzula nivea*. **Chromosoma**, 79: 125-136, 1980.

BOSTOCK, C.J. The organization of DNA sequences in chromosomes. In: L. Goldstein; D.M. Prescott eds. **Cell Biology.** New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 1-59.

BRINKLEY, B.R.; VALDIVIA, M.M.; TOUSSON, A.; BALCZON, R.D. The kinetochore: structure and molecular organization. In: Hyams, J.S. & Brinkley, B.R. **Mitoses: Molecules and Mechanisms**. Copyright, Academic Press Limited, 1989. cap.03, p. 77-118.

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

BROWN, S.W. Heterochromatin. **Science**, 151: 417-425, 1966.

BUSCH, H.; SMETANA, K. **The nucleolus**. Academic Press, New York and London, 1970.

BUXTON, P.A. The biology of a blood-sucking bug *R. prolixus*. **Trans. Ent. Soc**., 78 (2): 227-236, 1930.

BUYS, C. H. C. M.; OSINGA, J. Abundance of proteins-bound sulphydryl and disulphide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. **Chromosoma,** 77:1-11, l980.

BUYS, C. H. C. M.; OSINGA, J. Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. A combined biochemical and cytochemical study on staining of NORs. **Chromosoma**, 89: 387-396, 1984.

CAMACHO, J.P.M.; BELDA, J.; CABRERO, J. Meiotic behaviour of the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. **Can. J. Genet. Cytol.**, 27: 490-497, 1985.

CAMARGO, M.E.; SILVA, C.R.D.; CASTILHO, E.A.D.; SILVEIRA, A.C. Inquérito sorológico de prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975-1980. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** 26: 179-236, 1984.

CLAVAGUERA, A.; QUEROL, E.; COLL, D.; GENESCA, J.; EGOZCUE, J. Cytochemical studies on the nature of NOR (nucleolus organizer region) silver stainability. **Cell. and Molec. Biol.**, 29: 255-259, 1983.

COLLET, C.; WESTERMAN, M. Interspread distribution patterns of C-banding and satelllite DNA in the holocentric chromosomes of *Luzula flaccida* (Juncaceae). **Genetica**, 63: 175-179, 1984.

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

COOPER, R.S. Experimental demonstration of holokinetic chromosomes and of differential "radiosensitivity" during oogenesis, in the grass mite, *Siteroptes graminum* (Reuter). **J. Exp. Zool.**, 182: 69-94, 1972.

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

COSTA LIMA, A. **Insectos do Brasil**. Rio de Janeiro. Tomo II, 351p. 1940.

CROUSE, W. V.; GERBI, S. A.; LIANG, C. M.; MAGNUS, L.; MERCER, I. M. Localization of ribossomal DNA within the proximal X- heterochromatin of *Sciara coprophila* (Diptera, Sciaridae). **Chromosoma,** 64: 305-318, 1977.

DAILEY, J.P.; HAPP, G.M. Morphology of the acdeagal gland of the male mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.). **J. Morphol**., 171: 259-281, 1982.

DARLINGTON, C.D. The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. V. *Cimex* and Heteroptera. **J. Genet.**, 39: 101-138, 1939.

DEANE, M.P. Ocorrência do *Trypanosoma conorrhini* em "barbeiros" e em ratos na cidade de Belém, Pará, e seu cultivo em meio de N.N.N. **Rev. do SESP**., 1 (2): 103-110, 1947.

DE CAPOA, A.; FERRARO, M.; LAVIA, P.; PELLICCIA, F.; FINAZZI-AGRO, A. Silver staining of the nucleolus organizer regions (NOR) requires clusters of sulphydryl groups. **J. Histochem. Cytochem.**, 30: 908-911, I982.

DERENZINI, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleus. **J. Histochem. Cytochem**., 38: 1237-1256, 1990.

DEV, V.G.; TANTRAVAHI, R.; MILLER, O.J. Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line. **Genetics**, 86: 389-398, 1977.

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

DEY, S.K.; WANDGI, T. Banding patterns of the holocentric chromosomes in some species of Heteroptera. **Cytologia**, 55: 181-186, 1990.

DIAS, E. Notas sobre o tempo de evolução de algumas espécies de triatomíneos em laboratório. **Rev. Brasil. Biol**., 15 (2): 157-158, 1955.

DIAS, J.C.P. Rural resource development and its potencial to introduce domestic vectors into new epidemiological situation. **Rev. Argentina de Microbiol.**, 20 (supl.): 81-85, 1988.

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

DIOTAIUTI, L. Importância atual e perspectivas de controle de *Triatoma sordida* em Minas Gerais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

DOLDER, H.; MELLO, M. L. S. Ultrastructure of the Malpighian tubule cells of *Panstrongylus megistus* Burmeister. **J. Submicr. Cytol.**,11(3): 385-394, 1979.

DUJARDIN, J.P.; TIBAYRENC, M.; VENEGAS, E.; MALDONADO, L.; DESJEUX, P.; AYALA, F. J. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. **J. Med. Entomol**, 24(1): 40-45, 1987.

EIGENBROD, J. Differences in the number of nucleolus organizers in *Chironomus tepperi* shown by "in situ" hybridization. **Chromosoma**, 67: 63-66, 1978.

ESPINOLA, R.; SCHREIBER, G. Duas gerações de um mutante cromático em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae). **Ciênc. Cult.**, 11: 129, 1959.

EVANS, H.J.; BUCKLAND, R.A.; PARDUE, M.L. Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. **Chromosoma** (Berl), 48: 405-426, 1974.

FAKAN, S.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Biology of the Cell**, 56: 189-206, 1986.

FAUST, J.; VOGEL, W. Are N- bands selective staining of specific heterochromatin? **Nature**, 249: 352-353,1974.

FERNANDEZ-GOMEZ, M.E.; SANCHEZ-PINA, M.A.; RISUENO, M.C.; MEDINA, F.J. Differential staining of the nucleolar organizer region (NOR) and nucleolar components by a new silver technique in plants. **Cell Mol. Biol.**, 29: 181-187, 1983.

FISHBERG, M.; WALLACE, H. A mutation which reduces nucleolar number in *Xenopus laevis*. In: J.S. Mitchell eds. **The Cell Nucleus.** London: Butterworths, 1960. p. 30-34.

FLAWELL, R.B.; MARTINI, G. Three genetic control of nucleolus formation with special reference to common bread wheat. In: Jordan, E.G. & Cullis, C.A. **The nucleolus**. Cambridge University Press. 1982.

FONZO, S. Nucleolar evolution in spermatids of *Oedipoda coerulescens*. **Cariologia**, 28: 125-131, 1975.

FOX, D. P.; SANTOS, J. L. N-bands and nucleolus expression in *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. **Heredity**, 54: 333-341,1985.

FRAYSSINET, C.; LAFARGE, C.; SIMARD, R. Incorporation de thymidine tritieé dans le DNA de foie de rat. **Exp. Cell Res**., 49: 40-50, 1968.

FRIEDLÄNDER, M.; GERSHON, J.; REINHARTZ, A. A typical cycle of the nucleolus in spermatocytes of the insect *Locusta migratoria*. **Cytobiol**., 13: 171-181, 1976.

FUNAKI, K.; MATSUI, S. I.; SASAKI, M. Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. **Chromosoma**, 49: 357-370,1975.

GABRUSEWYCZ-GARCIA, N. Further studies of the nucleolar material in salivary gland nuclei of *Sciara coprophila*. **Chromosoma** (Berl), 38: 237-254, 1972.

GILES, E.T.; WEBB, G.C. The systematics and karyotype of *Labidura truncata* Kirby, 1903 (Dermaptera: Labiduridae). **J. Aust. Ent. Soc**., 11: 253-256, 1972.

GOESSENS, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol**., 87:107-158, 1984.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, 53: 37-50,1975.

GOSÁLVEZ, J.; LA TORRE, J.; LA VEGA, G.; LOPES-FERNANDEZ, C. The effect of double strenght standard saline citrate on silver staining. I. Nucleoli and micronucleoli in the somatic and germ line of the grasshopper *Arcyptera fusca* (Orthoptera). **Canadian J. Gen. and Cytol.**, 28(2): 219-226, 1986.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**.. Editora Guanabara. RJ. 1988, 142p.

HADJIOLOV, A.A. **The nucleolus and ribosome biogenesis**. Springer. Berlin Heidelberg. New York, 1985.

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

HÄGELE, K.; RANGANATH, H. A. The chromosomes of two *Drosophila* races: *D. nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicans*. III. Localization of nucleolar organizer regions. **Genetica**, 60: 123-128, 1983.

HALKKA, O. Studies on the mitotic and meiotic cell division in certain Hemiptera under normal and experimental conditions. **Ann. Acad. Sci. Fenn.**, 32: 5-80, 1956.

HALKKA, O. Chromosome studies on the Hemiptera Homoptera *Auchenorryncha*. **Ann. Acad. Sci. Fenn.**, 43: 1-74, 1959.

HARTUNG, M.; WACHTLER, F.; LANVERSIN, A.; FOUET, C.; SCHWARZACHER, H.G,; STAHL, A. Sequential changes in the nucleoli of human spermatogonia with special reference to rDNA location and transcription. **Tissue Cell**, 22: 25-27, 1990.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. I. **Jahrb. Wissensch Bot.**, 69: 762-818, 1928.

HEITZ, E. Die Ursache der gesetzmassignen Zahl, Lage, Form und Grosse pflanlicher Nucleolen. **Planta**, 12: 774-844, 1931.

HEITZ, E. Die Herkunft der Chromocentren. **Planta**, 18: 571-636, 1933.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata*, Corrêa e Spinola, 1964, em laboratório. **Mem. Inst. Butantan**, 36: 251-262, 1972.

HEIZER, P. The chromosome cytology of two species of the Pacific genus *Oechalia* (Pentatomidae, Hemiptera-Heteroptera), *Oechalia patruelis* Stal and *Oechalia pacifica* Stal. **J Morph.**, 87: 179-226, 1950.

HELENIUS, O. The mode of bivalent orientation in the Hemiptera. **Hereditas**, 38(4): 420-424, 1952.

HENDERSON, A. S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K. C. Location of ribossomal DNA in the human chromosome complement. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 69: 3394-3398, 1972.

HENDERSON, A.S.; WARBURTON, D.; ATWOOD, K.C. Localization of rDNA in the chromosome complement of the *Rhesus* (Macaca mulatta). **Chromosoma** (Berl), 44: 367-370,1974.

HERNANDEZ-VERDUM, D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. **Meth. Achiev. exp. Pathol.**, 12: 26-62, 1986.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J.; BOURGEOIS, C.A.; BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromosoma**, 79: 349-362, 1980.

HERRERA, A. H; OLSON, M. O. Association of protein C23 with rapidly labelled nucleolar RNA. **Biochemistry**, 25: 6258-6264, 1986.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosome. **Chromosoma**, 62: 361-367, 1977.

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

HOWELL, W. M.; DENTON, T. E.; DIAMOND, J. R. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia**, 31: 260-262, 1975.

HSU, T. C.; SPIRITO, S.E.; PARDUE, M. L. Distribution of 18 + 28S ribossomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma**, 53: 25-36, 1975.

HUBBELL, H. R. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. **Stain Technology**, 60: 285-294, 1985.

HUGHES-SCHRADER, S. Cytology of Coccids (Coccoidea-Homoptera). **Adv. Genet.**, 2: 127-203, 1948.

HUGHES-SCHRADER, S. The chromosomes of the giant scale, *Aspidoproctus maximus* Louns (Coccoidea-Margarodidae) with special reference to asynapsis and sperm formation. **Chromosoma** (Berl), 7: 420-438, 1955.

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

HUGHES-SCHRADER,S.; RIS, H. The diffuse spindle attachment of coccids, verified by mitotic behaviour of induced chromosome fragments. **J. Exp. Zool.**, 87: 429-459, 1941.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. Politeny as a factor in chromosomal evolution of the Pentatomini (Hemiptera). **Chromosoma**, 8: 135-151, 1956.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma** (Berl), 12: 327-350, 1961.

JOHN, B. Myths and mechanisms of meiosis. **Chromosoma**, 54: 295-325, 1976.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. **Heterochromatin**: **Molecular and structural aspects**. Cambridge University Press , 1988. cap. 01, p 1-143.

JOHN, B.; HENDERSON, S.A. Asynapsis and polyploid in *Schistocerca paranensis*. **Chromosoma**, 13: 111-147, 1962.

JOHN, B.; LEWIS, K.R. **The meiotic system**. Protoplasmatologia VI/FJ. Wien, New York, Springer,1965.

JOHN, B.; MIKLOS, G.L.G. Functional aspects of satellite DNA and Heterochromatin. **Intern. Rev. Cytol.**, 58: 1-114, 1979.

JOHN, B.; KING, M.; SCWEIZER, D.; MENDELAK, M. Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridoid grasshoppers. **Chromosoma**, 91: 185-200, 1985.

JORDAN, E.G. Interpreting nucleolar structure: where are the transcribing genes? **J. Cell Sci.**, 98: 437-442, 1991.

JUAREZ, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. **Rev. Saúde Publ.**, 4: 147-166, 1970.

KING, M.; JOHN, B. Regularities and restrictions governing C-band variation in acridoid grasshoppers. **Chromosoma**, 76: 123-150, 1980.

KOSHY, T.K. Chromosomes of Triatominae I: Haploid karyotypes of three species in the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae). **Acta. Cient. Venezolana**, 30: 183-190, 1979a.

KOSHY, T.K. Chromosomes of Triatominae II: Karyotypes studies of five species in the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae). **Acta. Cient. Venezolana**, 30:191-195, 1979b.

KOSHY, T.K. Chromosomes of Triatominae III: Karyotypes studies of *Triatoma pallidipennis* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Cient. Venezolana**, 30: 196-198, 1979c.

KURNIT, D.M. ; BROWN, F.L.; MAIO, J.J. Mammalian repetitive DNA sequences in a stable Robertsonian system: characterisation, in situ hibridizations, and cross species hybridizations of repetitive DNAs in calf, sheep and goat chromosomes. **Cytog. Cell Genet**., 21: 145-167, 1978.

LAKSHMI, N.; RAGHAVAIAH, P. V. Accessory nucleoli in *Trigonella foenum-graecum* L. **Cytologia**, 49: 401-405,1984.

LANGER, A.; KOUL, A. K. Studies on Nucleolus and Nucleolar Chromosomes in Angiosperms. IX. *Lilum* Linn. **Cytologia**, 48: 519-526, 1983.

LEAL, H.; FERREIRA NETO, A.F.; MARTINS, C.M. Dados ecológicos sobre os triatomíneos silvestres na ilha de Santa Catarina (Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop.**, 3: 213-220, 1961.

LENT, H.; MARTINS, A.V. Estudos sobre os Triatomideos do Estado de Minas Gerais, com descrição de uma nova espécie**. Rev. Ent**., 11: 877-886, 1940.

LEVIN, D. A. Accessory nucleoli in microsporocytes of hybrid *Phlox*. **Chromosoma**, 41: 413-420, 1973.

LIMA-DE-FARIA, A. DNA replication and gene amplification in heterochromatin. In: **Hand. Molec. Cytol.,** 277-325. North Holland, Publ. Co, Oxford, 1969.

LISCHWE, M. A.; SMETANA, K.; OLSON, M. O.; BUSCH, H. Proteins C23 and B23 are the major silver staining nucleolar proteins. **Life Sciences**, 25: 701-708, 1979.

LISCHWE, M. A.; RICHARDS, R. L.; BUSCH, R. K.; BUSCH, H. Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. **Exp. Cell Res.**,136: 101-109, 1981.

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in eukaryotes. **Ann. Rev. biochem**., 727-764, 1980.

LOPES, M.D.M. Transmissão materno-infantil da doença de Chagas. Brasilia, Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição da Universidade de Brasilia. (Dissertação de mestrado). 137p. 1983.

LWOFF, M.; NICOLLE, P. Neécessité de l'hématine pour la nutrition de *T. infestans* Klug (Réduvidé hémophage). **Comptes Rend. Soc. Biol.**, 139: 879-881, 1945.

MADDRELL, S.H.P.; LANE, N.J.; HARRISON, J.B.; GARDINER, B.O.C. DNA replication in binucleate cells of the Malpighian tubules of Hemipteran insects. **Chromosoma**, 91: 201-209, 1985.

MARKS, G. E. The Cytology of *Oxalis dispar*. **Chromosoma**, 8: 650-670, 1957.

MARQUES, A.X.C. Cariologia comparada de alguns Hemípteros Heterópteros (Pentatomídeos e Coccídeos). **Mem. Estud. Mus. Zool. Univ. Coimbra**, 163: 1-116, 1945.

MATSUI, S. I.; SASAKI, M. Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes. **Nature**, 246: 148-150, 1973.

MAUDLIN, I. Giemsa banding of metaphase chromosomes in triatominae bug. **Nature**, 252 (29): 392-393, 1974.

MAYR, B.; GRUBER, K. Nucleolus organizer regions and heterochomatin in the zebu (*Bos indicus* L.). **Theor. Appl. Genet**., 73: 832-835, 1987.

MAZZA, S. Infestación de *Triatoma* por *Schizotrypanum cruzi* y hallazgo de animales domesticos portadores del mismo en el sur de la Republica (Rio Negro y provincia de Buenos Aires). Nueva especie de *Triatoma* determinada en Rio Negro. **Misión Estud**. **Patol. Reg. Argentina**, 26: 1-19, 1936.

MELLO, M.L.S. Heterochromatin. **Ciên. Cult.**, 30 (3): 290-303, 1978.

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

MELLO, M. L. S. Toluidine blue binding capacity of heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans* Klug. **Histochemistry**, 69: 181-187, 1980.

MELLO, M. L. S.; DOLDER, H. Localization of the nucleolus in the epithelial cells of the Malpighian tubes of *Triatoma infestans* Klug. **In**: Colóquio Bras. de Microsc. Elet., VI, São Paulo, Escola de Comunicação e Artes, USP, p. 62-63, 1978.

MELLO, M. L. S.; DOLDER, H. Aspectos ultra-estruturais de túbulos de Malpighi de ninfas jovens de *Triatoma infestans* Klug. **Ciên. Cult.**, 32 (7): 903-907, 1980.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. Editora Edgard Bliicher Ltda, 1980. 71pp.

MELLO, M.L.S.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Response to banding and Hoeschst 33258 treatment in chromocentres of the Malpighian tubule cells of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, 52: 175-184, 1987.

MENDES, L.O.T. Observações citológicas em *Dysdercus*. Cadeias de cromossomios em tecido somatico de *Dysdercus mendesi* Bloete (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **Bragantia**, 9: 53-57, 1949.

MESA, A. The chromosomes of a relict species of eumastacid: *Daguerreacris tandiliae* Descamps & Liebermann, 1970 (Orthoptera, Eumastocoidea, Morseinae). **Rev. Brasil. Genet**., VII (2): 219-229, 1984.

MESA, A,; MESA, R.S. Complex sex-determining mechanisms in three species of South American Grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea). **Chromosoma** (Berl), 21: 163-180, 1967.

MESA, A.; GOÑI, B. Meiosis in the Japanese Gryllacridid *Anoplophilus acuticercus* Karny, 1931 (Orthoptera Saltatoria, Rhaphidophoridae): Amphitelic orientation of the X and supernumerary chromosome(s). **Zoological Science**, 4: 259-264, 1987.

MIKLOS, G.L.G.; NANKIVELL, R.N. Telomeric satellite DNA fuctions in regulating recombination. **Chromosoma** (Berl), 56: 143-167, 1976.

MILLER, O. J.; MILLER, D. A.; DEV, V. G.; TANTRAVAHI, R.; CROCE, C. M. Expression of human and supression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. **Proc.Nat. Acad. Sci.**, 73: 4531-4535, 1976.

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

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

MOENS, P.B. Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 38: 99-107, 1973.

MORENO, R.; NAVARRO, J.; ITURRA, P.; VELOSO, A.M. The karyotype of *Philodryas chamissonis* (Colubridae). Identification of nucleolar organizer region (NOR) and sex chromosomes by banding methods. **Rev. Brasil. Genet.**, X (3): 497-506, 1987.

MORIELLE, E. Variabilidade na localização e na atividade das regiões organizadoras de nucléolos em morcegos da família Phyllostomidae (Mammalia, Chiroptera). Dissertação de Mestrado, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, 153 p., 1987.

MUNISCH, P.R. The distribution of rapidly-renaturing DNA in the genome of *Oncopeltus*. PhD thesis. University of Chicago, 1973.

NANYA, S. Atividade organizadora nucleolar e bandamentos C e G em *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. Dissertação de Mestrado, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto. 105 p.1986.

NEIVA, A.; LENT, H. Sinopse dos Triatomídeos. **Rev. Ent.**, 12: 61-92, 1941.

NORRIS, D.M.; CHU, H.M.; RAO, P.D. Changes in ovarian ultrastructure and ecdysteroid titer during the aging process of female *Xyleborus ferrugineus* (Coleoptera, Scolytidae). **J. Morphol.**, 177: 245-254, 1983.

OCHS, R. L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110 Kd/ p 15, I) is the nucleolar silver staining protein. **Exp. Cell Res.**, 152: 260-265, 1984.

OCHS, R. L.; LISCHWE, M.; O,LEARY, P.; BUSCH, H. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. **Exp. Cell Res.**, 146: 139-149, 1983.

OLERT, J.; SAWATZKI, G.; KLING, H.; GEBAUER, J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). **Histochemistry**, 60: 91-99,1979.

unesp

OLSON, M. O.J.; RIVERA, Z.M.; THOMPSON, B.A.; KAO, W.Y.; CASE, S.T. Interaction of nucleolar phosphoproteins C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, 22: 3345-3351, 1983.

PANZERA, F.; ALVAREZ, F.; SANCHEZ-RUFAS, J.; PÉREZ, R.; SUJA, J. A.; SCVORTZOFF, E.; DUJARDIN, J. P.; ESTRAMIL, E,; SALVATELLA, R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduvidae). **Genome**, 35:1068-1074, 1992.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; PANZERA, Y.; ALVAREZ, F.; SCVORTZOFF, E.; SALVATELLA, R. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera:Reduviidae). **Chromosomes Research**, 3:143-150,1995.

PAPESCHI, A.G. C-banding and DNA content in three species of *Belostoma* (Heteroptera) with large differences in chromosome size and number. **Genetica**, 76: 43-51, 1988.

PAPESCHI, A.G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). **Hereditas**, 115: 109-114, 1991.

PARDUE, M.L.; GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, 168: 1356-1358, 1970.

PARDUE, M.L.; HSU, T.C. Locations of 18S and 28S ribosomal genes on the chromosomes of the Indian muntjac. **J. Cell Biol.**, 64: 251-254, 1975.

PARSHAD, R. Cytological studies in Heteroptera. II. Chromosome complement and meiosis in the males of three pyrrhocorid bugs. **Cytologia**, 22: 127-135, 1957.

PATHAK, S.; HSU, T.C.; ARRIGHI, F.E. Chromosomes of *Peromyscus* (Rodentia, Cricetidae). IV. The role of heterochromatin in karyotypic evolution. **Cytogenet. Cell Genet.**, 12: 315-326, 1973.

PATTON, J.L.; SHERWOOD, S.W. Genome evolution in Pocket Gophers (Genus *Thomomys*). I. Heterochromatin variation and speciation potencial. **Chromosoma**, 85: 149-162, 1982.

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

PENALVA DA SILVA, F.; SCHREIBER, G. Morphology of spermatogenetic tubes as taxonomic character in Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). **Rev. Brasil. de Biol.**, 29: 97-102,1969.

PÉREZ, R.; PANZERA, Y.; SCAFIEZZO, S.; MAZZELLA, M. C.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for triatominae species distinction (Hemiptera:Reduviidae). **Mem. Inst. Osw. Cruz**, 87 (3): 353-361, 1992.

PESSACQ, T.P. Cyclic changes in the structure of the nucleolus-associated chromatin in neurons of birds. **Cytologia**, 34: 375-381, 1969.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Hemiptera, Triatomíneos e cimicídeos. In: ___. **Parasitologia Médica**. Guanaba-Koogan 1977. cap. 58, p. 751-782.

PFEIFLE, J.; BOLLER, K.; ANDERER, F. A. Phosphoprotein pp 135 is an essential component of the nucleolus organizer region (NOR). **Exp. Cell Res.**, 162:11-22, 1986.

PHILLIPS, R.; IHSSEN, P.E. Chromosome banding in salmonid fish: nucleolar organizer regions in *Salmo* and *Salvelinus*. **Can. J. Genet. Cytol.**, 27: 433-440, 1985.

PIZA, S.T. Comportamento dos cromossômios na primeira divisão dos espermatócitos de *Tityus bahiensis*. **Sc. Gen.**, 1: 255-261, 1939

PIZA, S.T. Chromosomes with two spindle attachments in the brasilian Scorpion (*Tityus bahiensis* Perty). **J. Hered.**, 32, 423-426, 1941.

PIZA, S.T. Meiosis in the male of the Brasilian scorpions, *Tityus bahiensis*. **Rev de Agric.**, 18: 249-276, 1943a.

PIZA, S.T. The uselessness of the spindle fibers for moving the chromosomes. **Am. Nat.**, 74: 422-462, 1943b.

PIZA, S.T. Estudos citológicos em Hemípteros da família Coreidae. **An. Esc. Sup. Agr.Luiz de Queiroz**, 2: 119-148, 1945.

PIZA, S.T. Comportamento des cromossomios na meiose de *Euryophthalmus rufipennis* Laporte (Hemiptera, Pyrrhocoridae). **An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz**, 3: 27-54, 1946a.

PIZA, S.T. Notas sobre a meiose de *Pachylis* (Hemiptera, coreidae). **An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz**, 3: 55-67, 1946b.

PIZA, S.T. Nota prévia sobre a meiose de *Corizus* (*Lyorhyssus*) *hayalinus* (Hemiptera, Corizidae). **An. Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz**, 3: 141-158, 1946c.

PLOTON, D.; MÉNAGER, M.; ÁDNET, J.J. Localisation ultrastructural des protéines Ag-NOR sur coupes épaisses. **Biol. Cell**, 52, 88a, 1984.

RAO, S.R.V. The kinetochore problem in Hemiptera. **Curr. Sci.**, 27: 303-304, 1958.

RAY, J.H.; VENKETESWARAN, S. Constitutive heterochromatin in monocentric and polycentric chromosomes. **Chromosoma**, 66: 341-350, 1978.

RIS, H. A cytological and experimental analysis of the meiotic behaviour of the univalent X-chromosome in the bearberry aphid *Tamalia* (Phyllaphis) coweni (CkII). **J. Exp. Zool**, 90: 267-322,1942.

RUFAS, J.; GOSÁLVEZ, J. Development of silver stained structures during spermatogenesis of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). **Caryologia**, 35 (2): 261-267, 1982.

RUFAS, J.; ESPONDA, P.; GOSÁLVEZ, J. NOR and nucleolus in the spermatogenesis of Acridoid grasshoppers. **Genetica**, 66: 139-144, 1985.

RUIZ, I.R.G.; SOMA, M.; BEÇAK, W. Estudo comparativo entre os padrões de banda Ag-As e bandas C em anfíbios poliplóides do gênero *Odontophrynus*. **Ciênc. Cult.** (supl.), 30: 550, 1978.

RUIZ, I. R. G.; SOMA, M.; BEÇAK, W. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynes* (Amphibia, Anura). **Cytogenet. Cell Genet.**, 29: 84-98,1981.

SALLES, J.M.; CARVALHO,C.R. Banda C em cariótipos somáticos de triatomíneos. **Ciênc. e Cult.**, 37 (7): 725, 1985.

SASAKI, K.; KENDALL, M.D. The morphology of the haemopoietic cells of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes. **J. Anat.**, 140: 279-295, 1985.

SASAKI, K.; MATSUMURA, G.; ITO, T. Morphometric analises of postnatal erythropoieses in the spleen and bone narrow of the mouse. **Arch. Histol. JPN**, 45: 247-255, 1982.

SASAKI, K.; MATSUMURA, G.; ITO, A. A quantitative morphology of nucleoli of erythroblasts in the mouse spleen: an electron microscopic study. **Arc. Histol. JPN**, 47: 239-250, 1983.

SATOH, K.; BUSCH, H. Silver staining of phosphoproteins and phosphothreonine in nucleolar and other phosphoproteins. **Cell Biol. Intern. Reports**, 5: 857-866, 1981.

SCHÄFER, V.; KUNZ, W. Two separated nucleolus organizers on the *Drosophila hydei* Y chromosome. **Molec. Gen. Genet.**, 137: 35-368, 1975.

SCHEER, U.; ROSE, K.M. Localisation of RNA polimerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscope immunocytochemistry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 1431-1435, 1984.

SCHEER, U.; BENAVENTE, R. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. **Bio Essays**, 12: 14-21, 1990.

SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. **Chromosoma**, 87: 327-344, 1982.

SCHMID, M.; HOFGÄRTNER, F.J.; ZENZES, M.T.; ENGEL, W. Evidence for postmeiotic expression of ribossomal RNA genes during male gametogenesis. **Hum. Genet.**, 38: 279-284, 1977.

SCHMID, M.; VITELLI, L.; BATISTONI, R. Chromosome banding in Amphibia. VI. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S + 28S and 5S ribossomal RNA genes in *Ascaphidae*, *Pipidae*, *Discoglossidae* and *Pelobatidae*. **Chromosoma**, 95: 271-284, 1987.

SCHMIDT, B.A. Ultrastructure of different malpighian tubules from cockroach nymphys during the notting cycle. **J. Morphol.**, 162: 361-388, 1979.

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

SCHOFIELD, C.J.; DUJARDIN, J.P. Adaptative trends in selvatic Triatominae. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, 26 (supl. II): 37, 1993.

SCHRADER, F. Notes on the mitotic behaviour of long chromosomes. **Cytologia**, 6: 422-430, 1935.

SCHRADER, F. The formation of tetrads and the meiotic mitosis in the male of *Rhytidolomia senilis* Say (Hemiptera, Heteroptera). **J. Morph.**, 67: 123-141, 1940.

SCHRADER, F. The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the Heteroptera and Homoptera. **Evolution**, 1 (3): 134-142, 1947.

SCHRADER, F. The nuclear content of desoxyribonucleic acid in the Mantidae genus *Liturgosa* (Orthoptera, Mantoidea). **Chromosoma**, 5: 544-554, 1953.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Cytogenetical studies on brazilian Hemiptera. **Hereditas**: 656, 1949. (VIIIth International Congress of Genetics - Stockholm, 1948).

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile mecanismo di speciazione. **Scientia Genetica**, 3: 215-226, 1950.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. Rev. Bras. de Biologia, 9: 519-529,1949. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, 49: 513-542, 1951.

SCHREIBER, G.; CARVALHO, H.C.; ESPINOLA, H.N. Genetics of *Triatoma* and other vector species. In: Wright, J.W.& Pal,R. **Genetics of Insect vector of disease**. Amsterdam: Elsevier Publ. Cy. , 1967. cap. 14,: p. 441-456.

SCHREIBER, G.; PENALVA DA SILVA, F.; RESENDE, E. S. ; CAVENACHI, T. M.; CARVALHO, H. C. DNA synthesis in the spermatogenesis of triatomids. **Rev. Bras. de Pesq. Méd. Biol.**,1 (5-6): 245-252, 1968.

SCHREIBER, G.; BOGLIOLO, A.N.; PINHO, A.C. Cytogenetics of triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. **Rev. Brasil. Biol.**, 32 (2): 255-263, 1972.

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

SCHREIBER, G.; PINHO, C.A.; PARENTONI, M.R.; SALGADO, A.A.; GODY Jr., T.L. Cytogenetics of triatominae: II spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *T. pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 34 (1): 1-19, 1974.

SCHREIBER,G.; SALLES, J.M.; MARTINS, P.R.; NOVAES, P.M. Alterações da espermatogênese conseqüente à hibridação interespecífica ou por efeito de radiação em Triatominae. **Ciênc. Cult.**, 27 (10): 1140-1141, 1975.

SCHREIBER, G.; SALLES, J.M.; MARTINS, R.P.; NOVAES, P.M. Cytogenetics of Triatominae (Hemiptera, Heteroptera). IV: Effect of radiations on spermatogenesis. **Rev. Bras. Biol**., 37 (1): 139-145, 1977.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. "In situ" hibridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, 92: 143-148, 1985.

SCHWARZACHER, H. G.; MIKELSAAR, A. V.; SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. **Cytogenet. Cell Genet.**, 20: 24-39, 1978.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns**. Chrom. Today**, 9: 61-74, 1987.

SEN, S.; SHARMA, T. Role of constitutive heterochromatin in evolutionary divergence: Results of chromosome banding and condensation inhibition studies in *Mus Musculus*, *Mus booduga* and *Mus dunni*. **Evolution**, 37 (3): 628-636, 1983.

SILVEIRA, A.C. Indicadores operacionais para um programa de eliminação de *Triatoma infestans*. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, 26 (supl. II): 51-54, 1993.

SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27 (supl. III): 11-22, 1994.

SILVEIRA, A.C.; SOUZA, P.C.; SILVEIRA NETO, H.V. Importância de espécies secundárias de triatomíneos na transmissão domiciliar da doença de Chagas no Triângulo Mineiro e Alta Paranaíba. **In.** XXIV Congresso Soc. Brasil. Medic. Trop., Fortaleza, p.200, 1993.

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

SIMÕES, L.G.G.; AMABIS, J.M.; CESTARI, A.N. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. **Cienc. Cult.**, 27: 159-161, 1975.

SLACK, H.D. The chromosomes of *Cimex*. **Nature**, 143: 78, 1939.

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In.: John, B. **Animal Cytogenetics**. Gebruder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 1978. 366pp.

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

SOLARI, A.J.; COUNCE, S.J. Synaptonemal complex karyotyping in *Melanoplus differentialis*. **J. Cell Sci.**, 26: 229-250, 1977.

SOLARI, A.J.; AGOPIAN, S. Recombination nodules, synaptonemal complexes and heterochromatin in the hemipteran *Triatoma infestans*. **Microsc. Electron. Biol. Cell**, 11 (2): 179-189, 1987.

SOMMERVILLE, L. L.; WANG, K. The ultrasensitive silver "protein" stain also detects nanograms of nucleic acids. **Biochem. Bioph.I Res. Communic.**, 102: 53-58,198l.

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

SYBENGA, J. **General Cytogenetics**. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1972.

TANTRAVAHI, R.; MILLER, D. A.; DEV, V. G.; MILLER, O. J. Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon. **Chromosoma**, 56: 15-27,1976.

THIRY, M.; SCHEER, U.; GOESSENS, G. Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and "in situ" hybrization at the electron microspic level. **Electron Microsc. Rev.**, 4: 85-110, 1991.

TOLEDO, L.F.A.; FORESTI, F. As regiões organizadoras do nucléolo em peixes. **Ciênc. Cult.**, 37 (3): 448-453, 1985.

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

TROEDSON, P.H. The behaviour of the compound sex chromosomes in the females of certain Hemiptera-Heteroptera. **J. Morph.**, 75: 103-147, 1944.

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

UNNITHAN, G.C.; NAIR, K.K. Fine structure of the A cells of the pars intercerebralis of normal and gamma-irradiated female milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera, Lygaeidae). **J. Morphol.**, 154: 59-82, 1977.

USINGER, R.L. A revised classification of the Reduvioidea with a new subfamily from South America. **Ann. Ent. Soc. America**, 36: 602-618, 1943.

USINGER, R.L. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. **Publ. Health Bull.**, 288: 1-83, 1944.

VARLEY, J. M. Patterns of silver staining of human chromosomes. **Chromosoma**, 61: 207-214, 1977.

VERMA, R. C.; RAINA, S. N. Cytogenetics of *Crotalaria*. V. Supernumerary nucleoli in *C. agatiflora* (Leguminosae). **Genetica**, 56: 75-80, 1981.

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

WACHTLER, F.; HARTUNG, M.; DEVICTOR, M.; WIEGANT, J.; STAHL, A.; SCHWARZACHER, H.G. Ribosomal DNA is located and transcribed in the dense fibrillar component of human Sertoli cell nucleoli. **Exp. Cell Res.**, 184: 61-71, 1989.

WARBURTON, D.; HENDERSON, A. S. Sequential silver staining and hybridization "in situ" on nucleolus organizing regions in human cells. **Cytogen. Cell Genetics**, 24: 168-175, 1979.

WARNER, J.R. The nucleolus and ribosome formation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 2: 521-527, 1990.

WEN, W.N.; LEÓN, P.E.; HAGUE, D.R. Multiple gene sites for 5S and 18S + 28S RNA on chromosomes of *Glyptotendipes barbites* (Staegor). **J. Cell Biol.**, 62: 132-144, 1974.

WHITE, M.J.D. The origin and evolution of multiple sex-chromosome mechanisms. **J. Genetics**, XL (3): 303- 336, 1940.

WHITE, M.J.D. An extreme form of chiasma localization in a species of *Bryodema* (Orthoptera, Acridadae). **Evolution**, 8: 350-358, 1954.

WHITE, M.J.D. Some general problems of chromosomal evolution and speciation in animals. **Surv. Biol. Progr.**, 3: 109-147, 1957.

WHITE, M.J.D. **Animal Cytology and Evolution.** Cambridge Univ. Press, 3ª ed. London. 961 p., 1973.

WIGGLESWORTH, V.B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. **Proc. Roy. Soc. Lond.**, 131: 313-339, 1943.

WRIGHT, J. W.; PAL, R. **Genetics of Insect Vectors of Diseases.** Elsevier Publ. Cy. Amsterdam, 1: 749, 1967.

WOLFE, S.L.; JOHN, B. The organization and ultrastructure of meiotic chromosomes in *Oncopeltus fasciatus*. **Chromosoma**, 17: 85-103, 1965.

YADAV, J.S.; YADAV, A.S. Localization of NORs in spermatogonial metaphase chromosomes of six species of grasshoppers. **Genetica**, 74: 155-160, 1987.

YONENAGA-YASSUDA, Y. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos nos roedores. **Ciênc. Cult.**, 37 (3): 453-456, 1985.

YUNIS, J.J.; YASMINEH, W. G. Heterochromarin, Satellite DNA and Cell fuction. **Science**, 174: 1200-1209, 1971.

ZABALA, A.; D'ANTONIO, M. Patrones de alimentacion y defecacion en ninfas de 5º estadio de cuatro especies de triatomineos (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis*, *T. infestans* y *T. brasiliensis,* Hemiptera, Reduviidae). **Act. Cient. Venezolana**, 39 (1): 79-83, 1988.

ZELEDÓN, R.; ALVARADO, R.; JIRÓN, F.L. Observation on the feeding and defecation patterns on three triatominae species (Hemiptera:Reduviidae)**. Act. Trop.,** 34: 65-77, 1977.

VIII - APÊNDICE

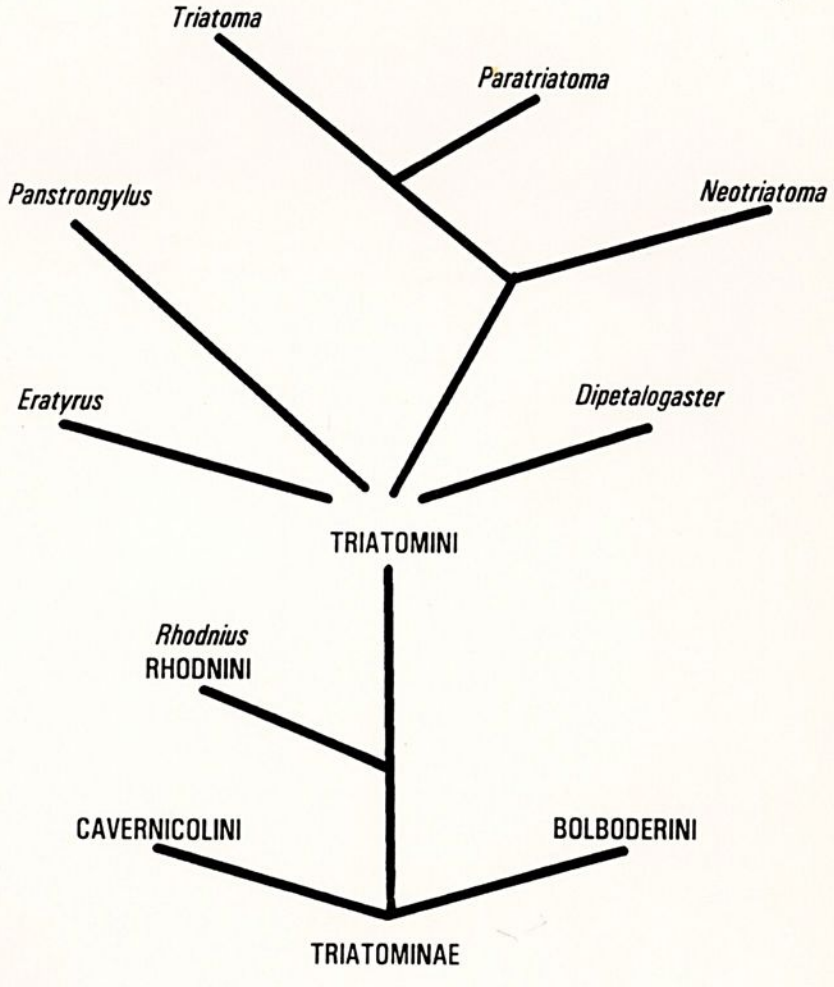


Fig. 50. Árvore filogenética dos Triatominae, adaptada de Usinger, 1944.